

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Análisis del papel de la proteína de superficie VSP9B10A de *Giardia duodenalis* en su interacción con células epiteliales**

**TESIS**

Que presenta

**M. EN C. ARIANA CABRERA LICONA**

para obtener el Grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

En la Especialidad de

**GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Director de Tesis

Dra. Ma Guadalupe Ortega Pierres

Ciudad de México

NOVIEMBRE 2017

***EL FUEGO NOS DIO PODER***

***LA CONVERSACIÓN HIZO POSIBLE QUE COOPERÁRAMOS***

***LA AGRICULTURA ALIMENTO NUESTRA AMBICIÓN***

***LA MITOLOGÍA SOSTUVO LA LEY Y EL ORDEN***

***EL DINERO OFRECIÓ ALGO EN QUE CONFIAR***

***LAS CONTRADICCIONES CREARON LA CULTURA***

***LA CIENCIA NOS HIZO IMPARABLES.....***

*Yuval Noah Harari*

*De Animales a Dioses*

El presente proyecto fue realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN y el Departamento de Biología Molecular del Centro Biomédico de la Universidad de Uppsala Suecia, bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Ortega-Pierres y la asesoría del Dr. Staffan Svärd.

En este trabajo se contó con la asesoría de las Doctoras Rosa María Bermúdez Cruz y Cecilia Montañéz Ojeda del Departamento de Genética y Biología Molecular y de los Doctores Ricardo Mondragón Flores del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN y Emma Saavedra Lira del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología.

La realización de esta Tesis fue posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, mediante el otorgamiento de la beca con número de registro 225440, la beca Mixta 2012-2013 de Movilidad en el extranjero con número 290674 y el apoyo del Programa Nacional de Posgrado de Calidad.

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la Dra. Guadalupe Ortega-Pierres por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su apoyo y confianza. Por contribuir ampliamente a mi formación académica y por todas las experiencias vividas bajo su tutela que me hicieron crecer como persona y profesional.*

*Al Dr. Staffan Svärd por recibirme en su laboratorio, tratarme como a uno de los suyos, por su comprensión, asesoría, disponibilidad, amabilidad y buena actitud; pero más que nada por mostrarme como debe ser un buen líder.*

*A la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz por sus enseñanzas, consejos, disponibilidad, interés y por transmitirme su curiosidad y cariño por la ciencia.*

*A los doctores Ricardo Mondragón, Emma Saavedra y Cecilia Montañez por su tiempo, disposición conocimientos, cuestionamientos y comentarios que me permitieron evolucionar en mi formación profesional.*

*A la auxiliar de investigación Biol. Roció Fonseca Liñán por su orientación, enseñanza y consejos; por escucharme siempre y ser muchas veces la voz de la razón. Siempre estaré agradecida por su sinceridad y apoyo en los momentos en los que necesite ver las cosas con claridad.*

*A Arturo Pérez-Taylor por los chistes sin chiste; por las terapias y eternas platicas, por sus consejos y brindarme su amistad.*

*Al Dr. Raúl Arguello y Luisa Bazán por ser siempre accesibles y dispuestos a compartir sus conocimientos.*

*Al personal de apoyo del Laboratorio 2 Blanca Herrera e Isabel Palacios por apoyarme siempre en el trabajo, por brindarme su amistad y confianza.*

*A Araceli Vaquero y Claudia Cervantes por sus enseñanzas, ayuda, consejos y amistad, por esas salidas y todos los momentos que compartimos juntas y porque a pesar de que cada una ha tomado su rumbo y las distancias nos separan seguimos siendo amigas.*

*A todos los amigos que gane durante mi estancia en el Laboratorio 2; por esos momentos memorables de risas y llantos, borracheras, bulling, etc, etc. Por escuchar y soportar todas mis quejas y gritos (yo no grito), acompañarme en los momentos más difíciles y ayudarme a salir de ellos con todas sus ocurrencias y cariño. Aurora Cervantes (Coty), Rodrigo Quezada (Jr), Yaremit Mora (Princess), Daniel Sánchez (Dany) y Giovanna Flores (Gio). Me enseñaron mucho, los voy a extrañar, pero confié en que los lazos que formamos perduraran.*

*A los demás compañeros del laboratorio porque después de todo también me ayudaron a evolucionar como persona, pues lo negativo también es una fuente de enseñanza. Con ustedes aprendí a ser tolerante y menos ingenua. Me quedare con los buenos recuerdos.*

*A Brenda Paz. Por ser una gran amiga, por su apoyo, comprensión y sabios consejos además de las locuras. Gracias por tener confianza en mí y mostrarme el mundo de oportunidades que existe.*

*A mi amiga de sufrimientos Janet Ramos. Por acompañarme durante todo este trayecto y ser siempre un hombro comprensivo y cariñoso que se preocupa por mí. Es extraño lo mucho que nos llegamos a parecer a veces, pero más extraño aun que me hayas brindado tu amistad con lo insoportable que puedo ser. Muchas gracias por tomar café conmigo, aunque no te guste.*

*A las personas que me brindaron su amistad durante mi estancia en la Universidad de Uppsala Britta, Jon, Ellien, Mathias, Cedric, pero especialmente a Marcela Ferella, Dimitra Peraismaki y Sara Campos, siempre estaré agradecida por su ayuda para integrarme, tenerme paciencia y hacerme sentir como en casa. Gracias a Marcela por su preocupación por mí, sus consejos, amabilidad, enseñanzas, por los viajes y las cenas en su casa. A Dimitra por ser tan dulce, por esas pláticas en espanGLISH y su buen humor; las tardes en bicicleta y comiendo helado nunca las olvidare.*

*A Aarón Hernández y Julen Tamayo por esas comilonas inolvidables, las tortillas de patata, las fiestas, las noches viendo The Walking dead y el viaje al polo norte.*

*A mi familia. A mi Madre que es la persona más importante en mi vida y por la cual todas mis metas y objetivos se cumplen porque sin su apoyo, cariño y comprensión no sería la persona que soy. A mi padre porque sin su esfuerzo y apoyo no podría haber concluido mi educación. A mis hermanas por todos los buenos momentos y el cariño que nos hemos brindado con sus altas y bajas. A mi sobrino que es un rayo de luz en mi vida, porque sus risas, sus juegos y su inocencia han ablandado mi corazón.*

## CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	I
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	I
<b>RESUMEN</b> .....	IV
<b>ABSTRACT</b> .....	V
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
Giardia. Características generales.....	6
Historia y Taxonomía .....	6
Ciclo de vida y descripción de estadios.....	9
Estadio vegetativo: Características morfológicas y biológicas del trofozoíto.....	14
El genoma, transcriptoma y proteoma de <i>Giardia</i> .....	23
Estadio latente: Características morfológicas del quiste .....	29
Giardiasis .....	31
Características generales: prevalencia y distribución .....	31
Signos y síntomas de la Giardiasis.....	34
Patofisiología de la Giardiasis .....	36
Respuesta inmunológica del hospedero.....	41
Las Proteínas Variables de Superficie .....	46
Variación antigénica.....	49
Diagnóstico.....	53
Tratamiento .....	56
<b>ANTECEDENTES DIRECTOS</b> .....	64
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	69
<b>HIPÓTESIS</b> .....	70
<b>OBJETIVOS</b> .....	70
General.....	70
Particulares .....	70
<b>DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b> .....	71
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	72
Cultivo de trofozoítos transfectados con el plásmido VSP9B10A.pAC.....	72
Cultivo de las líneas celulares IEC6, MDCK y Caco-2/TC7 .....	73
Ensayos de interacción.....	73

Determinación de la actividad proteolítica en sobrenadantes de interacción por zimogramas .....	74
Identificación de la proteína VSP9B10A en sobrenadantes de interacción por Western-blot y espectrometría de masas .....	75
Análisis de la expresión de la proteína VS9B10A durante la interacción por qRT-PCR e inmunofluorescencia indirecta .....	75
Determinación de la permeabilidad de las monocapas durante los ensayos de interacción por transporte de Dextrán .....	76
Determinación del efecto de los trofozoítos VSP9B10A.pAC sobre la polimerización de F-actina mediante inmunofluorescencia directa .....	77
Análisis del efecto de los trofozoítos VSP9B10A.pAC sobre la localización de las proteínas de las uniones estrechas ZO-1, ocludina y claudina-1 por inmunofluorescencia directa y Western-blot .....	78
Determinación del efecto de los trofozoítos VSP9B10A.pAC sobre la activación de los receptores de proteasas PAR1 y 2 por RT-PCR, inmunofluorescencia indirecta y Western-blot .....	79
<b>RESULTADOS</b> .....	82
Expresión de la proteína VSP9B10A en poblaciones de trofozoítos transfectados con el plásmido VSP9B10A.PAC .....	82
Establecimiento del efecto de las poblaciones de trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A en monocapas de células IEC-6 .....	85
Determinación de la presencia de la proteína VSP9B10A en los sobrenadantes de interacción y en zimogramas del interactoma .....	87
Establecimiento del efecto de la población de trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A en monocapas de células MDCK y proteínas de las uniones estrechas .....	90
Establecimiento del efecto de la población de trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A en monocapas de células Caco-2/TC7 .....	93
Determinación de cambios en la expresión del transcrito y la proteína VSP9B10A durante la co-incubación con monocapas de células Caco-2/TC7 .....	95
Determinación del efecto de la población de trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A en las proteínas de las uniones estrechas de monocapas de células Caco-2/TC7 .....	100
Determinación del efecto de los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A sobre la dinámica de polimerización de actina .....	115
Determinación del efecto de los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A sobre los receptores activados por proteasas PAR1-4 .....	116

<b>DISCUSIÓN</b> .....	121
<b>CONCLUSIONES</b> .....	141
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	142
<b>REFERENCIAS</b> .....	143
<b>ANEXOS</b> .....	167

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación actual del género <i>Giardia</i> : Ensamblajes /genotipos y especies.....	7
Tabla 2. Nueva propuesta de clasificación del género <i>Giardia</i> .....	8
Tabla 3. Principales efectos patofisiológicos de <i>Giardia duodenalis</i> y sus mecanismos.....	39
Tabla 4. Fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de la Giardiasis y sus mecanismos de acción .....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Giardia</i> .....	10
Figura 2. Mecanismos y cambios en la morfología durante el enquistamiento de <i>Giardia</i> .	13
Figura 3. Características morfológicas del trofozoíto de <i>Giardia</i> .....	17
Figura 4. Sistema membranal y de transporte en <i>Giardia</i> .....	18
Figura 5. Características morfológicas y estructurales del mitosoma de <i>Giardia</i> .....	19
Figura 6. Vías metabólicas identificadas en <i>Giardia</i> .....	21
Figura 7. Los cromosomas de <i>Giardia</i> .....	24
Figura 8. Maquinarias de inicio de la replicación, transcripción y poliadenilación en <i>Giardia</i> .....	26
Figura 9. Distribución de los genes de las proteínas VSP y HCP en los cromosomas de <i>Giardia</i> .....	28
Figura 10. Morfología del quiste de <i>Giardia</i> .....	30
Figura 11. Riesgo de infección con <i>Giardia</i> en viajeros .....	32
Figura 12. Distribución sero epidemiológica de <i>Giardia</i> en México .....	33
Figura 13. Patofisiología de la Giardiasis.....	37
Figura 14. Respuesta inmune contra <i>Giardia</i> .....	45
Figura 15. Representación esquemática de las características estructurales de las proteínas VSPs .....	48
Figura 16. Mecanismos de regulación de la variación antigénica en <i>Giardia</i> .....	51
Figura 17. Técnicas de detección de <i>Giardia</i> en muestras fecales o de agua.....	55
Figura 18. Métodos moleculares para la identificación y diagnóstico de <i>Giardia</i> .....	56
Figura 19. Activación de los grupos nitro en <i>Giardia</i> .....	58
Figura 20. Identificación de la proteína VSP9B10A en sobrenadantes de interacción entre trofozoítos WB y monocapas de células IEC-6.....	65
Figura 21. Modelamiento de la zona catalítica predicha en la proteína VSP9B10A .....	67
Figura 22. Plásmidos construidos para expresar o silenciar a la proteína VSP9B10A en trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i> .....	83
Figura 23. Expresión de la proteína VSP9B10A en las poblaciones de trofozoítos transfectados .....	84
Figura 24. Detección de la expresión de la proteína VSP9B10A por inmunofluorescencia indirecta. ....	85
Figura 25. Efecto de la población de trofozoítos VSP9B10A.pAC sobre las monocapas de células IEC6.....	86

Figura 26. Inmuno-detección de la proteína VSP9B10A en sobrenadantes de interacción y detección actividad proteolítica .....	88
Figura 27. Efecto de la incubación de trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A con el anticuerpo anti VSP9B10A en co-cultivos con monocapas de células IEC-6. ....	89
Figura 28. Cinética de la liberación de la proteína VSP9B10A durante la interacción con monocapas de células IEC-6.....	89
Figura 29. Efecto de los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VS9P9B10A sobre monocapas de células MDCK.....	91
Figura 30. Efecto de los trofozoítos VSP9B10A.pAC sobre las proteínas de las uniones estrechas y adherentes en monocapas de células MDCK.....	92
Figura 31. Evaluación de la viabilidad celular en monocapas de células MDCK incubadas con los trofozoítos VSP9B10A.pAC .....	92
Figura 32. Efectos de los trofozoítos VSP9B10A.pAC y $\Delta$ VSP9B10A.pAC en monocapas de células Caco-2/TC7.....	94
Figura 33. Cambios en la permeabilidad celular inducidos por los trofozoítos VSP9B10A.pAC.....	95
Figura 34. Curso temporal del transcrito de la proteína VSP9B10A durante la interacción de trofozoítos con monocapas de células Caco2/TC7 .....	96
Figura 35. Expresión de la proteína VSP9B10A en trofozoítos WB incubados con monocapas de células Caco2/TC7.....	97
Figura 36. Expresión de la proteína VSP9B10A en trofozoítos VSP9B10A.pAC incubados con monocapas de células Caco-2/TC7.....	98
Figura 37. Cambios en el patrón de localización de la proteína VSP9B10A después de la interacción con células Caco2/TC7 .....	99
Figura 38. Comparación del perfil proteolítico en los sobrenadantes de interacción con células Caco2/TC7.....	100
Figura 39. Alteraciones del patrón de F-actina en monocapas de células Caco-2/TC7 después de 2 y 24 horas de interacción.....	102
Figura 40. Cortes horizontales que muestran la localización de F-actina en monocapas de células Caco-2/TC7 incubas con las diferentes poblaciones de trofozoítos que expresan o no la proteína VSP9B10A. ....	103
Figura 41. Efecto de los trofozoítos VSP9B10A.pAC sobre la distribución de ZO-1 .....	105
Figura 42. Distribución citoplasmática de la proteína ZO-1 en monocapas incubadas con trofozoítos VSP9B10A.pAC.....	106
Figura 43. Inmuno-detección de la proteína ZO-1 en fracciones solubles de monocapas CaCo-2/TC7 incubadas con diferentes poblaciones de trofozoítos que expresan o no la proteína VSP9B10A. ....	106
Figura 44. Efectos en la distribución de ocludina en monocapas incubadas con trofozoítos VSP9B10A.pAC.....	108
Figura 45. Inmuno-detección de ocludina en extractos totales de células Caco-2/TC7 incubadas con diferentes poblaciones de trofozoítos que expresan o no a la proteína VSP9B10A. ....	109

Figura 46. Cortes transversales que muestran el efecto de los trofozoítos VSP9B10A.pAC en la localización de F-actina y ocludina.....	109
Figura 47. Efecto de diferentes poblaciones de trofozoítos sobre la localización de las proteínas ZO-1 y ocludina. ....	110
Figura 48. Comparación del efecto de trofozoítos VSP9B10A.pAC y trofozoítos expresando otras proteasas sobre la distribución de F-actina y ocludina en monocapas de células Caco-2/TC7. ....	112
Figura 49. Identificación del sitio de unión del inhibidor de cisteín proteasas E-64 en la proteína VSP9B10A. ....	113
Figura 50. Efectos en la distribución de claudina-1 en las monocapas incubadas con trofozoítos VSP9B10A.pAC.....	114
Figura 51. Inmuno-detección de claudina-1 en monocapas de células Caco-2/TC7.....	114
Figura 52. Inmuno-detección de RhoA y Rac-1 en células Caco-2/TC7 co-cultivadas con diferentes poblaciones de trofozoítos que expresan o no a la proteína VSP9B10A.....	116
Figura 53. Expresión del transcrito de los receptores PAR-1 y 2 durante la interacción de trofozoítos VSP9B10A.pAC con células Caco2/TC7 .....	117
Figura 54. Localización del receptor PAR 2 en monocapas de células Caco2 /TC7 durante la interacción con trofozoítos VSP9B10A.pAC .....	118
Figura 55. Inmuno-detección de los receptores PAR1 y 2 en extractos de células Caco-2/TC7 .....	119
Figura 56. Expresión del transcrito de IL-8 en monocapas de células Caco-2/TC7 co-incubadas con distintas poblaciones de trofozoítos .....	120
Figura 57. Modelo del efecto de la infección con trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A sobre células del epitelio intestinal.....	140

## RESUMEN

En este trabajo de investigación se planteó analizar el efecto de poblaciones de trofozoítos de *Giardia* que expresan al antígeno VSP9B10A durante su interacción con monocapas de células epiteliales. Estudios previos mostraron que la proteína VSP9B10A es liberada al medio durante la interacción de los trofozoítos con células IEC-6 y que ésta tiene una zona de homología con la catepsina B, entre los residuos 324-684, por lo que puede tener una función en la patología de la Giardiasis.

Con la finalidad de analizar el efecto de la VSP9B10A se transfectaron trofozoítos de la cepa WB y se obtuvieron poblaciones que expresaron constitutivamente la proteína VSP9B10A (VSP9B10A.pAC) o poblaciones de trofozoítos en los cuales se bloqueó su expresión [VSP9B10A(INV).pAC]. En los ensayos de interacción se emplearon tres modelos de células epiteliales: IEC-6, MDCK y CaCo-2/TC7. La población de trofozoítos que expresó constitutivamente la proteína VSP9B10A indujo la separación de las células de las monocapas y también del sustrato en los tres tipos celulares, produjo el incremento del flujo paracelular de dextrán en las monocapas de células CaCo-2 y la deslocalización de las proteínas de las uniones estrechas F-actina, ZO-1 y ocludina en estas células. La integridad de las monocapas que se incubaron con los trofozoítos que no expresaron a la VSP9B10A no presentó cambios. Por otro lado, después de la interacción de los trofozoítos VSP9B10A.pAC con las células epiteliales, se observaron cambios en el patrón de localización de esta proteína, un incremento en el número de transcritos *vsp9b10a* durante la interacción con las células epiteliales y se detectó una banda de proteólisis reactiva con el anticuerpo anti-VSP9B10A, en los sobrenadantes de cultivos provenientes de la interacción de células epiteliales con trofozoítos VSP9B10A.pAC.

Estos resultados permiten sugerir que la proteína VSP9B10A puede ser un factor de virulencia de *G. duodenalis*, ya que su expresión durante la interacción con las células epiteliales induce daños en las monocapas de células epiteliales. Estos últimos pueden deberse a la actividad proteolítica de la VSP9B10A que posee una secuencia similar a una cisteín proteasa.

## ABSTRACT

In this research work, it was proposed to analyze the effect of a *Giardia* trophozoite population that expresses the VSP9B10A antigen during its interaction with epithelial cell monolayers. Previously, it was reported that the VSP9B10A protein is released into the culture media during the interaction of trophozoites with IEC-6 cells and that this protein has an area of homology between residues 324-684 with cathepsin B, so this may have a role in the pathology of Giardiasis.

To determine its effect on epithelial cells, trophozoites of WB strain were transfected to obtain populations that stably expressed the protein (VSP9B10A.pAC) or a population in which its expression was blocked [VSP9B10A(INV).pAC]. These trophozoites populations were used in interaction assays with three epithelial cells models: IEC-6, MDCK and CaCo-2 / TC7. The population of trophozoites that constitutively expressed the VSP9B10A protein induced: the separation of the cells from the monolayers and from the substrate in the three cell types, increased paracellular dextran flux in the CaCo-2 monolayers and the delocalization of tight junctions proteins F-actin, ZO-1 and occluding in this cell line. The monolayers that were incubated with the populations that did not express the VSP9B10A protein remained unchanged.

In these assays changes were also observed in: the VSP9B10A protein localization pattern, the increase of the *vsp9b10a* transcripts during trophozoite-epithelial cell interaction and a proteolysis band reactive with the anti-VSP9B10A antibody that was detected in the supernatants from the interaction of VSP9B10A.pAC trophozoites with the epithelial cells.

These results suggest that the VSP9B10A protein may be a *Giardia* virulent factor since the trophozoite population that expresses it upon contact with the epithelial cells, induces damages in the structure of these cells. This effect is related to the release of this protein into the medium during the interaction with epithelial cells and it is possibly due to its sequence similarity to a cysteine protease.

## INTRODUCCIÓN

### ***Giardia*. Características generales**

#### **Historia y Taxonomía**

El descubrimiento de *Giardia* se atribuye al padre de la microbiología Anton van Leeuwenhoek quien describe a estos “animáculos” en muestras de enfermos con diarrea (Dobell, 1920); aunque en 1859, el doctor F. Lambl lo re-descubrió denominándolo *Cercomonas intestinalis*. El nombre con el que actualmente conocemos a este protozoo fue asignado por Kluster en 1879 (Adam, 2001). La caracterización subsecuente de *Giardia* a lo largo de 100 años propuso que esta infección tenía un carácter especie-específica considerando los reportes en los que se observó que distintas especies de este parásito infectaban exclusivamente a otros mamíferos además del humano (Adam, 2001). La clasificación formal de *Giardia* se inició históricamente con los trabajos de Francis P. Filice en 1952, quien basado en las diferencias morfológicas de la estructura denominada cuerpo medio de distintos aislados del parásito dividió a este género en tres especies *Giardia muris*; *G. duodenalis* y *G. agilis* las cuales se aislaron de ratones, humanos y anfibios respectivamente. A la par de los avances en el desarrollo de la microscopía, la clasificación de *Giardia* se amplió años después con tres nuevas especies denominadas *G.psittaci* aislada de aves, *G.ardeae* de garzas y *G. microti* aislada de ratas de campo; esto en base a las diferencias morfológicas en el disco ventral, el fleco ventrolateral y el quiste (Adam, 2001). Con los avances en técnicas de microscopía y en biología molecular en la década de los ochentas se estableció la clasificación taxonómica de *Giardia* en el Phylum Metamonada, Subphylum Trichozoa, Superclase Eopharyngia, clase Trepomonadea, subclase Diplozoa, orden Giardiida y Familia Giardiidae (Plutzer et al., 2010) y se situó como un eucarionte de divergencia temprana y el miembro más evolucionado de la familia Diplomonadida por su adaptación al parasitismo. Así mismo, la tipificación genética propuso su clasificación en un total de ocho ensamblajes: A, B, C, D, E, F, G y H (Plutzer et al., 2010) (**Tabla1**). La aplicación específica de estas técnicas al estudio de la especie *G. duodenalis* dio lugar a su separación en dos subgrupos genética y biológicamente distintos: los ensamblajes A y B, de los cuales el segundo crece de manera más lenta en cultivos *in vitro* en comparación con el primero.

**Tabla 1. Clasificación actual del género *Giardia*: Ensamblajes /genotipos y especies**

Ensamblaje	Especie	Hospedero
A Subtipos I y II	<i>Giardia intestinalis</i> ( <i>G. duodenalis</i> / <i>G. lamblia</i> / <i>G. enterica</i> )	Humanos, primates, perros, gatos, roedores y otros animales de vida libre
B Subtipos III y IV	<i>Giardia intestinalis</i> <i>G. agilis</i> , <i>G. muris</i> , <i>G. psittaci</i> , <i>G. ardeae</i>	Humanos, primates y perros Anfibios Roedores Aves Aves
C/D	<i>Giardia canis</i>	Perros
E	<i>Giardia bovis</i>	Ovejas, cabras y vacas
F	<i>Giardia cati</i>	Gatos
G	<i>Giardia simodi</i>	Roedores

Adaptado de (R., 2008)

Además se ha propuesto que existe una diferencia en la virulencia de estos ensamblajes pues existen reportes que relacionan al ensamblaje B (GS/M), que es el aislado más frecuente en las infecciones, con una sintomatología persistente mientras que en el caso del ensamblaje A se ha asociado con diarreas intermitentes (Homan and Mank, 2001; Karanis and Ey, 1998; Nash et al., 1987). Sin embargo, hasta la fecha esta asociación entre ensamblajes y sintomatología, esta sigue siendo controversial (Ajjampur et al., 2009; Al-Mohammed, 2011; Bertrand et al., 2005; El Basha et al., 2016; Eligio-Garcia et al., 2008; Foronda et al., 2008; Gelanew et al., 2007; Geurden et al., 2009; Haque et al., 2005; Laishram et al., 2012; Lebbad et al., 2008; Minvielle et al., 2008; Read et al.; Ryan and Caccio, 2013; Sahagun et al., 2008).

Un aspecto que ha creado controversia en esta clasificación y que ha sugerido la necesidad de realizar una nueva revisión a este género es la posible existencia de potencial zoonótico en los ensamblajes A y B mientras que el resto son especie-específicos (Covacin et al., 2011; Karanis and Ey, 1998; Lebbad et al., 2011b; Lee et al., 2017b; Palmer et al., 2008; Pallant et al., 2015; Piekarska et al., 2016; Plutzer et al., 2010; Ryan and Caccio, 2013). Otro problema que apoya la revisión de la clasificación de esta especie es el uso indistinto de los nombres *G. duodenalis*, *G. intestinalis* y *G. enterica*; razón por la cual algunos autores proponen que el

ensamblaje A debe ser agrupado en la especie *G. duodenalis* mientras que el B debe ser denominado *G. enterica* (Monis et al., 2009). Así mismo, existe alta variabilidad genética en *Giardia* y se han reportado nuevos sub-genotipos, esta variabilidad podría deberse a recombinación genética y a heterogeneidad alélica (Birky, 2010; Monis et al., 2009; Teodorovic et al., 2007; Thompson and Ash, 2016). Con base en estas evidencias se propuso una nueva clasificación (Lujan and Svärd, 2011)(**Tabla 2**).

**Tabla 2. Nueva propuesta de clasificación del género *Giardia***

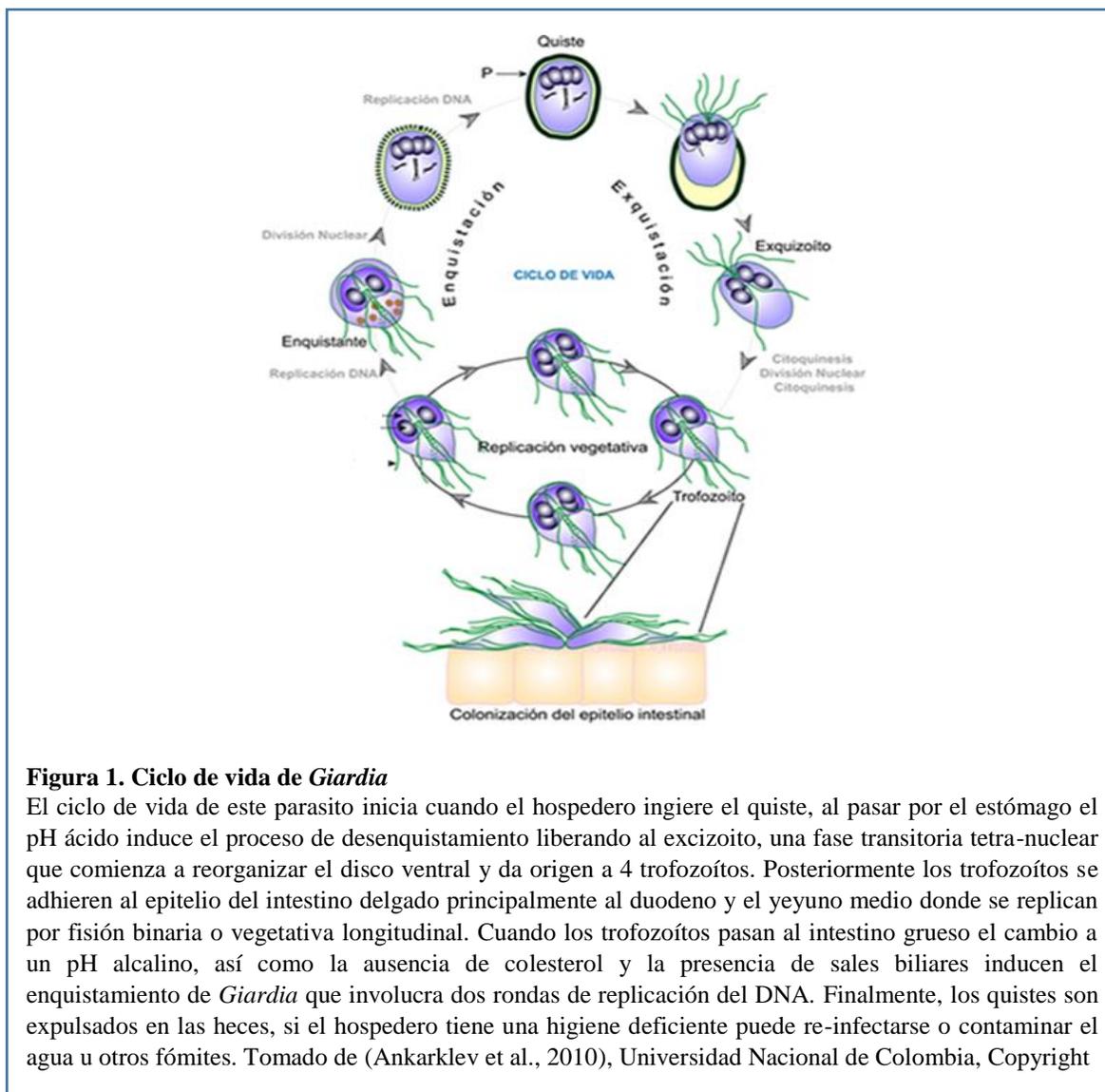
Espece propuesta	Genotipo	Hospedero	Características Morfológicas
<i>G. duodenalis</i>	Ensamblaje A	Varios mamíferos incluyendo el humano	Trofozoítos piriformes con cuerpo medio en forma de garra
<i>G. enterica</i>	Ensamblaje B	Humanos y otros primates, perros y algunos mamíferos de vida libre	Trofozoítos piriformes con cuerpo medio en forma de garra
<i>G. canis</i>	Ensamblaje C/D	Perros y otros canidos	Trofozoítos piriformes con cuerpo medio en forma de garra
<i>G. bovis</i>	Ensamblaje E	Ganado	Trofozoítos piriformes con cuerpo medio en forma de garra
<i>G. cati</i>	Ensamblaje F	Gatos	Trofozoítos piriformes con cuerpo medio en forma de garra
<i>G. simondi</i>	Ensamblaje G	Ratas	Trofozoítos piriformes con cuerpo medio en forma de garra
	Ensamblaje H	Mamíferos marinos	
<i>G. muris</i>		Roedores	Trofozoítos redondeados con un cuerpo medio pequeño y redondeado
<i>G. agilis</i>		Anfibios	Trofozoítos alargados con cuerpo medio en forma de bastón
<i>G. microti</i>		Roedores	Trofozoítos similares a <i>G. duodenalis</i> . El quiste contiene a los trofozoítos totalmente diferenciados
<i>G. ardeae</i>		Garzas	Trofozoítos redondeados con una muesca en el disco ventral y un flagelo caudal rudimentario. El cuerpo medio tiene forma redondeada
<i>G. psittaci</i>		Aves	Trofozoítos piriformes con cuerpo medio en forma de garra. No posee fleco ventrolateral

Adaptado de (Lujan and Svärd, 2011; Monis et al., 2009)

## Ciclo de vida y descripción de estadios

El ciclo de vida de *Giardia* es directo; se caracteriza por dos estadios o etapas de diferenciación del parásito y por no requerir un hospedero intermediario. Este parásito es uno de los pocos cuyo ciclo completo puede replicarse *in vitro* (Gillin et al., 1989). Comienza cuando el estadio latente el quiste entra por vía oral a un hospedero donde se desenquista a nivel intestinal dando lugar a una forma transitoria llamada excizoito que se diferencia y da lugar a dos trofozoítos, el estado vegetativo de este parásito. A través de un proceso de enquistamiento, el trofozoíto deja el ciclo celular y entra en un programa de diferenciación para dar lugar al quiste, el estado de resistencia que le permite sobrevivir en un ambiente con condiciones adversas. El ciclo se completa cuando el quiste es ingerido de nuevo por un hospedero.

El proceso de desenquistamiento inicia cuando el quiste llega al estómago del hospedero donde las condiciones de acidez del tracto digestivo inducen la ruptura de su pared. El primer estímulo acontece al entrar en contacto con los jugos digestivos, cuando el quiste detecta altas concentraciones de iones hidrogeno seguido por el pH ligeramente alcalino de la primera porción del intestino delgado. En este sitio las proteasas y la presencia de nutrientes favorecen la exocitosis de componentes prefabricados del parásito como hidrolasas, fosfatasa y proteasas que actúan sobre la pared del quiste liberando por uno de sus polos al excizoito, una forma transitoria inmadura tetranucleada que posee flagelos cortos. En general este proceso se lleva a cabo de manera tan rápida que no existe tiempo para la transcripción y traducción de nuevas proteínas, por lo tanto, una respuesta rápida a los estímulos de desenquistamiento y la existencia de las estructuras del citoesqueleto preformadas son esenciales para la colonización de los trofozoítos. Se ha reportado que la cinasa A y vías de señalización de calcio inician el proceso de desenquistamiento (Carranza and Lujan, 2010). En este proceso son esenciales los cuatro pares de flagelos que se encuentran intactos dentro del quiste ya que movimiento de estos permite que concluya la liberación del excizoito del quiste. Otro componente fundamental en el desenquistamiento es el disco adhesivo; los fragmentos de esta estructura que están almacenados en el quiste se ensamblan rápidamente permitiéndole al trofozoíto adherirse a su célula blanco (Carranza and Lujan, 2010)



**Figura 1. Ciclo de vida de *Giardia***

El ciclo de vida de este parásito inicia cuando el hospedero ingiere el quiste, al pasar por el estómago el pH ácido induce el proceso de desenquistamiento liberando al excizoito, una fase transitoria tetra-nuclear que comienza a reorganizar el disco ventral y da origen a 4 trofozoítos. Posteriormente los trofozoítos se adhieren al epitelio del intestino delgado principalmente al duodeno y el yeyuno medio donde se replican por fisión binaria o vegetativa longitudinal. Cuando los trofozoítos pasan al intestino grueso el cambio a un pH alcalino, así como la ausencia de colesterol y la presencia de sales biliares inducen el enquistamiento de *Giardia* que involucra dos rondas de replicación del DNA. Finalmente, los quistes son expulsados en las heces, si el hospedero tiene una higiene deficiente puede re-infectarse o contaminar el agua u otros fómites. Tomado de (Ankarklev et al., 2010), Universidad Nacional de Colombia, Copyright

Los excizoitos tienen una forma oval y cuatro núcleos que rápidamente entra en dos rondas de citocinesis y concluye la cariocinesis dando lugar a cuatro trofozoítos binucleados en 15 a 30 minutos después de su liberación. Los trofozoítos maduros colonizan el duodeno y el yeyuno medio en un lapso de 6 a 8 horas después de la ingestión de los quistes. La liberación de estos cuatro trofozoítos así como su reproducción por fisión binaria longitudinal parece ser la explicación de la baja dosis infectiva de *Giardia*, 10 quistes (Rendtorff and Holt, 1954).

Una vez adherido el trofozoíto al epitelio intestinal, éste necesita tomar nutrientes del medio así como colesterol y un pH ácido para proliferar; si el pH se torna alcalino y el colesterol está restringido por la producción de sales biliares, condiciones propias de la parte distal del

intestino delgado, se inducen vías de señalización que inician el proceso de enquistamiento (Arguello-Garcia et al., 2009). El enquistamiento es el proceso por el cual el trofozoíto se diferencia de un estado activo a uno latente este involucra un drástico desensamblaje de estructuras tales como el citoesqueleto, los flagelos y el disco adhesivo, la construcción de otras como el aparato de Golgi-Like y la pared del quiste así como la disminución del metabolismo del parásito y dos rondas de síntesis de DNA que producen en primer lugar una forma binucleada 16N, y en la siguiente división cuatro núcleos 4N y que tiene como objetivo final producir una pared que encapsule al trofozoíto y le brinde protección contra el ambiente (Carranza and Lujan, 2010).

En la fase G2 del ciclo celular, en el que se ha replicado el material genético y las estructuras celulares, los trofozoítos entran en el proceso de enquistamiento (Reiner et al., 2008). El proceso de enquistamiento puede dividirse en tres pasos: el primero es la estimulación, que comprende la recepción del estímulo la transmisión de la señal al núcleo y la expresión de los genes específicos del enquistamiento; el segundo paso incluye la síntesis de los componentes de la pared del quiste, la biogénesis de los organelos secretorios (Golgi-like) y el transporte de los componentes de la pared celular hacia la membrana del parásito y el tercer paso que involucra la exocitosis de las vesículas específicas del enquistamiento (ESV) y el ensamblaje de la pared (Carranza and Lujan, 2010).

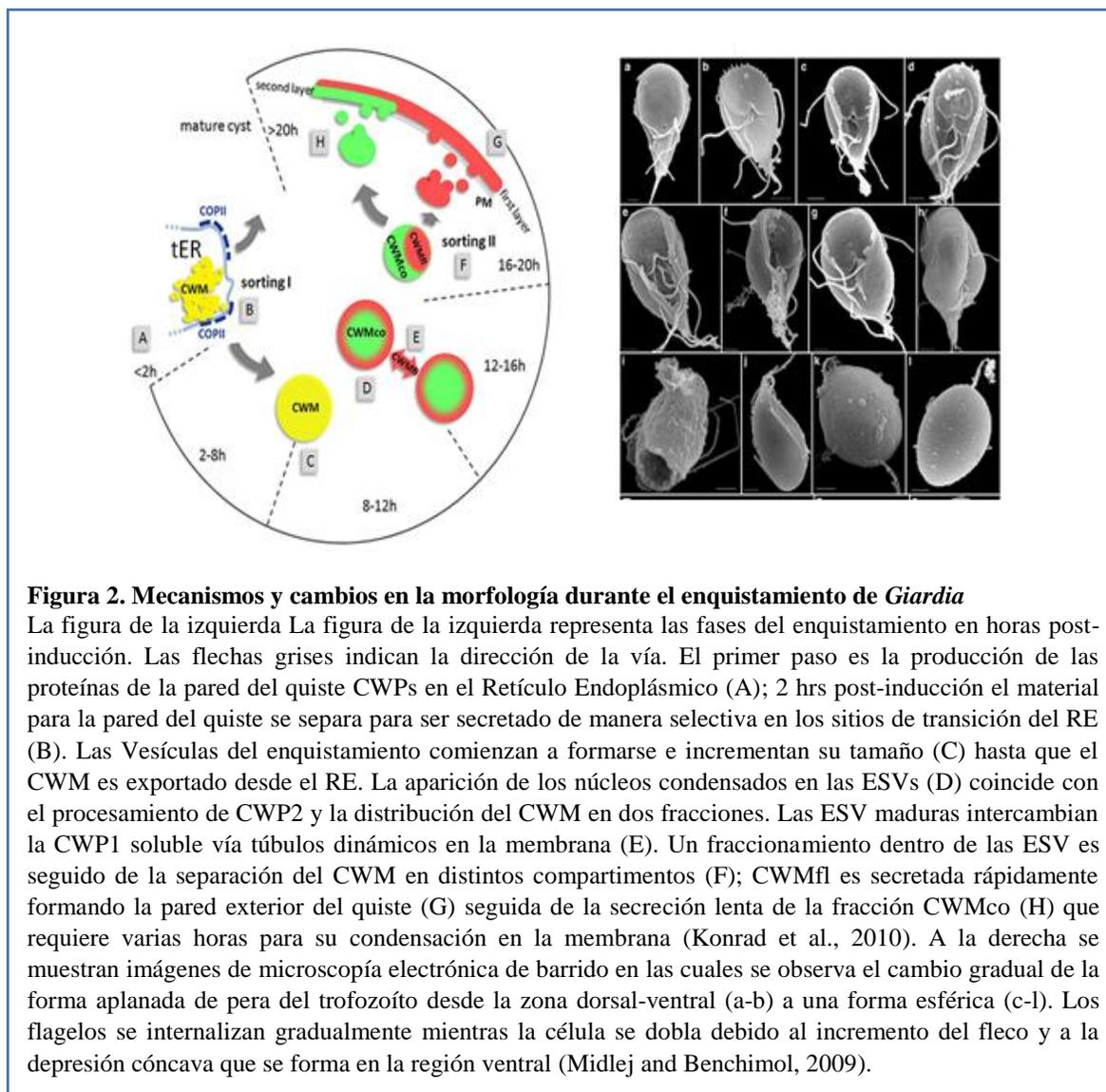
En los análisis *in vitro* de este proceso se ha determinado que la privación de colesterol es el estímulo necesario para que se inicie el proceso de diferenciación. Se cree que esto se debe a que *in vivo*, en el intestino del hospedero específicamente en el duodeno, la concentración de colesterol es baja en comparación con las del íleon y el yeyuno y ya que *Giardia* no puede sintetizar lípidos, la detección de la disminución de su principal fuente de síntesis es suficiente para iniciar la señalización. Aunque no se ha establecido el mecanismo por el cual el trofozoíto detecta el cambio en la concentración de este lípido, algunos autores creen que es el cambio en la fluidez de la membrana debido a la pérdida de colesterol lo que modifica la actividad de receptores y lleva a la transcripción de los genes específicos del enquistamiento (Carranza and Lujan, 2010).

El análisis del transcriptoma del parásito durante el proceso de enquistamiento ha mostrado que solo 18 genes se encuentran sobre-expresados durante la etapa temprana de este proceso e incluyen los genes de las proteínas de la pared del quiste (CWPs 1-3), el factor de

transcripción Myb2 y los genes de la ruta de síntesis de carbohidratos (Morf et al., 2010). En estudios realizados en el parásito se ha determinado que la vía de señalización que se induce cuando el trofozoíto es expuesto a sales biliares (las sales biliares primarias como el colato y el quenodesoxicolato muestran mayor eficacia de inducción) es la vía de las MAP cinasas, Raf1/MEK1/ERK1 donde la cinasa ERK1 activa los cuatro factores de transcripción de *Giardia* involucrados en el proceso de enquistamiento: SREBP que activa la biogénesis y la biosíntesis de precursores del homopolímero N-acetilgalactosamina, el principal componente de la pared del quiste; gGLP1 y gARID1 los cuales actúan sobre el promotor de gen de la proteína CWP1 y por último el factor de transcripción gMyb2 que actúa en el promotor de los genes de las proteínas CWP1-3y G6P1 (Arguello-Garcia et al., 2009). Myb2 es considerado el factor de transcripción “maestro” de este proceso pues induce la transcripción de los dos principales componentes de la pared del quiste: las proteínas CWPs 1-3 y los monómeros de carbohidratos UDP-GalNAc que formarán el homopolímero de N-acetilgalactosamina denominado “giardano” este constituye el 60% de la pared del quiste mientras que el 40 % restante lo compone las proteínas CWPs (Karr and Jarroll, 2004).

Las proteínas CWPs son proteínas ácidas con un extremo N-terminal hidrofóbico, una región central de cinco repetidos de leucina en el caso de CWP 1 y 2 y de cuatro repetidos completos y uno incompleto en CWP3, implicados en la interacción proteína-proteína y un extremo C-terminal compuesto de repetidos ricos en cisteína (Elias E, 2008). La acumulación de estas proteínas en el retículo endoplásmico induce la formación de vesícula específicas de enquistamiento (ESV's) las cuales pasan de estructuras individuales, en la fase temprana del enquistamiento a una red vesicular, trans-Golgi durante la fase tardía (Stefanic et al., 2009) donde se llevan a cabo modificaciones postraduccionales como puentes disulfuro, unión de isopéptidos y de grupos fosfato que son importantes para el ensamblaje de la pared del quiste (Davids et al., 2004; Reiner et al., 2001; Slavin et al., 2002).

*In vivo* la presencia de estas vesículas en el citoplasma del trofozoíto es la primera manifestación morfológica del enquistamiento en tanto que *in vitro* lo es la pérdida de su capacidad de adhesión y el cambio morfológico hacia una forma redonda u ovalada. Las ESV contienen el material que formará la pared del quiste (CWM), este material se polimeriza rápidamente después de su secreción, de tal manera que forma la pared (CW) que recubre al parásito 20 a 24 horas post- inducción *in vitro* (Carranza and Lujan, 2010).



**Figura 2. Mecanismos y cambios en la morfología durante el enquistamiento de *Giardia***

La figura de la izquierda representa las fases del enquistamiento en horas post-inducción. Las flechas grises indican la dirección de la vía. El primer paso es la producción de las proteínas de la pared del quiste CWPs en el Retículo Endoplásmico (A); 2 hrs post-inducción el material para la pared del quiste se separa para ser secretado de manera selectiva en los sitios de transición del RE (B). Las Vesículas del enquistamiento comienzan a formarse e incrementan su tamaño (C) hasta que el CWM es exportado desde el RE. La aparición de los núcleos condensados en las ESVs (D) coincide con el procesamiento de CWP2 y la distribución del CWM en dos fracciones. Las ESV maduras intercambian la CWP1 soluble vía túbulos dinámicos en la membrana (E). Un fraccionamiento dentro de las ESV es seguido de la separación del CWM en distintos compartimentos (F); CWMfl es secretada rápidamente formando la pared exterior del quiste (G) seguida de la secreción lenta de la fracción CWMco (H) que requiere varias horas para su condensación en la membrana (Konrad et al., 2010). A la derecha se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido en las cuales se observa el cambio gradual de la forma aplanada de pera del trofozoíto desde la zona dorsal-ventral (a-b) a una forma esférica (c-l). Los flagelos se internalizan gradualmente mientras la célula se dobla debido al incremento del fleco y a la depresión cóncava que se forma en la región ventral (Midlej and Benchimol, 2009).

El mRNA de las proteínas CWP tiene su mayor expresión 7 horas post- inducción y el exporte de proteínas desde el retículo endoplásmico a las vesículas ocurre después de 8 a 10 horas de la post inducción *in vitro*. Antes de la excreción del material de la pared del quiste éste es fraccionado en dos porciones: la fracción fluida (CWMfl) formada por CWP3 y un segmento de CWP2 que sufre un proceso proteolítico y el núcleo (Como) constituido por CWP1 y el extremo C-terminal de CWP2. La secreción de la fracción fluida se completa en pocos minutos y ocurre de manera simultánea a la reabsorción de flagelos, el desensamblaje del disco suctor y la división nuclear lo que provee estabilidad estructural al parásito.

El núcleo formado por CWP3 y CWP2 crea la capa final del quiste; durante este proceso la proteína SNARE es la que media la fusión de estas vesículas a la membrana plasmática (Carranza and Lujan, 2010; Konrad et al., 2010). Una vez formado el quiste, el cual ya no es adherente, es expulsado del intestino por los movimientos peristálticos y evacuado en las heces. Si no existe una higiene adecuada, estos pueden ser ingeridos de nuevo vía oral o contaminar agua y comida, reiniciando de esta manera el ciclo de vida de *Giardia*. Finalmente, la protección ofrecida por el quiste le permite a este parásito sobrevivir por largos periodos de tiempo y resistir tratamientos químicos que otros organismos no resisten.

### **Estadio vegetativo: Características morfológicas y biológicas del trofozoíto**

El trofozoíto de *Giardia* es el estadio que sobrevive y prolifera en las condiciones que prevalecen en el intestino delgado del hospedero. Este es microaerófilico y se caracteriza por su apariencia piriforme de aproximadamente 12-15  $\mu\text{m}$  de longitud y 5 a 7  $\mu\text{m}$  de ancho y 1 a 2  $\mu\text{m}$  de grosor (Carranza and Lujan, 2010). El trofozoíto presenta dos núcleos ovalados, los cuales son transcripcionalmente activos, con apariencia de halo y con sus respectivos nucléolos donde existe la maquinaria mínima para la biogénesis de ribosomas que incluye el reclutamiento del rDNA, el procesamiento del rRNA y la maquinaria de ensamblaje del ribosoma. En la parte ventral del parásito se encuentran dos estructuras necesarias para adherirse al epitelio intestinal: el disco adhesivo el flagelo ventrolateral la zona vacía y el cuerpo medio. Además posee ocho cuerpos basales con sus respectivos cuatro pares de flagelos distribuidos en los pares anteriores, posterolaterales, ventrales y caudales que le confieren diferentes direcciones en su motilidad (Adam, 2001; Midlej and Benchimol, 2009). En el trofozoíto también se encuentran vesículas periféricas cercanas a la membrana y mitosomas que se agrupan de manera lineal entre el núcleo pero también se encuentran dispersos en el citoplasma (Adam, 2001). A continuación, se describen de manera más detalladas las estructuras y mecanismos biológicos del trofozoíto de *Giardia*.

**Los núcleos** de este parásito son dos estructuras ovaladas diploides (2N) de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro (Carranza and Lujan, 2010). Ambas copias se replican y se segregan por citocinesis durante cada ronda del ciclo celular (Ghosh et al., 2001); al respecto los estudios más recientes de microscopía electrónica sobre la mitosis en *Giardia* han mostrado que el

disco ventral y los cuerpos basales dirigen este proceso (Carranza and Lujan, 2010). Aunque los núcleos parecen similares se han reportado diferencias entre ellos como la asincronía en el inicio de la replicación así como diferencias morfológicas y en el número de poros nucleares, esto último sugiere una actividad fisiológica distinta entre ellos (Benchimol, 2004; Carranza and Lujan, 2010; Wieseahn et al., 1984). Así mismo recientemente se evidenció que el RNA pequeño (snoRNA) que es un precursor del micro RNA miR2 se localiza mayoritariamente en uno de los núcleos (Saraiya and Wang, 2008).

**El nucléolo** es la región especializada del núcleo donde el rRNA se sintetiza y procesa, así como el lugar donde las subunidades del ribosoma son ensambladas. En *Giardia* esta región es un compartimento intra-nuclear de 0.2 a 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro; es de naturaleza fibrogranular y fue localizada utilizando los marcadores específicos 16sRNA, fibrilarina, CBF5 y la rRNA pseudouridin sintetasa así como microscopía electrónica de barrido (Carranza and Lujan, 2010; Jimenez-Garcia et al., 2008; Tian et al., 2010).

**El disco ventral** o adhesivo es una estructura cóncava constituida por capas paralelas de microtúbulos de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina, que asemejan una espiral y es distinta entre especies (Midlej and Benchimol, 2009). Esta se encuentran perpendicularmente unida al citoplasma por estructuras de microcintas (Dawson, 2010), las espirales se unen en las puntas creando un área circular que carece de proteínas del citoesqueleto de manera que forman el área vacía en el centro del disco suctor. En esta área se concentran vesículas, por lo que se considera que es una región especializada en procesos de endocitosis y exocitosis y en el intercambio entre el parásito y el hospedero (Lanfredi-Rangel et al., 1999). En general al disco suctor se le considera un factor de virulencia del parásito ya que es necesaria para que el trofozoíto se adhiera a las células intestinales. El fleco ventrolateral, la cresta ventrolateral y el área vacía secuencialmente hacen contacto con el epitelio durante la adhesión del trofozoíto (Hagen et al., 2011).

**La cresta lateral** se localiza en el borde exterior del disco ventral. Cuando el trofozoíto se adhiere al epitelio intestinal a través del disco ventral la cresta se proyecta hacia abajo generando una especie de marca en la superficie epitelial cuando el trofozoíto es removido, parecida a la herradura de un caballo (Palm et al., 2005).

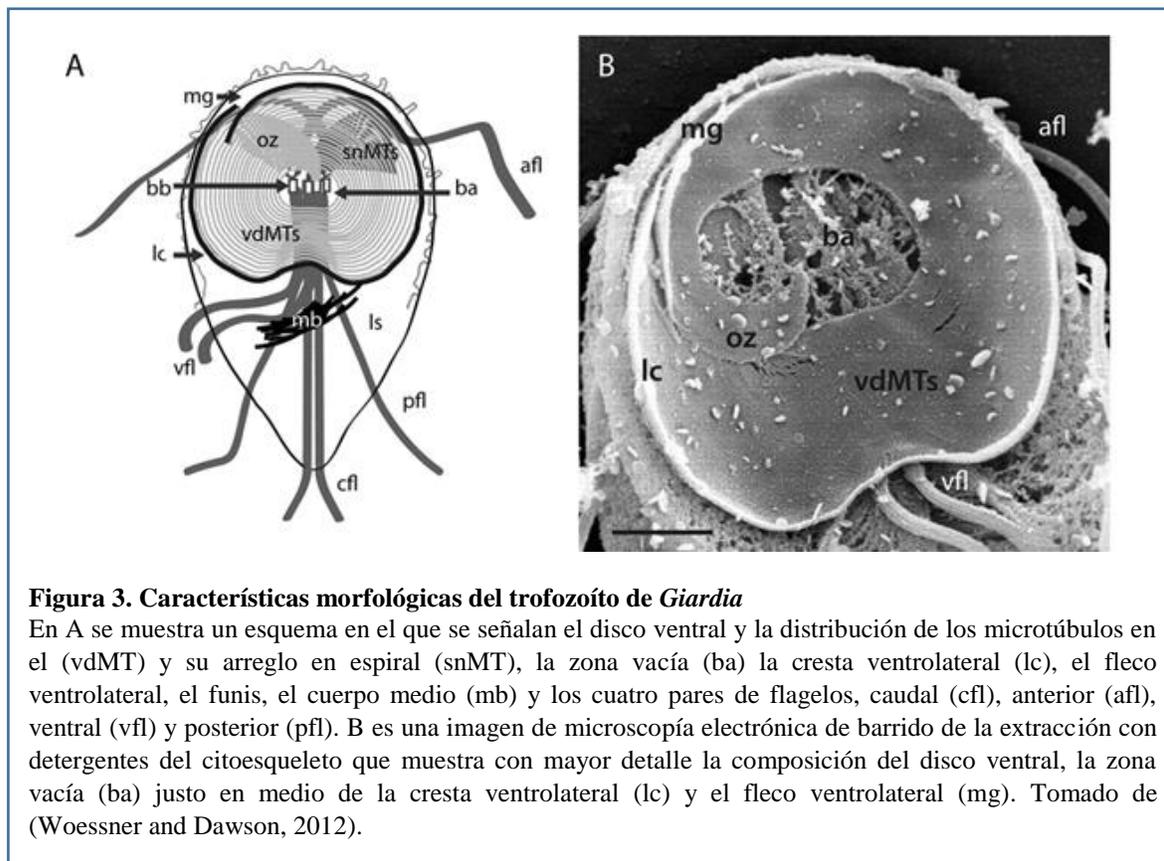
**El cuerpo medio** es una estructura en forma de coma que varía de forma y grosor entre especies. Se localiza de manera transversal en la parte baja del disco ventral y perpendicular al eje central del trofozoíto; está formado por 1 a 6 pequeñas estructuras de microtúbulos que varían en su forma asociadas a cinasas regulatorias como la aurora quinasa y ERK1. Este se conecta a la membrana plasmática, el disco ventral y el flagelo caudal (Davids et al., 2008; Ellis et al., 2003). Funcionalmente el cuerpo medio es una estructura dinámica que constituye el mayor centro organizador de microtúbulos y es la fuente para ensamblar el disco ventral después de la mitosis además de que su presencia está coordinada con el ciclo celular (Crossley et al., 1986). Así mismo, la ausencia del cuerpo medio en algunos trofozoítos y su presencia diferencial en los estadios de *Giardia* parece indicar que funciona como un almacenamiento temporal de tubulina (Piva and Benchimol, 2004).

**El funis** es otra estructura en *Giardia* constituida por un arreglo de microtúbulos cortos interconectados en forma de bandas, los cuales se encuentran anclados al flagelo posterolateral y a la membrana celular y asociados dorsal y ventralmente con los axonemas del flagelo caudal. Lo anterior ha llevado a postular que funciona como una especie de caja torácica donde junto con los axonemas permite la flexión dorsal y con ello el desprendimiento del trofozoíto del epitelio intestinal (Carranza and Lujan, 2010; Ghosh et al., 2001; Midlej and Benchimol, 2009).

**Los flagelos** tienen su origen en los cuerpos basales y son estructuras que participan en la liberación del trofozoíto del quiste y le permiten migrar al sitio que colonizarán y en el cual completarán la citocinesis. Los ocho flagelos de *Giardia* están organizados en cuatro pares (9+2 microtúbulos en cada arreglo) que difieren en su patrón de golpes y longitud del axonema (Dawson and House, 2010). En el caso del flagelo ventral se ha propuesto que el ritmo de su ondulamiento provee una presión negativa que permite al disco suctor adherirse al epitelio (Holberton, 1973) aunque otros estudios indican que no parece ser prioritario en la adhesión (House et al., 2011). En tanto el flagelo caudal ha sido involucrado junto con el funis en la flexión dorsal de trofozoíto. Recientemente se reportó que los flagelos tienen un papel central en la división celular al dirigir a las células hijas en direcciones opuestas durante la citocinesis (Hardin et al., 2017).

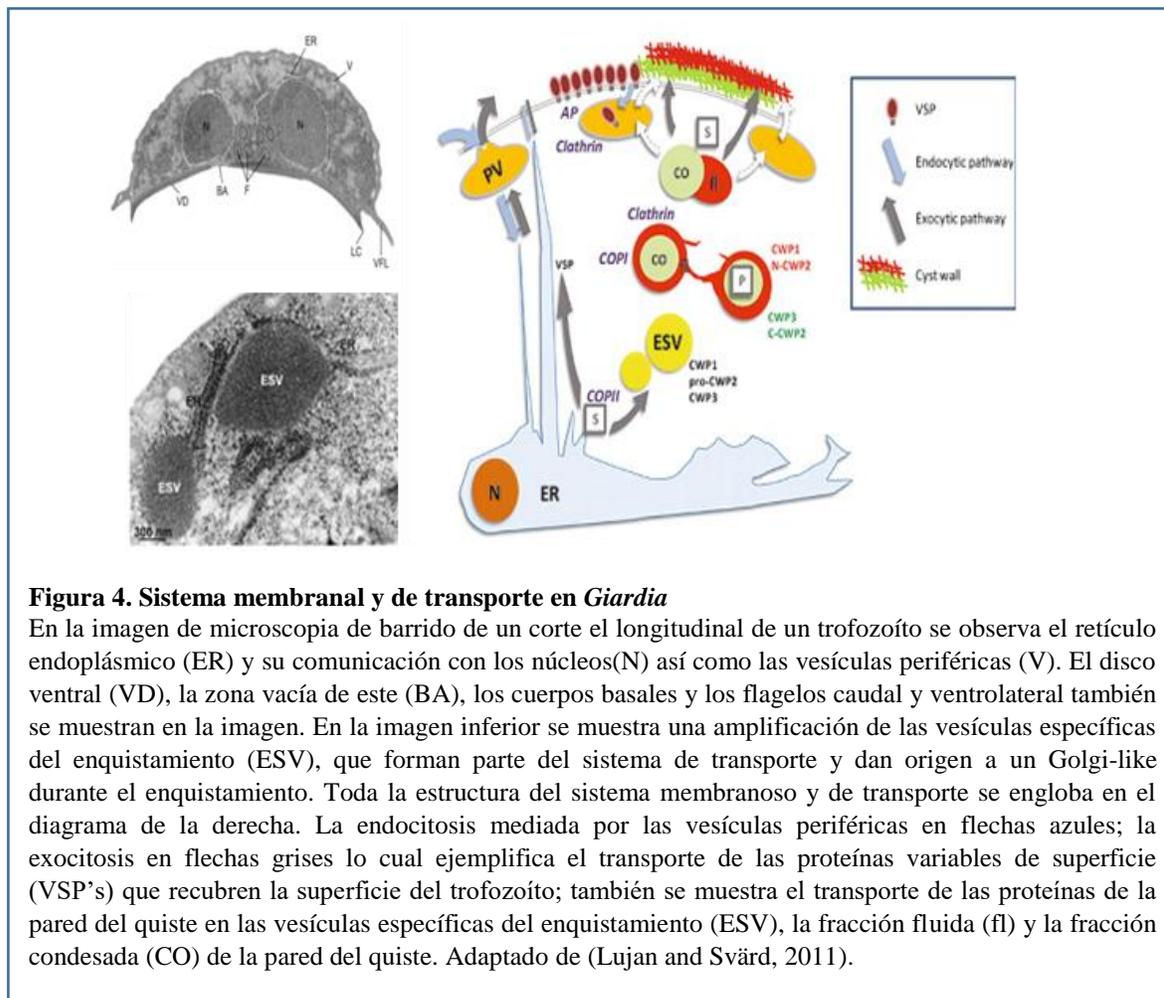
En general **el citoesqueleto** que forma las estructuras antes descritas está basado en microtúbulos, pero también se encuentra integrado por proteínas específicas de *Giardia* como

las  $\alpha$ -giardinas, Nek cinasas, proteínas con repetidos de anquirina, asamblinas de fibras estriadas (SALP-1,  $\beta$  y  $\delta$  giardina) y las más características y altamente inmunogénicas las  $\gamma$ -giardinas que constituyen el disco ventral. El citoesqueleto carece de miosina y además está conformado por proteínas que son altamente divergentes de las proteínas de unión a actina (Nohria et al., 1992; Palm et al., 2005).



El trofozoíto de *Giardia* posee **un sistema de tráfico membranal** muy distinto al de eucariontes superiores pues se encuentra reducido y representa una adaptación a la vida parasitaria. Esta estructura inicia en la membrana externa de los núcleos y se prolonga al retículo endoplásmico sin que exista un aparato de Golgi característico aunque el retículo endoplásmico funciona como un Golgi-like, ya que posee una estructura básica de transporte de vesículas, endosomas y lisosomas, que incluye a las moléculas clatrin, coatómeros (COP) I y II, ARF, dos complejos de proteínas adaptadoras AP1, un receptor sensible a factores de adhesión (SNARE) y Rab, siendo estas últimas dos moléculas factores claves para

procesos de fusión de membranas (Arguello-Garcia et al., 2009). En esta estructura también se lleva a cabo la maduración de proteínas sin embargo *Giardia* posee un sistema de glicosilación rudimentario que involucra la adición de N-acetil glucosamina vía enlaces Asn u O sin necesidad de un sistema con control de calidad (Ratner et al., 2008).

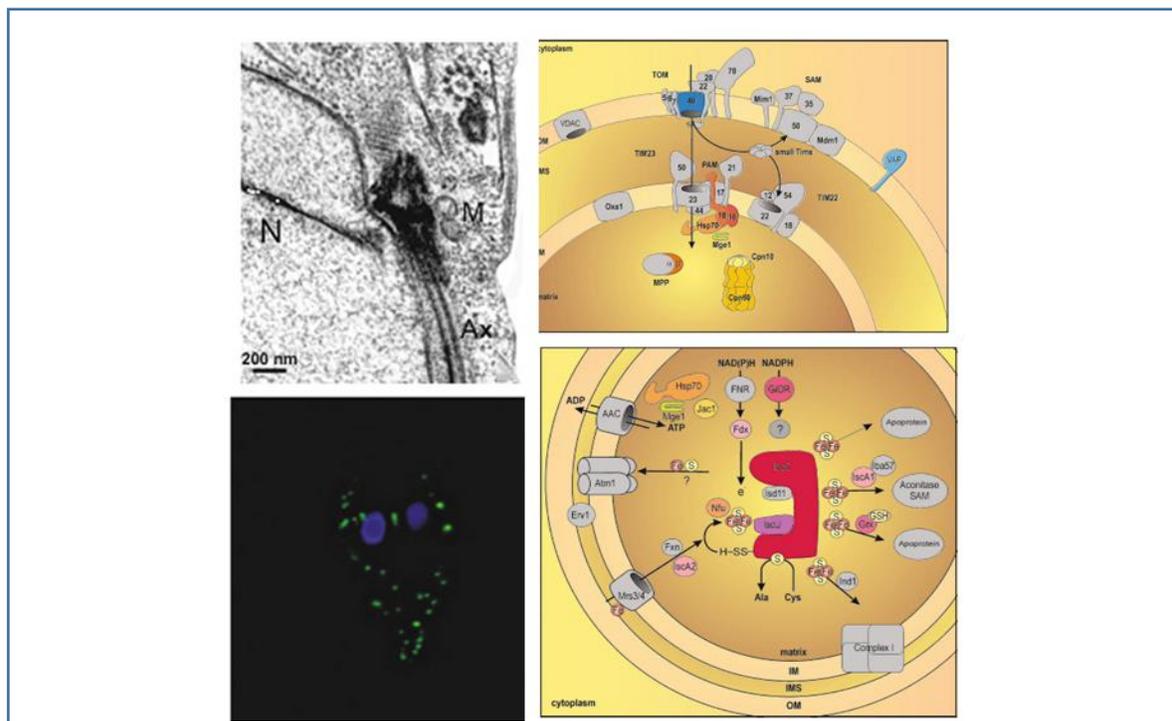


**Figura 4. Sistema membranar y de transporte en *Giardia***

En la imagen de microscopia de barrido de un corte el longitudinal de un trofozoíto se observa el retículo endoplásmico (ER) y su comunicación con los núcleos(N) así como las vesículas periféricas (V). El disco ventral (VD), la zona vacía de este (BA), los cuerpos basales y los flagelos caudal y ventrolateral también se muestran en la imagen. En la imagen inferior se muestra una amplificación de las vesículas específicas del enquistamiento (ESV), que forman parte del sistema de transporte y dan origen a un Golgi-like durante el enquistamiento. Toda la estructura del sistema membranoso y de transporte se engloba en el diagrama de la derecha. La endocitosis mediada por las vesículas periféricas en flechas azules; la exocitosis en flechas grises lo cual ejemplifica el transporte de las proteínas variables de superficie (VSP's) que recubren la superficie del trofozoíto; también se muestra el transporte de las proteínas de la pared del quiste en las vesículas específicas del enquistamiento (ESV), la fracción fluida (fl) y la fracción condesada (CO) de la pared del quiste. Adaptado de (Lujan and Svärd, 2011).

Los **mitosomas** son remanentes mitocondriales que han sido identificados en *Giardia*, los cuales se distribuyen principalmente en un arreglo lineal a lo largo de los cuerpos basales, entre los núcleos, así como aleatoriamente en el citoplasma existiendo entre 40 y 50 en cada parásito (Martincova et al., 2015; Regoes et al., 2005). Estas pequeñas estructuras, de 140x70 nm, de doble membrana no tienen genoma; están compuestas por el centro flavina-hierro-sulfuro involucrado en el sistema de transporte de electrones y la maduración de proteínas

(IscU y ferredoxina) sin embargo, no son productores de ATP (Einarsson et al., 2016; Tovar et al., 2003). La maquinaria de importación en el mitosoma se encuentra reducida; solamente se han identificado en la membrana externa a TOM40 y en la membrana interna a pam 16 y pam 18; otras proteínas identificadas son las chaperoninas 60 y 10 así como mtHSP70 y co-chaperonas GrpE y Jac-1 (Dolezal et al., 2005; Jedelsky et al., 2011; Regoes et al., 2005). Recientemente se reportó que estos organelos no se fusionan, que su división esta sincronizada con la mitosis y que de manera similar a la mitocondria están conectados con el retículo endoplásmico. Además, se mostró que el quiste contiene dos conjuntos de estos organelos (Voleman et al., 2017).



**Figura 5. Características morfológicas y estructurales del mitosoma de *Giardia***

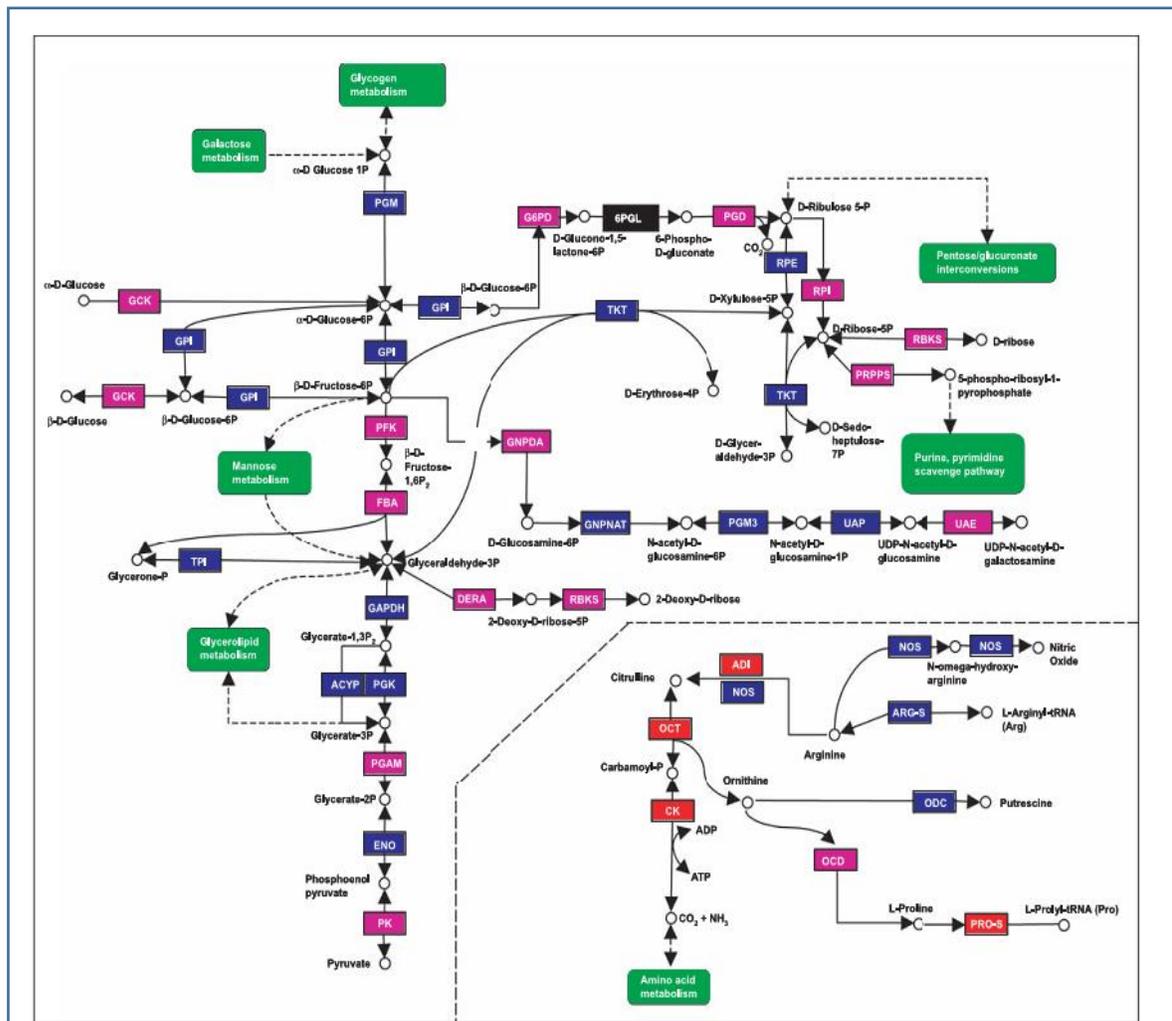
En la imagen superior izquierda se muestra una microscopia de barrido de los mitosomas centrales *Giardia* (M) y su proximidad con uno de los núcleos (N). En el panel inferior se muestra un trofozoíto en el cual se han teñido los mitosomas mediante inmunofluorescencia indirecta contra la proteína UsF, en esta se aprecia la distribución tanto central como periférica de los mitosomas. El esquema superior derecho muestra las proteínas del sistema de transporte del mitosoma cuyos genes han sido identificados en *Giardia* (en color) haciendo énfasis en la reducción de la maquinaria de importación al compararla con la presente en la mitocondria (en gris). La misma reducción se evidencia en la maquinaria de ensamblaje del centro hierro-azufre donde las proteínas identificadas hasta el momento también se muestran en color y las presentes en la mitocondria en gris. Adaptado de (Lujan and Svärd, 2011).

**Las vesículas periféricas** en *Giardia* cumplen la función de lisosomas o peroxisomas los cuales se no se han descrito en este parásito. En el área vacía y la periferia dorsal se encuentran una gran cantidad de estas vesículas las cuales participan en la endocitosis y exocitosis y pueden tornarse acidas y adquirir características de un lisosoma con actividad proteolítica y de hidrolasa; además se encuentran en comunicación con el retículo con lo que el material endocitado es transportado al interior de la célula. Por otro lado, también se ha demostrado la secreción de proteínas en este parásito se da de manera convencional a través de un péptido señal en el extremo amino terminal o como en el caso de las proteínas Variables de Superficie (VSPs), por una señal presente en el tallo citoplasmático conservado que lleva al tránsito por el citoplasma a través del retículo, aunque la liberación de enzimas metabólicas ocurre por una vía de exportación no convencional (Ringqvist et al., 2008).

Así como los organelos de *Giardia* sufren reducción como una adaptación para llevar a cabo exitosamente un estilo de vida parasítico, este eucarionte también se caracteriza por tener vías metabólicas severamente restringidas; esta particularidad fue determinada mediante la secuenciación de su genoma (Morrison et al., 2007). En general este parásito es dependiente de los lípidos del hospedero y del rescate de las vías de las pirimidinas y purinas. Además, la singularidad de ser un eucarionte de divergencia temprana se hace evidente con la presencia de genes que codifican para proteínas metabólicas de bacterias y arqueas las cuales son los componentes mayoritarios en los sistemas metabólicos y de desintoxicación de *Giardia* (Morrison et al., 2007).

**Metabolismo energético:** El trofozoíto de *Giardia* toma del lumen intestinal de manera pasiva, metabolitos como glucosa y arginina mediante fagocitosis y pinocitosis, los cuales representan su mayor fuente de energía; los carbohidratos son catabolizados mediante la vía de Embden-Meyerhof y la vía de las hexosas monofosfato generando como productos finales etanol, acetato y CO<sub>2</sub> mientras que las reservas son almacenadas en forma de glucógeno sin embargo estas vías son dependientes de la disposición de oxígeno (Adam, 2001; Schofield et al., 1991) y debido a que *Giardia* se ha adaptado a condiciones microaerófilas donde el oxígeno, el último aceptor de electrones de la fosforilación oxidativa esta severamente restringido, esta vía no es la prioritaria para la obtención de energía. *Giardia* recurre a la vía de la arginina hidrolasa (ADH) en la cual la descomposición del aminoácido arginina genera cuatro veces más ATP que cantidades equimolares de glucosa (Schofield et al., 1990;

Schofield et al., 1992). Las enzimas encargadas de catabolizar a la arginina son ADI (arginina deaminasa), OCT (ornitina carbamoil transferasa), CK (carbamato cinasa) y ornitina descarboxilasa cuyo producto final es una molécula de ATP, CO<sub>2</sub> y amonio (Schofield et al., 1992). Las enzimas ADI y OCT son liberadas por el trofozoíto hasta el lumen intestinal durante la interacción de este con el hospedero, estableciendo una competencia por la arginina y a la vez bloqueando la producción de óxido nítrico, un potente agente anti-giardia y una de las primeras líneas de defensa contra la colonización del parásito (Ringqvist et al., 2008).



**Figura 6. Vías metabólicas identificadas en *Giardia***

En el esquema se muestran el metabolismo de la glucosa, pentosa fosfato y arginina en *Giardia*. El código de color muestra las enzimas similares con Archeas en rojo, con bacterias en púrpura y con eucariontes en azul. En negro aquellas que no tienen homología. Tomado de (Morrison et al., 2007).

**Metabolismo de aminoácidos, lípidos y nucleótidos:** *Giardia* tiene una habilidad limitada para sintetizar aminoácidos *de novo* por lo que los obtiene del espacio extracelular vía transporte activo o difusión. Principalmente existe una alta demanda de cisteína debido a la abundancia de este aminoácido en las proteínas Variables de Superficie, uno de los principales antígenos del parásito, así como por su actividad como agente reductor que funciona como protección contra el daño inducido por especies reactivas de oxígeno (Einarsson et al., 2016; Jerlstrom-Hultqvist, 2012; Mastronicola et al., 2016; Morrison et al., 2007).

En cuanto a la síntesis de ácidos grasos y lípidos, estudios recientes han demostrado que *Giardia* puede sintetizar algunos de ellos. Además, se ha reportado que el metabolismo de esfingolípidos es regulado durante la diferenciación celular y es crítico para el enquistamiento (Jarroll et al., 1981; Sonda et al., 2008; Yichoy et al., 2011). El metabolismo de nucleótidos también es limitado en *Giardia* pues solo están presente las vías para obtener pirimidinas y purinas y debido a la falta de ribonucleósidos reductasa necesita las rutas de salvamento de desoxinucleósidos vía desoxinucleósidasas (Adam, 2001; Laoworawit et al., 1993).

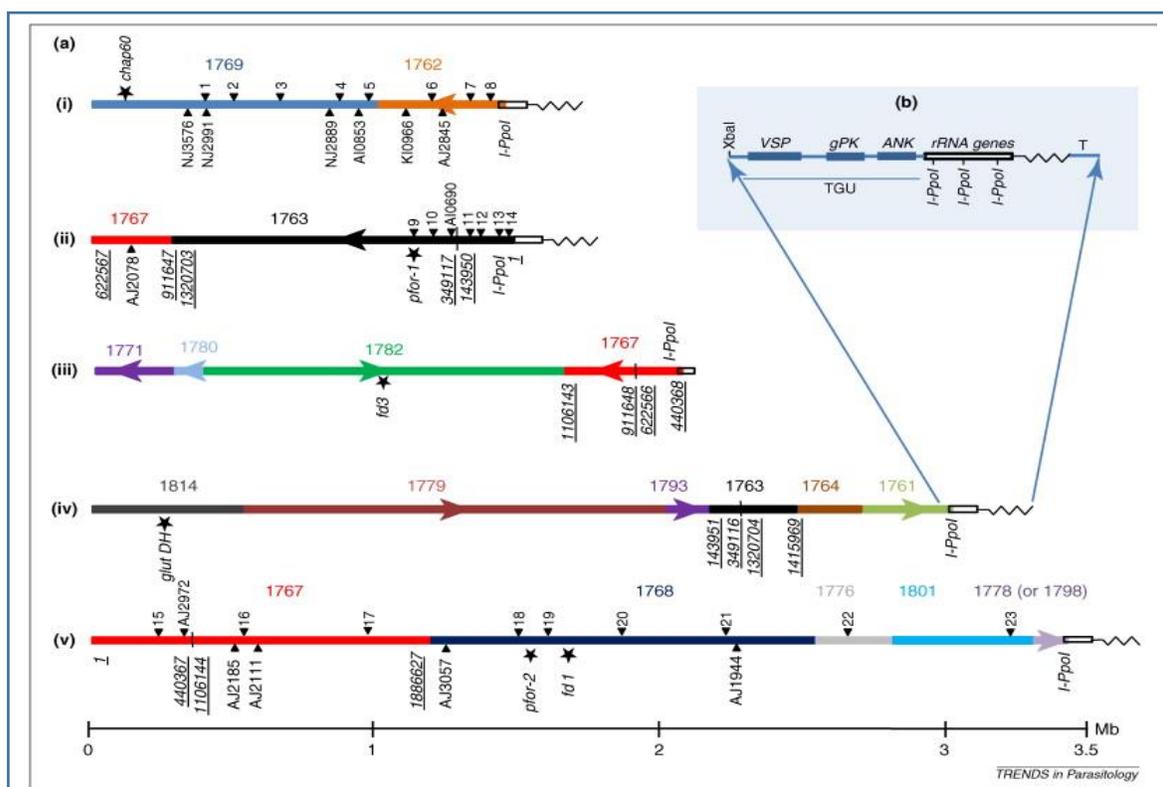
**Desintoxicación de oxígeno:** *Giardia* tolera bajas concentraciones de oxígeno y de especies reactivas de oxígeno. Recientemente se ha propuesto que en el intestino delgado existe una alta capacidad de amortiguar el potencial redox y que esta puede ser la razón por la que *Giardia* coloniza esta zona (Mastronicola et al., 2011). Una de las razones de esta baja tolerabilidad al oxígeno es la presencia de la enzima DT-diaforasa que genera peróxido de hidrógeno bajo condiciones aeróbicas en *Giardia*, otra razón es que enzimas del metabolismo intermediario del piruvato en el parásito son altamente sensibles al oxígeno (PFOR y Fe-Fe hidrogenasa). Además, este parásito carece de catalasa, superóxido dismutasa y del sistema de glutatión reductasa, que son los sistemas convencionales de eliminación de especies reactivas de oxígeno. La desintoxicación de estas especies se lleva a cabo con un sistema de proteínas parecidas a la tiorredoxina junto con NADH oxidasa, proteínas como la flavodiron y flavohemoglobina además de una superóxido reductasa adquiridas al parecer de donadores de origen procarionte (Brown et al., 1998; Di Matteo et al., 2008; Mastronicola et al., 2016; Rafferty et al., 2010; Vicente et al., 2009).

## **El genoma, transcriptoma y proteoma de *Giardia***

El genoma de *Giardia* es de particular interés en el aspecto evolutivo por ser un eucarionte de divergencia temprana. En éste se pueden encontrar formas simplificadas de muchos procesos celulares ya que posee subunidades básicas, enzimas homólogas a las bacterianas y un repertorio metabólico conservado en parásitos, además es posible apreciar la transferencia lateral de genes con bacterias termoanaeróbicas, en las proteínas DnaK, cpn60, NADH, alcohol deshidrogenasa, glucosamina 6-fosfato isomerasa así como otras enzimas de la vía de las pentosas fosfato (Morrison et al., 2007). En total se han identificado en *Giardia* 15 genes adquiridos por transferencia horizontal de los cuales la mitad están asociados a la sobrevivencia en un ambiente anaeróbico. Otro aspecto relevante de este genoma es que su heterocigosidad es menor al 0.01 %, parámetro esperado para un organismo que realiza reproducción sexual y no para uno que se divide de manera asexual (Birky, 2010; Morrison et al., 2007; Teodorovic et al., 2007). Las explicaciones que se han generado para comprender este fenómeno es que puede existir intercambio de material genético entre los núcleos, lo que genera diferencias entre estos además de la presencia de genes específicos de la meiosis (Morrison et al., 2007; Ramesh et al., 2005). Varias evidencias sobre recombinación genética en este parásito incluyen; I) la fusión que ocurre entre los núcleos en los quistes, es decir la cariogamia que fue observada por microscopía electrónica de transmisión (Carranza and Lujan, 2010); II) la presencia de genes homólogos relacionados con la meiosis, III) los estudios de recombinación en el ensamblaje AII y IV) el intercambio de plásmidos episomales entre los núcleos y de marcadores integrados a cromosomas (Carpenter et al., 2012; Cooper et al., 2007; Jirakova et al., 2012; Poxleitner et al., 2008). También existen diferencias en el nivel de heterocigosidad entre ensamblajes siendo común en B, C, D y E pero menos frecuente en A, F y G (Lebbad et al., 2010). Varios grupos de investigación han propuesto un modelo que trata de explicar este fenómeno; este consiste en la fusión de trofozoítos que es seguida de una reducción del genoma a través de la pérdida de cromosomas hasta que la tetraploidía es alcanzada proceso durante el cual el genoma puede sufrir diplomixis, conversión de genes y o recombinación (Andersson, 2012).

Particularmente el genoma de *Giardia* tiene un tamaño de aproximadamente 12.1Mb, del cual el 77% corresponde a regiones codificantes. El genoma del aislado WB tiene un contenido de GC del 49% organizado en cinco cromosomas cuyos tamaños van de 0.7 a 3 Mb, los cuales

están flanqueados por secuencias teloméricas similares a las que se encuentran en eucariontes (Morrison et al., 2007). Estas diferencias en el tamaño se han atribuido a la frecuencia de recombinación de las regiones teloméricas. Además existe evidencia de diferencias en el número y tamaño de los de cromosomas presentes en cada uno de los dos núcleos, diferencias que fueron detectadas en análisis citogenéticos que mostraron desigualdades entre los ensamblajes A y B (Tumova et al., 2007). Resultados preliminares del proyecto del genoma de *Giardia* reportaron que está constituido por 6470 genes muchos de los cuales no poseen intrones (solo se han identificado intrones cis en 5 genes) 1800 de estos genes se superponen mientras que 1500 se encuentran separados por al menos 100 nucleótidos y 2403 están duplicados (Morrison et al., 2007; Roy et al., 2012).

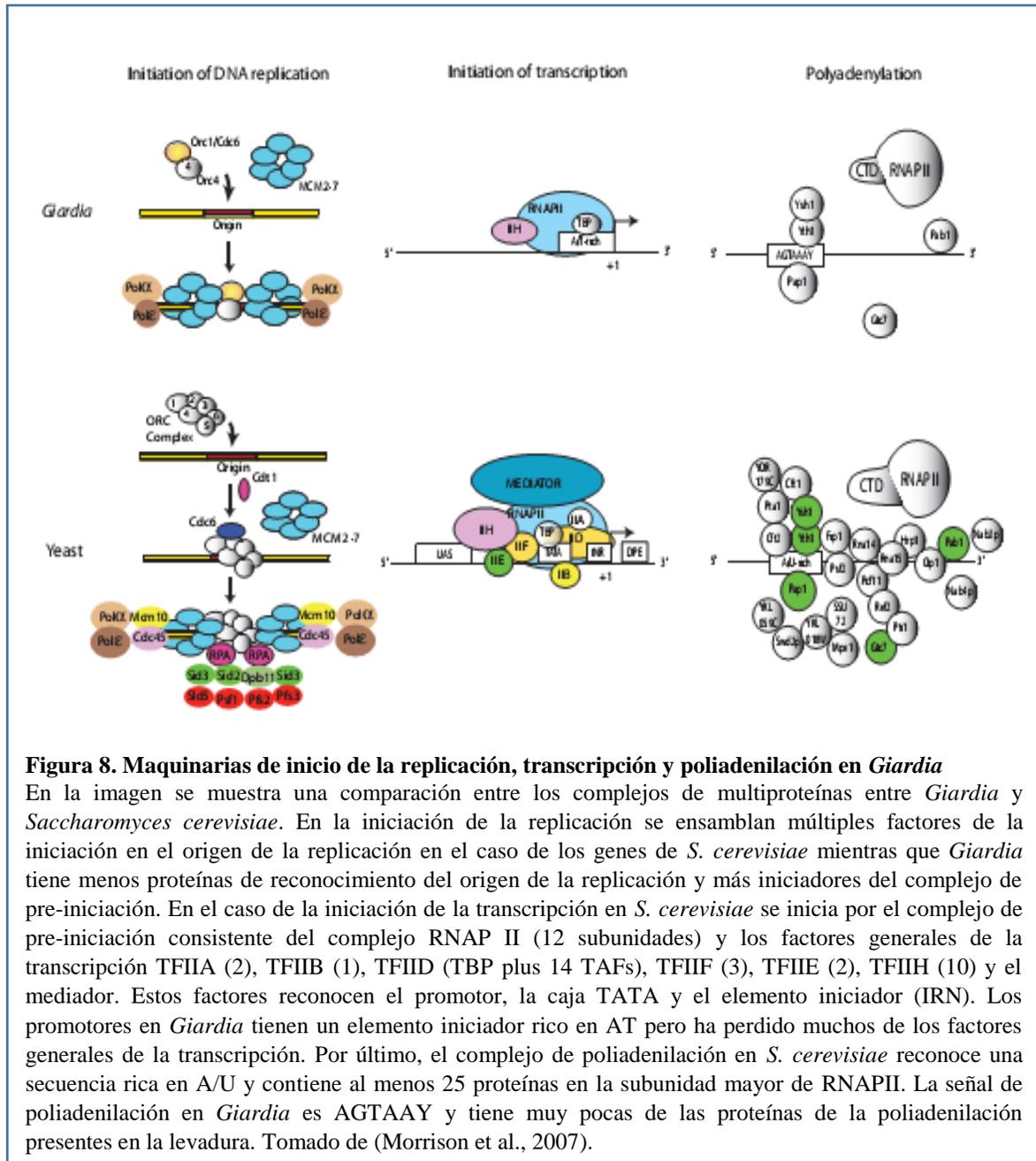


**Figura 7. Los cromosomas de *Giardia***

En la imagen se muestra el mapa de los cromosomas de *Giardia* WB C6. El tamaño de los cromosomas se indica en la barra horizontal; el mapa también muestra los scaffolds (números y tamaños se muestran en colores a lo largo de los cromosomas) asociados a cada cromosoma. Las cabezas de flechas indican la orientación de estos. Los números indican secuencias de sondas cromosoma-específicas. Las estrellas muestran genes marcadores del cromosoma, las líneas en zig-zag representan las secuencias teloméricas y los rectángulos genes de rRNA. Tomado de (Upcroft et al., 2010).

En cuanto a las maquinarias de síntesis de DNA, transcripción, procesamiento de RNA y del ciclo celular éstas están reducidas y son más parecidas a las de protistas que a las de eucariontes. *Giardia* posee solamente dos complejos de reconocimiento del origen de replicación; carece de proteínas reguladoras del inicio de la replicación y la estructura de la DNAPol  $\epsilon$  y  $\delta$  corresponde a las del reino Archaea aunque sí posee las histonas canónicas encontradas en eucariontes, con excepción de la histona H1 (Yee et al., 2007). Además, comparte con los eucariontes el complejo de la DNAPol  $\alpha$  y el core de las RNA pol I, II y III y el número de factores de transcripción es menor al presente en otros eucariontes. Aunque no existen enzimas de la biosíntesis de bases nitrogenadas en su genoma, se han descrito sintetisas de tRNA (Morrison et al., 2007).

En *Giardia* los promotores de inicio de la transcripción son pequeños y ricos en A/T, sin una caja TATA identificable (Adam, 2000). Los 5' UTRs también son cortos, entre 4 y 14 nucleótidos, y no se ha identificado la secuencia correspondiente a la que reconoce al ribosoma (Shine-Dalgarno en procariontes y Kozak en eucariontes). El complejo de proteínas que se unen a la caja TATA encontrada en *Giardia* es completamente divergente del de eucariontes encontrándose solamente 21 de las 28 proteínas del sistema eucarionte RNA pol I-III, con 6 de los componentes de las polimerasas específicas perdidos; 4 de los factores de inicio de la transcripción y 9 proteínas asociadas a ellos, de las 29 presentes en eucariontes (Iyer et al., 2008). Los mRNAs tienen bloqueado el extremo 5, sugiriendo una estructura de cap, sin embargo no parece estar en todos; por otro lado, se han identificado dos factores de transcripción distintos a 4E en *Giardia* uno de los cuales se une a TMG cap y el otro al m7 cap (Li and Wang, 2005). La poliadenilación se lleva a cabo por un sistema rudimentario que reconoce la secuencia AGTPuAAP y es seguido de la adición de la cola de adeninas de 10 pb rio abajo de la secuencia PAS (Adam, 2001). Recientemente se ha descrito que el transplicing ocurre en *Giardia* específicamente en los genes que codifican para las proteínas HSP90 y una proteína del motor de dineína (Kamikawa et al., 2011). En las cepas WB y GSH se detectaron una gran cantidad de transcritos estériles que son transcritos anti sentido cuya abundancia se ha asociado a promotores bidireccionales o a su degradación ineficiente aunque existe una vía canónica para la degradación de transcritos en este parásito como el exosoma (degradación 3'-5') (Williams and Elmendorf, 2011).



**Figura 8. Maquinarias de inicio de la replicación, transcripción y poliadenilación en *Giardia***

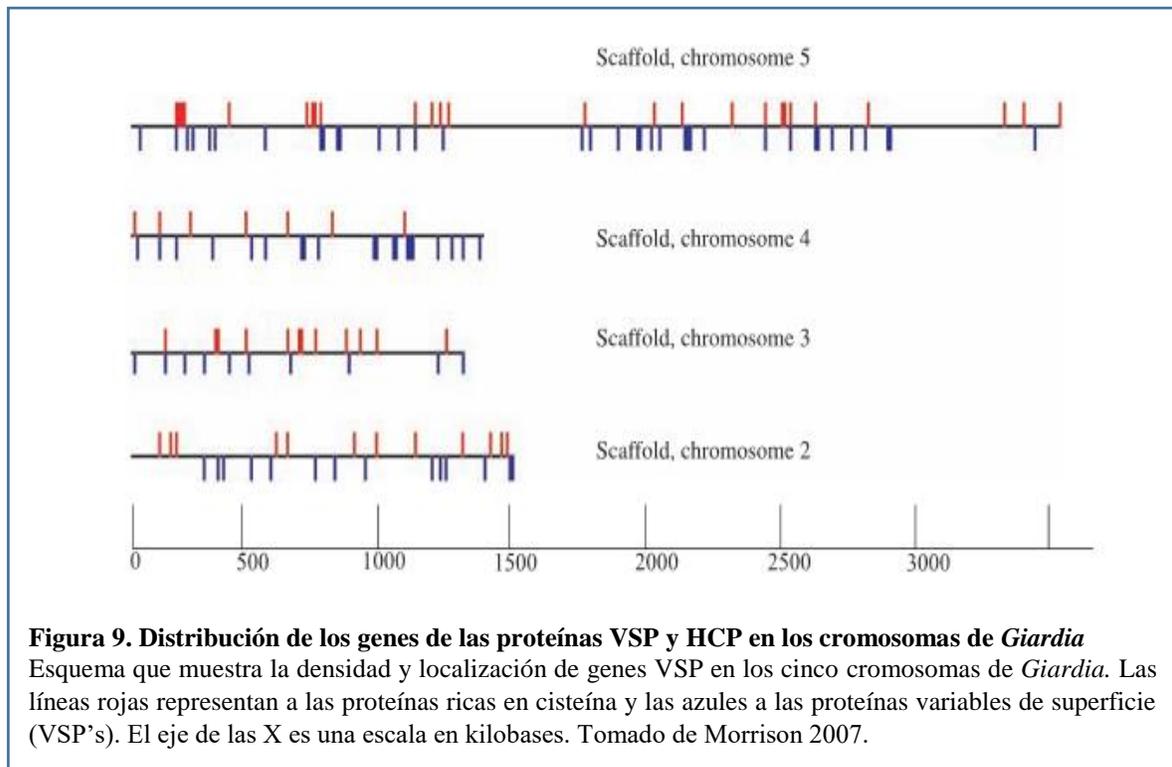
En la imagen se muestra una comparación entre los complejos de multiproteínas entre *Giardia* y *Saccharomyces cerevisiae*. En la iniciación de la replicación se ensamblan múltiples factores de la iniciación en el origen de la replicación en el caso de los genes de *S. cerevisiae* mientras que *Giardia* tiene menos proteínas de reconocimiento del origen de la replicación y más iniciadores del complejo de pre-iniciación. En el caso de la iniciación de la transcripción en *S. cerevisiae* se inicia por el complejo de pre-iniciación consistente del complejo RNAP II (12 subunidades) y los factores generales de la transcripción TFIIA (2), TFIIB (1), TFIID (TBP plus 14 TAFs), TFIIF (3), TFIIE (2), TFIIH (10) y el mediador. Estos factores reconocen el promotor, la caja TATA y el elemento iniciador (IRN). Los promotores en *Giardia* tienen un elemento iniciador rico en AT pero ha perdido muchos de los factores generales de la transcripción. Por último, el complejo de poliadenilación en *S. cerevisiae* reconoce una secuencia rica en A/U y contiene al menos 25 proteínas en la subunidad mayor de RNAPII. La señal de poliadenilación en *Giardia* es AGTAAAY y tiene muy pocas de las proteínas de la poliadenilación presentes en la levadura. Tomado de (Morrison et al., 2007).

En el genoma de *Giardia* existen varias familias de genes únicas: proteínas con repetidos de ankirina, Nek cinasas, giardinas, proteínas Variables de Superficie (VSPs) y proteínas de membrana ricas en cisteína (HCMPs). La familia de genes de las proteínas ricas en repetidos de ankirina es la más grande en *Giardia*; 436 genes de su genoma tienen al menos uno de estos repetidos; estas proteínas son comunes en bacterias y eucariontes y típicamente forman parte de interacciones proteína-proteína.

Recientemente se localizó una proteína con 21 de estos repetidos se en el disco ventral y la cresta ventrolateral (Elmendorf et al., 2005; Hagen et al., 2011). Relacionada con esta familia de genes se encuentra la familia de las Nek cinasas ya que también son ricas en repetidos de ankirina; se han identificado 197 de estos genes, aunque 137 de las proteínas para las que codifican han perdido su sitio catalítico. La principal función de esta cinasas es controlar la entrada del trofozoíto en el ciclo celular (Morrison et al., 2007).

Las giardinas, por otra parte, son proteínas de unión del citoesqueleto de las que existen cuatro tipos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ . La más relevante es el subtipo  $\alpha$ -giardina la cual está integrada por 12 genes. Las proteínas para las que codifican se localizan en el flagelo, la membrana y otras partes del citoesqueleto. La proteína  $\alpha$ -1 giardina es una de las proteínas inmunodominantes más importante de *Giardia* por lo que se ha planteado el diseño de vacunas en base a ésta (Jenikova et al., 2011). En cuanto al resto de la familia las formas  $\beta$  y  $\delta$  son miembro de las fibras estriadas y se encuentran predominantemente en el disco suctor (Palm et al., 2005), mientras que no se ha reportado una localización específica para la  $\gamma$ -giardina (Nohria et al., 1992).

Distribuidos a lo largo de los cinco cromosomas de *Giardia* se encuentran genes de la familia de las VSPs, casi ninguno en posición telomérica. En el genoma de *Giardia* WB se han identificado 303 de estos genes *vsp*, de los cuales 228 se encuentran completos. El tamaño de estos genes es altamente variable y va desde 222 pb a 6.8 kb, se encuentran en arreglos lineales y generalmente están invertidos o en arreglos en tándem además de que son los genes con mayor número de duplicados en el genoma de *Giardia* (Adam et al., 2010). Estos genes codifican para proteínas que funcionan como antígenos de superficie implicados en la evasión de la respuesta inmunológica del hospedero por lo que se ha sugerido que la duplicación permite ampliar la capacidad del parásito para re-infectar e infectar una gran variedad de hospederos (Sun et al., 2010). Los genes que codifican para las proteínas de membrana ricas en cisteína son la última familia de genes más numerosa en el genoma de *Giardia* WB; se han identificado 61 de estos genes y se han agrupado en 9 clases. Estructuralmente comparten características con las proteínas VSPs; específicamente tienen repetidos Cys-X-X-Cys abundantes aunque los repetidos Cys-x-Cys son exclusivos de esta familia (Adam, 2001).



La función de estas numerosas proteínas no se ha determinado aunque se ha encontrado que la expresión de algunos de sus miembros se incrementa durante la interacción con células epiteliales mientras que el gen de la proteína HCNCp aumenta su expresión durante el enquistamiento (Davids et al., 2006; Ringqvist et al., 2011).

En general el interés por analizar el genoma y transcriptoma de *Giardia* radica en su relevancia en estudios evolutivos, por ser un eucarionte de divergencia temprana. Además de que estos análisis pueden ayudar a establecer qué genes se encienden y cuáles se apagan durante el ciclo de vida del parásito, a determinar los mecanismos involucrados en la infección del hospedero y en cuál es su respuesta a distintos fármacos (Birkeland et al., 2010; Ma'ayeh and Brook-Carter, 2012; Morf et al., 2010; Muller et al., 2007; Ringqvist et al., 2011).

En cuanto al proteoma en *Giardia* los estudios se han enfocado al análisis de proteínas involucradas en: la estructura y biología celular, la interacción hospedero-parásito y la variación del proteoma en los diferentes ensamblajes/genotipos de este protozoario. En lo correspondiente a la estructura y biología celular se identificaron, mediante el uso de electroforesis de doble dimensión y espectrometría de masas, las proteínas que integran el citoesqueleto de *Giardia*:  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina,  $1\alpha$ -giardina,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ -giardina y SALP-1 (Palm et al.,

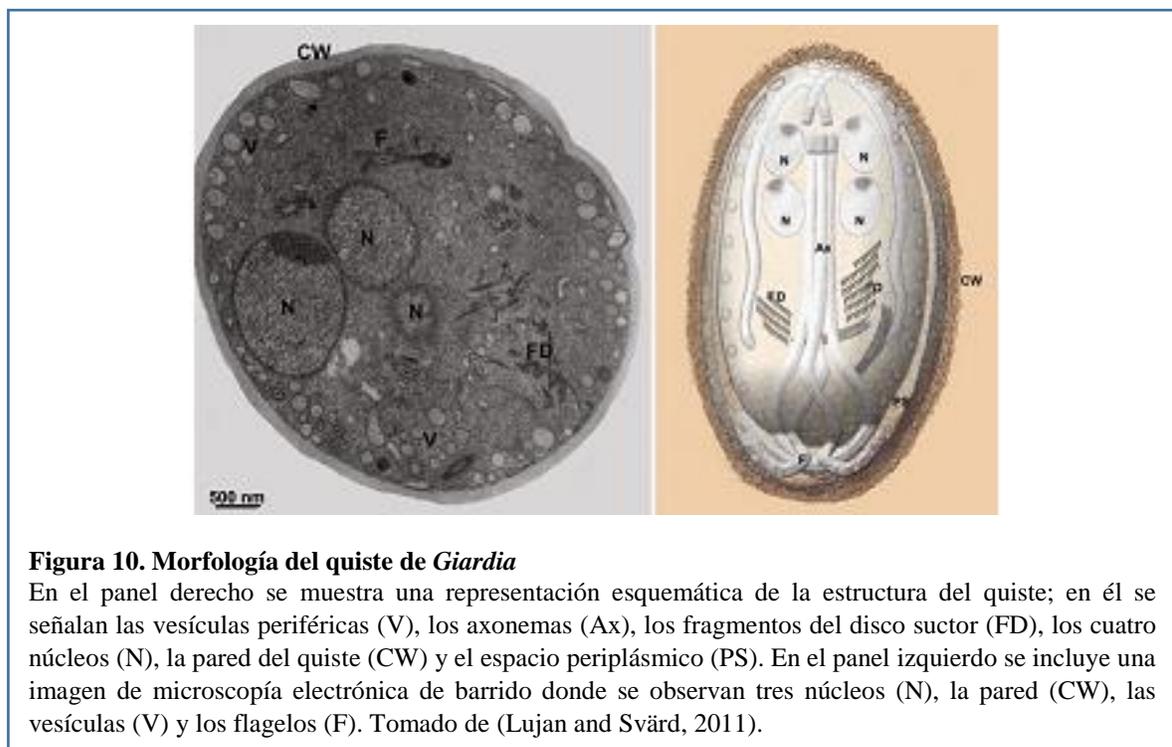
2005). Además de la composición del citoesqueleto, se analizaron las vesículas específicas del enquistamiento (ESV), los ribosomas, el proteosoma y los mitosomas. En las ESV se identificaron las proteínas de la pared de quiste CWP 1, 2 y 3 y dentro de las proteínas que se sobre-expresan en el enquistamiento se reportaron a las giardinas, tubulina, enzimas metabólicas, como la OCT y las chaperonas HSP 70 y 90 (Reiner et al., 2008); otras proteínas identificadas en *Giardia* son las involucradas en la biogénesis del mitosoma; ipam18, Hsp 70, Cnp60 y PP, o en la formación del centro Fe-S, iiscS, iiscU, iiscA, igrx e ifdx (Tovar et al., 2003).

Dentro de las proteínas que participan en la interacción hospedero-parásito se han identificado las proteínas estructurales antes mencionadas así como ADI, OCT, enolasa, fructosa-1, 6 bifosfato aldolasa y proteasas agrupadas en productos de excreción/secreción, los antígenos de trofozoítos GTA 1 y 2 y las VSPs (Palm et al., 2003; Tellez et al., 2005). Dentro de los productos de excreción/secreción se han reportado varias proteínas con masas entre 15 y 225 kDa, dentro de las cuales se identificaron a la  $\alpha$ -enolasa, OCT, ADI, cisteín, aspartil y metalo proteasas junto con una proteína de 58 kDa que causa acumulación de fluidos en el intestino (Ringqvist et al., 2008; Rodriguez-Fuentes et al., 2006; Shant et al., 2002). Por último entre los ensamblajes de *Giardia* que infectan humanos existe evidencia que muestra diferencias entre las proteínas expresadas por el ensamblaje A y el B; ya que mientras en el ensamblaje A está presente la  $\alpha$ -2 giardina el genotipo B carece de ésta, sin embargo cabe destacar que entre aislados de *Giardia duodenalis* pertenecientes a una misma cepa como la WB también existe variación en su proteoma (Palm et al., 2003).

### **Estadio latente: Características morfológicas del quiste**

El quiste es la fase transitoria y latente en el ciclo de vida de *Giardia*; una adaptación que le permite sobrevivir a las condiciones ambientales fuera de su hospedero como lo son temperaturas y pHs extremos y la acción de detergentes. Se caracteriza por su forma ovalada de entre 6 a 10  $\mu$ m de ancho por 7 a 10  $\mu$ m de longitud, no tener motilidad y ser retractiles además de tener un polo flagelar y uno nuclear así como axonemas resultado del acortamiento de los flagelos (Carranza and Lujan, 2010). En esta estructura el disco ventral se encuentra desensamblado, y los mitosomas reducidos.

En el quiste son visibles cuatro núcleos con cromatina condensada, cada uno de los cuales contiene cuatro copias del genoma como resultado de dos rondas de replicación donde la última ocurre sin que haya cariocinesis. La estructura más distintiva, sin embargo, es una pared de polisacáridos y proteínas con un espesor de 0.3 y 0.5  $\mu\text{m}$  formada por una capa externa filamentosa y una capa interna constituida a su vez por dos membranas entre las que se encuentra el espacio periplásmico, en el citoplasma se encuentran dos o cuatro núcleos dependiendo del estado de maduración. En la fase tardía del enquistamiento, sin que ocurra citocinesis, se generan células con un contenido de 16N (44N) mientras que durante el desenquistamiento la citocinesis finaliza produciendo dos trofozoítos 8N (24N) seguido de la división completa que concluye con cuatro trofozoítos 4N (22N) (Carranza and Lujan, 2010). Finalmente, en la pared del quiste se inducen cambios en la permeabilidad de la membrana que restringen el transporte de los metabolitos a través de ella por lo que la actividad metabólica del quiste se reduce en un 80% en un proceso denominado criptobiosis (Olson B, 2002), sin embargo posee grandes almacenamientos de glucógeno para sostener la energía basal pudiendo permanecer infeccioso por muchos meses en el ambiente (Adam, 2001).



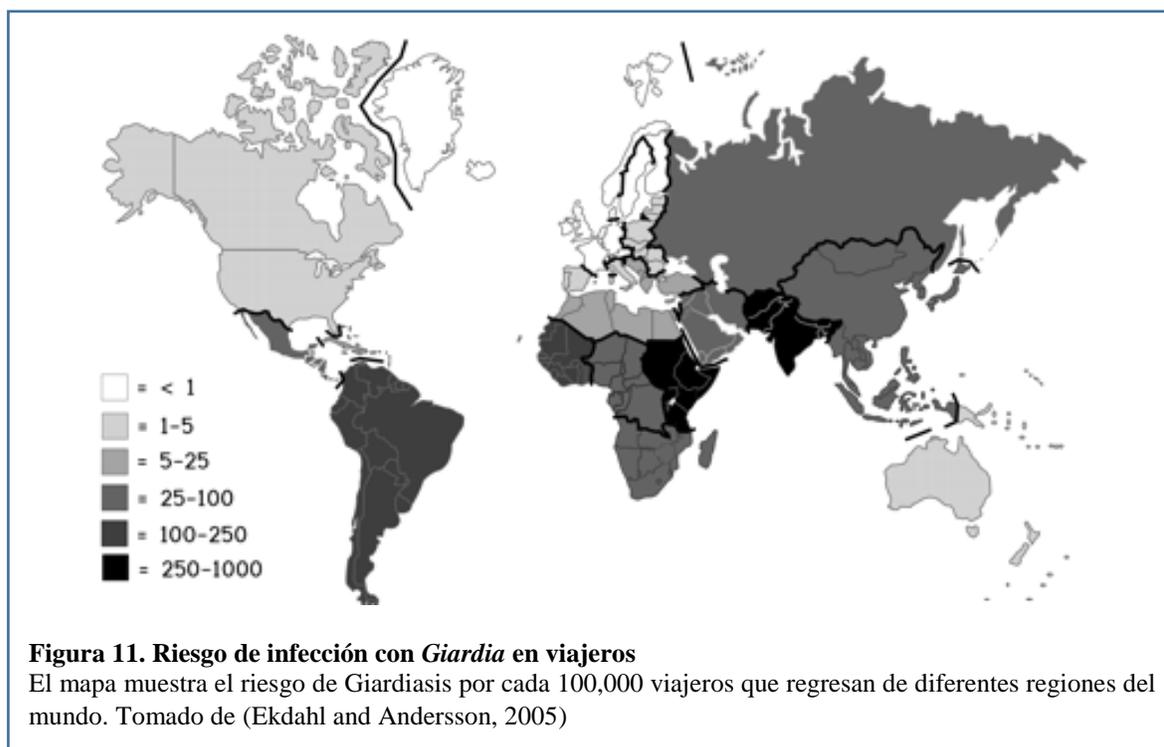
## **Giardiasis**

### **Características generales: prevalencia y distribución**

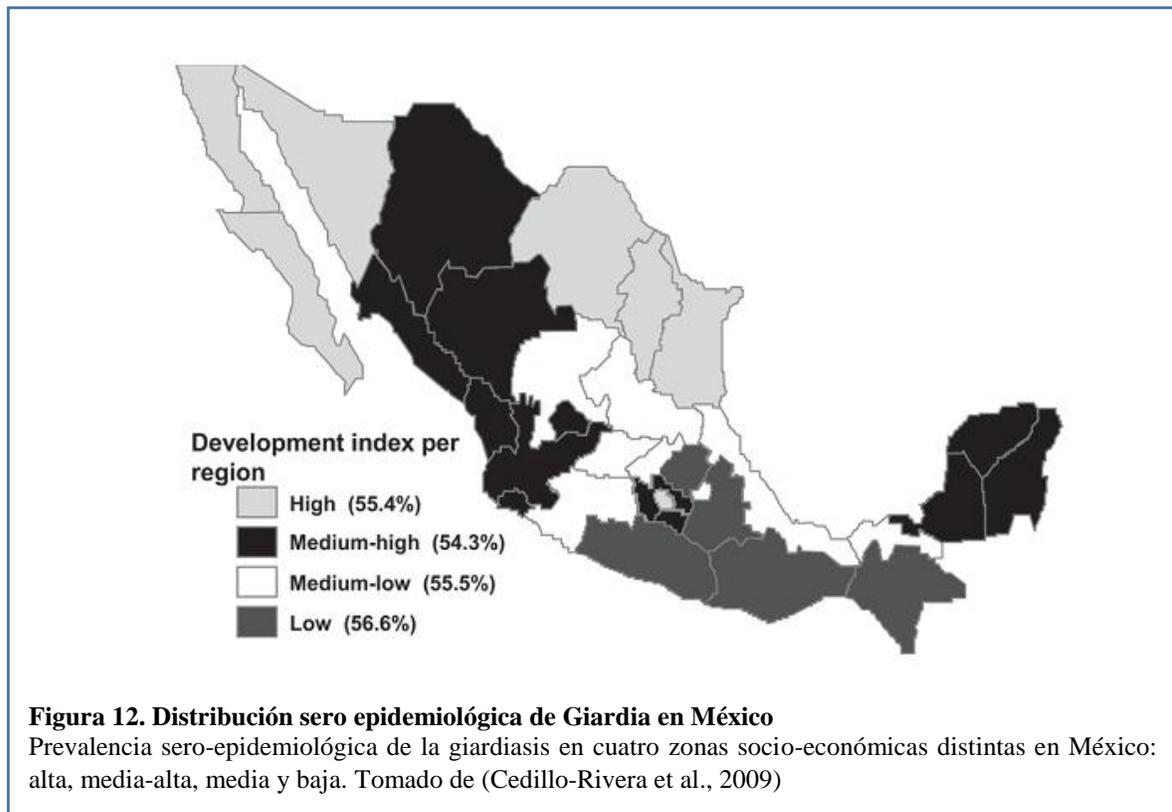
La Giardiasis es la infección parasitaria más común en el mundo cuya transmisión se asocia con agua contaminada, por lo que *Giardia*, su agente causal es considerado el principal protozooario causante de diarrea. Se han documentado 132 brotes de Giardiasis alrededor del mundo desde 1954 debido a la ingesta de agua contaminada (Karanis et al., 2007). El número anual de casos se estima en 280 millones por año, con un promedio de 500,000 casos nuevos al año (Halliez and Buret, 2013; Vicente et al., 2009; Yichoy et al., 2011). El CDC reporta que en los países desarrollados cerca del 2% de los adultos y del 6-8% de los niños están infectados con *Giardia*, mientras que en los países en desarrollo una tercera parte de la población ha tenido giardiasis (www.cdc.gov) (Efstratiou et al., 2017). La mayoría de los casos ocurren en países con bajos ingresos, en los cuales *Giardia* es endémica, los cuales se encuentran concentrados en los continentes africano, asiático y en América latina. Debido a estas características la Giardiasis ha sido recientemente incluida en la iniciativa de la Organización Mundial de la Salud : WHO Neglected Diseases, que engloba enfermedades ligadas a la pobreza, además del impacto socioeconómico que genera la resistencia de los quistes, el costo del tratamiento farmacológico y de la descontaminación del agua así como la vacunación de los animales en estos países (Rafferty et al., 2010). La epidemiología de esta parasitosis es complicada debido a que se presentan infecciones mezcladas y que existe la posibilidad de intercambio genético entre los ensamblajes (Cooper et al., 2007; Lasek-Nesselquist et al., 2009; Teodorovic et al., 2007). Algunos estudios indican que el ensamblaje B tiene mayor prevalencia en América latina, Asia y Europa mientras que otros reportan prevalencia del ensamblaje A (Ajjampur et al., 2009; Al-Mohammed, 2011; El Basha et al., 2016; Eligio-Garcia et al., 2008; Foronda et al., 2008; Gelanew et al., 2007; Geurden et al., 2009; Lebbad et al., 2008; Minvielle et al., 2008; Ryan and Caccio, 2013).

En general los brotes de Giardiasis son comunes en guarderías y albercas además de ser el agente etiológico más común asociado a la diarrea del viajero (Baldursson and Karanis, 2011; Ross et al., 2013) y se tiene mayor riesgo de infección en las personas que viajan desde el continente europeo a la India, a los países árabes y los países de África del este (Ekdahl and Andersson, 2005). Lo anterior se debe a que en los países subdesarrollados el rango de prevalencia común es del 20 al 30% aunque en algunas zonas llega a ser del 100%; en tanto

que en los países desarrollados la prevalencia de esta enfermedad varía entre el 3 y el 7% (Halliez and Buret, 2013). Sin embargo, factores como las condiciones climáticas pueden influir en la variación de estos rangos, pues se ha determinado que existe un incremento en el número de casos durante el verano (Lujan and Svärd, 2011). Así mismo numerosos estudios han demostrado que poblaciones de perros y gatos pueden ser una fuente zoonótica de infección para las personas (Garcia-Cervantes et al., 2017; Karanis and Ey, 1998; Lee et al., 2017a; Palmer et al., 2008; Piekarska et al., 2016; Ryan and Caccio, 2013; Thompson and Ash, 2016). En cuanto a los grupos de la población más afectados los niños menores de 5 años son más susceptibles a esta infección. (Yoder et al., 2012). No obstante estos patrones también pueden variar dependiendo la región socioeconómica, por ejemplo en el Reino Unido la Giardiasis es más frecuente en individuos de entre 30 y 39 años, mientras que en Estados Unidos la mayor incidencia se registra en niños entre 0 y 5 años seguido por personas de entre 31 y 40 años (Ekdahl and Andersson, 2005).



En México la prevalencia de esta infección varía del 3% al 50% (Cedillo-Rivera et al., 2009), por lo que esta infección se considera de importancia epidemiológica y clínica en el país (Astiazaran-Garcia et al., 2010). En 2008 el Centro Nacional de Vigilancia y Control de Enfermedades (CENEVACE) reportó una incidencia de 24.46 casos por cada 100,000 mexicanos y de 73.47 en el grupo de edad de 1 a 4 años, mientras que en 2010 el mismo Centro detectó un total de 20,678 nuevos casos y determinó que los estados con mayor incidencia son Sinaloa, Yucatán y Baja California Sur (<http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>). En estudios del 2012 al 2014 se reporta que los estados con mayor prevalencia son Sinaloa, Sonora, la ciudad de México, Oaxaca y Yucatán (Quihui-Cota and Morales-Figueroa, 2012; Torres-Romero et al., 2014). En un estudio sero-epidemiológico realizado en todo el país se determinó que en México la Giardiasis es endémica pues existe una sero-prevalencia de *Giardia duodenalis* del 55.3% y que es independiente del estado socioeconómico de la población.



Además, estableció que los grupos de edad con mayor índice de prevalencia son los niños de entre 5 y 9 años y los adultos jóvenes. Este estudio también mostró que en los hombres la incidencia es mayor que en las mujeres mexicanas siendo una de los primeros reportes que muestra una correlación entre el sexo y la infección con *Giardia* (Cedillo-Rivera et al., 2009). Por otra parte en estudios previos con aislados humanos provenientes de las zonas central y norte de México se ha reportado la presencia solo del ensamblaje A (sub ensamblajes A-I y A-II) (Cedillo-Rivera et al., 2009; Eligio-García et al., 2008; Ponce-Macotela et al.) mientras que en estudios realizados con muestras del sureste del país se detectó la presencia del ensamblaje B (Torres-Romero et al., 2014). Un estudio más reciente reportó la presencia del ensamblaje B de *Giardia* en el noroeste del país y de infecciones mixtas (AI y B) (García-Cervantes et al., 2017).

### **Signos y síntomas de la Giardiasis**

Los síntomas de la Giardiasis se presentan de 6 a 15 días después de ingerir alimentos o agua contaminada con los quistes de *Giardia*. Las manifestaciones clínicas más comunes de la infección con este protozoo son diarrea, dolor epigástrico, distensión abdominal, náuseas, vómito, fiebre moderada, flatulencias, esteatorrea, pérdida de peso e incluso síndrome de malabsorción. Si las personas infectadas son inmuno-competentes existe autoeliminación en el 85% de los casos (Buret, 2008; Cotton et al., 2011; Halliez and Buret, 2013; Yichoy et al., 2011). Se ha intentado establecer si la gravedad de los síntomas de esta parasitosis está ligada al ensamblaje que infecta pero los resultados obtenidos no han logrado establecer una clara correlación entre genotipo y virulencia aunque parece existir una tendencia donde el ensamblaje A se asocia con una diarrea intermitente mientras que el ensamblaje B está relacionado con una sintomatología persistente (Lanfredi-Rangel et al., 1999; Lebbad et al., 2011a; Nash et al., 1987).

En general pueden presentarse un amplio rango de manifestaciones clínicas de la Giardiasis y debido a que esa parasitosis no induce un proceso inflamatorio se presentan casos de pacientes positivos a *Giardia* que son asintomáticos. Los síntomas antes descritos son característicos de una infección aguda y se presentan en un 20 a 80% de los individuos infectados. Las re-infecciones o complicaciones post-infección después de la eliminación

completa del parásito pueden llevar a un padecimiento crónico que se presenta en un 3 al 4% de los casos (Halliez and Buret, 2013; Yichoy et al., 2011) La transición de la fase aguda a la fase crónica de esta parasitosis se ha atribuido a factores propios del hospedero como edad, estado nutricional, inmunológico e infección con otros parásitos como *Hymenolepis nana*, *Entamoeba coli* y *Trichinella spiralis* así como factores propios de *Giardia* que abarcan el genotipo de la cepa, la dosis infectiva, la variación antigénica y las co-infecciones (Cotton et al., 2011; Schofield et al., 1991).

Los síntomas de la fase aguda de la infección aparecen después de la colonización inicial del trofozoíto y ésta coincide con la aparición de quistes en muestras fecales, aunque en pacientes asintomáticos la excreción de quistes parece ser común. Las heces son descritas como grasientas y espumosas, pero pueden ser acuosa en cuyo caso los trofozoítos se pueden observar en un análisis coprológico. Esta fase se resuelve espontáneamente en un lapso de entre 2 y 3 semanas si el hospedero tiene una respuesta inmune efectiva por esta razón la mortalidad por Giardiasis es poco frecuente aunque se han reportados casos de decesos, específicamente en niños (Buret, 2008).

Entre las consecuencias de una infección crónica se encuentran la anorexia, desórdenes gastrointestinales crónicos como el síndrome del intestino irritado, fatiga crónica y efectos extra-intestinales como complicaciones oculares (hemorragias en la retina e hiper pigmentación en la retina), artritis, urticaria, miopatías, anemia y desnutrición (Cotton et al., 2011; Halliez and Buret, 2013; Wensaas et al., 2012). Existen reportes que indican que *Giardia* puede causar síntomas prolongados como intolerancia a la lactosa incluso su presencia en masas tumorales en el páncreas y la vesícula biliar han llamado la atención sobre su posible participación en el desarrollo de procesos cancerígenos (Halliez and Buret, 2013).

El mayor impacto de la Giardiasis en la salud pública, así como su repercusión a largo plazo se observa en los niños de entre 1 y 5 años donde una atención medica inadecuada puede llevar a retraso en el desarrollo y el crecimiento; baja función cognoscitiva, un lenguaje pobre, así como un desarrollo psico-motor deficiente con repercusiones en el desarrollo hacia la fase adulta. Lo anterior se ha asociado a afectaciones en el sistema oxido-reductor y la plasticidad neuronal por deficiencias de zinc y hierro a causa de la diarrea provocada por el parásito (Buret, 2008) además de la malabsorción de otros nutrientes esenciales para el correcto

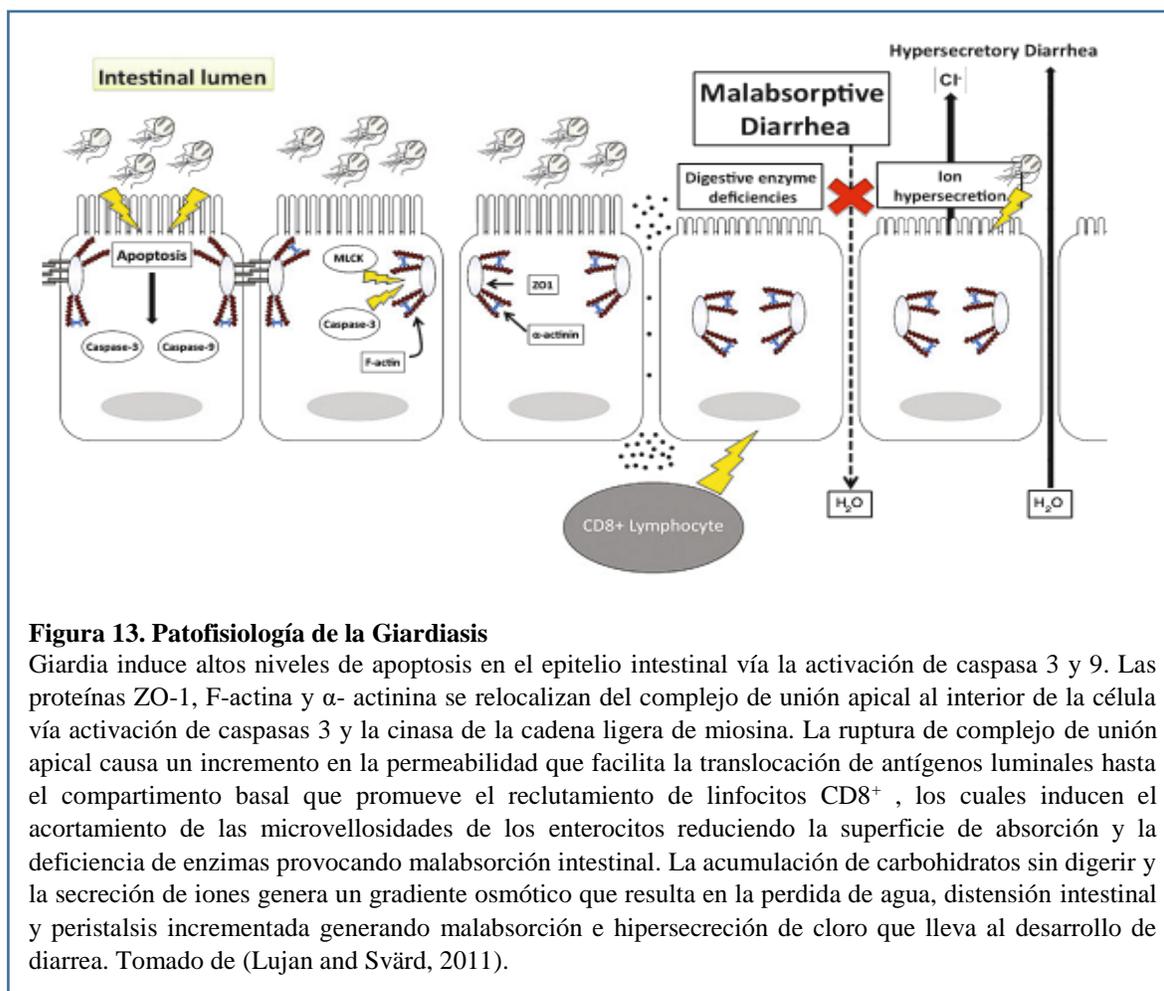
desarrollo de un infante como carbohidratos y vitaminas ( A, B3, B5,B6,B12 e ) (Lanfredi-Rangel et al., 1999).

### **Patofisiología de la Giardiasis**

Los cambios funcionales que ocurren en el epitelio intestinal debido a la colonización de este tejido por los trofozoítos de *Giardia* incluyen un alto rango de apoptosis de los enterocitos, disfunción de la barrera intestinal, la activación de los linfocitos del hospedero, el acortamiento de la microvellosidades de los enterocitos con o sin atrofia de las vellosidades, deficiencia de las enzimas disacaridasas, sucrasa y maltasa durante la fase aguda de la infección, tripsinas, quimotripsinas, amilasas y lipasas que junto con la reducción de la superficie de absorción llevan a la malabsorción de los nutrientes hipersecreción de cloro y un incrementó en la motilidad del intestino (Buret, 2007, 2008; Cotton et al., 2011; Eckmann and Gillin, 2001; Troeger et al., 2007). A nivel morfológico el intestino delgado durante la fase aguda de la infección, que se presenta entre los días 7-8 post-infección, muestra hiperplasia de las criptas, atrofia de las vellosidades y reducción en la altura del epitelio intestinal (Tako et al., 2013). Dentro de este contexto se ha identificado la disminución en la expresión de los genes de las enzimas amilasa pancreática, cuyos transcritos se expresan solo al 1-2% de los niveles normales a través de la infección además de la fosfatasa alcalina, tripsina y quimotripsina B. Por otro lado en el caso de la lactasa, enzima específica del intestino y que es considerada el marcador por excelencia de la Giardiasis, su expresión se ve disminuida cerca de 30% en el día 10 post-infección en modelos murinos (Tako et al., 2013) aunque en ratones deficientes de TNF $\alpha$  la reducción en la actividad enzimática no fue tan pronunciada lo que lleva a sugerir que existe un componente inmunológico involucrado en la malabsorción de nutrientes durante la infección con *Giardia* (Tako et al., 2013).

La inducción de la muerte de los enterocitos es considerada el componente clave de la infección ya que la pérdida de la integridad de la barrera epitelial, esencial en mantener la restricción en la penetración de los patógenos hacia el lumen y la región basal del intestino, se ve comprometida induciendo cambios en la secreción de iones y un flujo incrementado de agua que dan origen a la diarrea característica de la Giardiasis. Además, esta ruptura parece llevar a la activación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que median el acortamiento de las

microvellosidades ocasionando la reducción del área de adsorción y un declive en la actividad de las enzimas antes mencionadas. La apoptosis de los enterocitos mediada por *Giardia* es dependiente de caspasa 3 y 9 y ha sido determinada tanto en biopsias duodenales como en modelos *in vitro* (Chin et al., 2002; Panaro et al., 2007; Troeger et al., 2007).



**Figura 13. Patofisiología de la Giardiasis**

*Giardia* induce altos niveles de apoptosis en el epitelio intestinal vía la activación de caspasa 3 y 9. Las proteínas ZO-1, F-actina y α-actinina se relocalizan del complejo de unión apical al interior de la célula vía activación de caspasas 3 y la cinasa de la cadena ligera de miosina. La ruptura de complejo de unión apical causa un incremento en la permeabilidad que facilita la translocación de antígenos luminales hasta el compartimento basal que promueve el reclutamiento de linfocitos CD8<sup>+</sup>, los cuales inducen el acortamiento de las microvellosidades de los enterocitos reduciendo la superficie de absorción y la deficiencia de enzimas provocando malabsorción intestinal. La acumulación de carbohidratos sin digerir y la secreción de iones genera un gradiente osmótico que resulta en la pérdida de agua, distensión intestinal y peristalsis incrementada generando malabsorción e hipersecreción de cloro que lleva al desarrollo de diarrea. Tomado de (Lujan and Svärd, 2011).

En estudios de transcriptómica se ha determinado que durante la interacción del trofozoíto con las células epiteliales se inducen una serie de genes relacionados con la apoptosis, mientras que la expresión de genes relacionados con el ciclo celular disminuye (Roxstrom-Lindquist et al., 2005). Al respecto se ha mostrado que el trofozoíto de *Giardia* consume la arginina de la célula epitelial lo cual la inhibe el ciclo celular (Stadelmann et al., 2012a).

Estos estudios y otros llevados a cabo en modelos murinos sugieren que *Giardia* puede alterar la proporción entre células proliferativas y diferenciadas en el intestino como un mecanismo para prolongar su adhesión y la colonización y que tiene como resultado la disminución de las enzimas intestinales como las disacaridasas (Bhargava et al., 2015; Einarsson et al., 2016; Solaymani-Mohammadi and Singer, 2011, 2013). La disminución en la actividad de las enzimas del intestino delgado involucradas en la obtención de nutrientes parece ser dependiente de la cepa del parásito que infecta al hospedero encontrándose que las cepas GSH y WB son las mayores inductoras de esta descompensación (Solaymani-Mohammadi and Singer, 2011), sin embargo los productos del parásito responsables de estas diferencias e inductores de estos cambios en el intestino no han sido identificados.

Al respecto la adhesión del trofozoíto de *Giardia* al epitelio intestinal parece ser el elemento principal en la inducción de la pérdida de la integridad de la barrera epitelial, la disminución en la resistencia transepitelial y el incremento de la permeabilidad intestinal a través de la alteración del complejo apical de uniones estrechas que incluye la alteración de F-actina, ZO-1, Claudina-1 y  $\alpha$ -actinina un componente del anillo de actinmiosina. Ésta última regula el flujo paracelular por efecto directo en la cinasa de la cadena ligera de miosina y en el citoesqueleto de actina vía la interacción con micro dominios ricos en balsas lipídicas en la membrana del trofozoíto (Buret et al., 2002; Humen et al., 2011; Maia-Brigagao et al., 2012; Scott et al., 2002; Troeger et al., 2007). Aunque la adhesión de *Giardia* a la célula epitelial es el primer paso en la cadena de los efectos que dañan al enterocito se ha mostrado que durante este proceso mecánico *Giardia* produce y libera al medio factores que podrían participar en la inducción de la patofisiología de la Giardiasis. No obstante aún no se ha dilucidado la importancia biológica de estos factores durante la infección existen evidencias que señalan su implicación en este proceso importancia como lo han reportado en estudios en los que filtrados de cultivos de *Giardia* dañan cultivos de fibroblastos o incrementan la contractilidad del musculo liso en jerbos o que inducen citotoxicidad en células de ovario de hámster chino (Cotton et al., 2014; Nash et al., 1983; Olson et al., 1996; Papanastasiou et al., 1996; Papanastasiou et al., 1997b),

**Tabla 3. Principales efectos patofisiológicos de *Giardia duodenalis* y sus mecanismos**

<b>Respuesta patofisiológica inducida por <i>Giardia</i></b>	<b>Posibles mecanismos involucrados</b>
Apoptosis de las células del epitelio intestinal	Activación de los factores pro- apoptóticos Caspasas 3,8 y 9, incremento de Bax. Inhibición de los factores anti-apoptóticos: disminución de Bcl-2, degradación de Poli Adenosina difosfato Ribosa Polimerasa (PARP)
Arresto del ciclo celular de los enterocitos	Pérdida de arginina del enterocito, regulación positiva de genes reguladores del ciclo celular
Disfunción de la barrera intestinal	Deslocalización de claudina-1 y $\alpha$ -actinina; deslocalización de ZO-1 mediada por caspasa-3; Deslocalización de ZO-1 y F-actina mediada por la cinasa de la cadena ligara de miosina
Hipermotilidad en el intestino delgado	Producción de Óxido nítrico neuronal, activación de la respuesta inmune adaptativa, desgranulación de las células cebadas
Acortamiento de las microvellosidades y reducción de la superficie de absorción	Activación de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> por la apertura de la barrera epitelial y la presencia de productos de excreción/secreción del parásito en el lado basal
Hiperplasia de las criptas	Alteración de la relación vellosidad-cripta
Incremento en la producción de moco	Incremento del número de células caliciformes en las vellosidades intestinales
Deficiencia en la actividad de las enzimas del intestino delgado	Acortamiento de las microvellosidades, disminución de la superficie de absorción
Malabsorción de nutrientes, electrolitos y agua	
Acumulación de fluidos en el intestino	Enterotoxina de 58 kDa no caracterizada

Adaptado de (Cotton et al., 2011)

Por otra parte, los análisis a nivel transcripcional de esta interacción utilizando modelos *in vitro* han mostrado que la adhesión induce la regulación positiva o negativa de 200 genes. Entre los transcritos con mayor incremento se encuentran cisteín proteasa, proteínas de membrana ricas en cisteína (HCMPs), VSPs, proteínas metabólicas como Enolasa, Arginina deaminasa (ADI) y Ornitina carbamoil transferasa (OCT) así como proteínas involucradas en la adhesión y el factor de elongación 1- $\alpha$ . Todas estas son inmuno-dominantes durante la infección (de Carvalho et al., 2008; Ma'ayeh and Brook-Carter, 2012; Palm et al., 2003; Ringqvist et al., 2011; Ringqvist et al., 2008; Rodriguez-Fuentes et al., 2006). En particular el papel que tienen las proteasas durante la interacción parásito-célula es una línea de investigación abierta en el estudio de *Giardia* y la Giardiasis pues en su genoma existen numerosos genes de cisteín proteasas tipo catepsina (Manko et al., 2017).

La relevancia de su estudio radica en que en otros parásitos esta clase de proteasas participan en mecanismos para evadir la respuesta inmunológica del hospedero y este fenómeno podría presentarse también en *Giardia* (Cotton et al., 2014). En este contexto, recientemente se ha demostrado que en la cepa GS/M la Catepsina tipo B degrada a la citosina CXCL8, un potente atrayente de células polimorfonucleares, que median la inflamación en el hospedero por lo que la reducción en los niveles de esa citosina resulta en un reclutamiento menos efectivo de PMN lo cual explicaría la nula respuesta pro-inflamatoria en los individuos infectados con *Giardia* (Cotton et al., 2014). Dentro de estos productos de excreción/secreción también se ha identificado a una glicoproteína de 58 kDa denominada ESP en la cepa de *G. duodenalis* Portland 1. Se ha postulado que ésta es una enterotoxina pues induce la acumulación de fluidos en el intestino de ratones e induce cambios morfológicos en la línea epitelial HEp-2 al interactuar con una proteína de 41 kDa en la membrana del enterocito. Se cree que podría estar actuando al activar una vía de señalización acoplada a proteínas G que lleva al incremento en los niveles de cAMP y produce la movilización de calcio, regulando el transporte de electrolitos (Gorowara et al., 1992). Esta enterotoxina también incrementa los niveles de IP3, otro segundo mensajero que también moviliza el calcio intracelular y que puede ser el responsable de la caída de la resistencia transepitelial, así como la relocalización de los filamentos de actina y de proteínas relacionadas como villina. Lo anterior sugiere que *Giardia* puede inducir la activación de varias vía de señalización al mismo tiempo y cuyos

efectos al final convergen en secreción y malabsorción en el epitelio intestinal (Shant et al., 2002).

Por último, investigaciones recientes sugieren el papel del ambiente en el intestino en el efecto de *Giardia* sobre los enterocitos; específicamente en el papel de la microbiota sobre la infección y la estimulación que ésta ejerce en la patogenicidad del trofozoíto. Existen indicios por ejemplo de una asociación entre *Giardia* y *H.pylori* y de efectos antagonistas con *Lactobacilli*, un componente de la microbiota; otros estudios han mostrado que la patogénesis del aislado GS/M-H7 depende de la microbiota del hospedero, en un modelo murino (Ankarklev et al., 2012; Singer and Nash, 2000a; Torres et al., 2000). Recientemente se ha reportado que *Giardia* cambia la organización de la microbiota y del biofilm de las bacterias del intestino de manera cisteín proteasas dependiente y que lo anterior tiene posibles implicaciones en la patogénesis como la malabsorción de nutrientes y la inmuno-modulación que puede llevar al desarrollo de desórdenes gastrointestinales post-infección como hipersensibilidad visceral (mediada por el incremento en *c-fos*) y el síndrome del intestino irritable (Beatty et al., 2017; Cotton et al., 2015; Halliez et al., 2016; Keselman et al., 2016). Estos estudios describieron que la desorganización de la microbiota permite la translocación de las bacterias a través de la barrera intestinal promoviendo la apoptosis y la ruptura de las uniones estrechas así como la producción de citosinas pro-inflamatorias en modelos murinos (Beatty et al., 2017).

### **Respuesta inmunológica del hospedero**

La respuesta inmunológica contra *Giardia* es distinta a la que se activa por otros parásitos intestinales siendo su principal característica la falta de respuesta inflamatoria exacerbada ya que este parásito no es invasivo, aunque recientemente se reportó un aislado con potencial invasivo (Reynoso-Robles et al., 2015). Antes de la colonización del epitelio intestinal el trofozoíto debe enfrentarse a las barreras naturales del organismo. En primera instancia existe una sobreproducción de moco por parte de las células caliciformes del epitelio intestinal. Esta hipersecreción ayuda a evitar la colonización del epitelio pues evita la adhesión de los trofozoítos, los cuales pueden ser eliminados por los movimientos peristálticos del intestino. Sin embargo, para evadir este mecanismo de defensa *Giardia* secreta la enzima Enolasa que se une a la mucina y permite al parásito adherirse (Muller and von Allmen, 2005). Además

investigaciones preliminares muestran que los trofozoítos de *Giardia* pueden degradar a la proteína MUC2 para disminuir la capa de moco y permitir la colonización (Cotton et al., 2015). La microbiota del intestino también es considerada una barrera para la colonización, en estudios *in vitro* organismos presentes en la flora intestinal como *Lactobacillus johnsonii* inhiben la proliferación de trofozoítos al parecer porque inducen la producción constante de IgA, IgG, defensinas y linfocitos T CD4+ en las placas de Peyer (Goyal and Shukla, 2013; Schofield et al., 1991). Estudios en ratones mostraron que la susceptibilidad a la infección con *Giardia* parece ser dependiente del tipo de microbiota intestinal en el hospedero (Singer and Nash, 2000a). Así mismo se mostró que *Giardia* puede condicionar la respuesta de las bacterias comensales a otros parásitos intestinales como *C. elegans* evitando que colonicen (Gerbaba et al., 2015), lo anterior al parecer mediado por la estimulación de la producción de los péptidos antimicrobianos defensina 2 (HBD-2) y factor Trefoil 3 (TFF3) de manera Catepsina B dependiente (Manko et al., 2017).

Otro mecanismo de la respuesta innata que está involucrado en el control de esta infección es la producción de óxido nítrico (NO) por el enterocito así como por macrófagos presentes en el epitelio intestinal que ingieren a los trofozoítos y los eliminan por mecanismos oxidativos (Roxstrom-Lindquist et al., 2006).

En condiciones *in vitro* el NO inhibe el crecimiento, la proliferación, el enquistamiento y desenquistamiento de *Giardia*. Sin embargo se ha comprobado que *Giardia* puede evadir este mecanismo tomando la arginina del medio, que es utilizada en la producción de NO por parte del enterocito y catabolizarla para obtener energía, por lo tanto se establece una competencia entre el parásito y el enterocito (Pavanelli et al., 2010; Yichoy et al., 2011). Las criptidinas o  $\alpha$ -defensinas que se sintetizan en las células de Paneth, localizadas en el intestino también muestran un efecto citotóxico sobre los trofozoítos de *Giardia* e interfieren con el crecimiento del parásito (Yichoy et al., 2011).

Por otra parte, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) es capaz de revertir el daño al epitelio intestinal provocado por *Giardia* sin tener un efecto microbicida. Al parecer EGF fosforila a F-actina y ZO-1 estabilizando el citoesqueleto del enterocito e interfiriendo posiblemente con la adhesión del parásito y protegiendo al enterocito de la apoptosis producida por la alteración de las proteínas de las uniones estrechas (Buret et al., 2002).

Una vez establecido el trofozoíto en el epitelio intestinal las células dendríticas, las células cebadas y las células M de las placas de Peyer tienen un papel relevante en el control de la Giardiasis (Schofield et al., 1991). Las células cebadas participan en la liberación de IL-6 o TNF $\alpha$ , histamina y prostaglandinas que pueden incrementar la motilidad intestinal ayudando a la eliminación del parásito (Li et al., 2007). En modelos murinos se ha observado que los niveles de las citosinas IL-6, IL-2, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , y la proteína C reactiva se encuentran incrementados, mientras que ratones deficientes en IL-6 y TNF $\alpha$  no pueden eliminar la infección. En contraste los niveles de IL-8 son bajos, lo que puede explicar porque no se desarrolla un proceso inflamatorio. Estudios recientes al respecto han mostrado que las infecciones con *Giardia* pueden proteger al hospedero de otros patógenos que causan altos niveles de inflamación debido a esta regulación sobre IL-8 (Cotton et al., 2015; Cotton et al., 2014; Manko et al., 2017). La catepsina B de *Giardia* puede degradar a la IL-8 reduciendo de esta manera la infiltración de neutrófilos (Cotton et al., 2014).

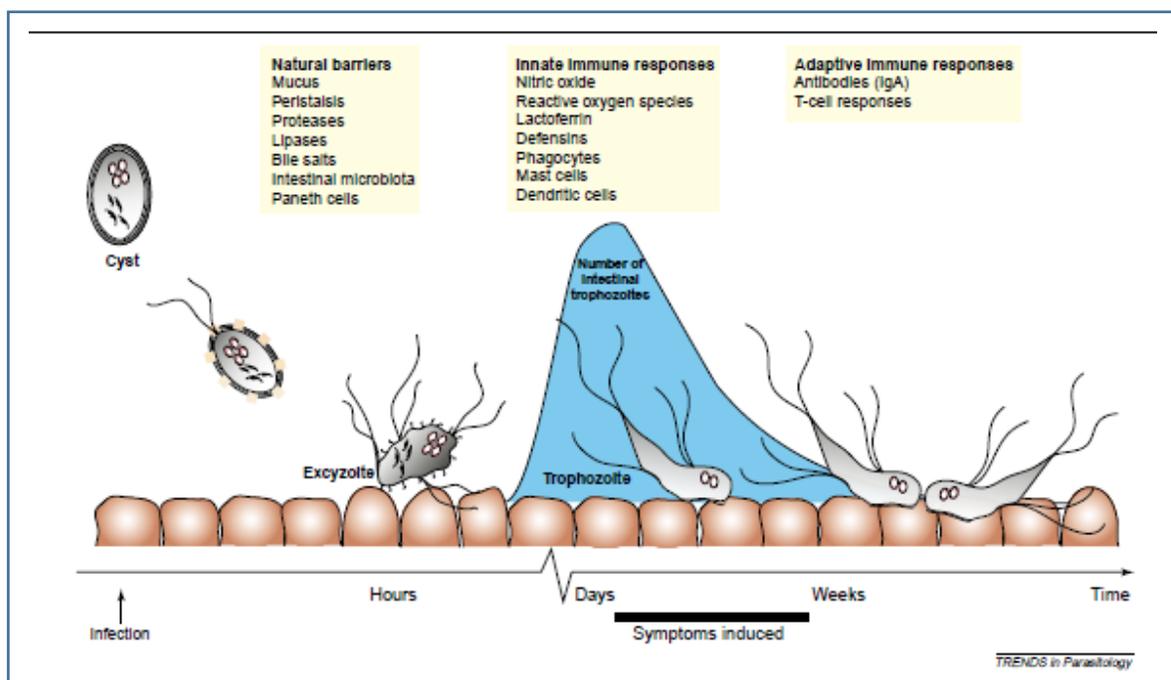
En cuanto a las células T CD4  $\alpha\beta$  estas producen citocinas importantes para la regulación de la respuesta inmune; el INF- $\gamma$ , el cual puede regular la producción de NO y de la IL-6 mientras que los linfocitos T CD8 y las células NK no tienen una actividad relevante en el control del parásito. Sin embargo, en general, no parece existir una respuesta Th1 o Th2 característica (Muller and von Allmen, 2005; Schofield et al., 1991; Singer and Nash, 2000b; Yichoy et al., 2011; Zhou et al., 2007). Estudios más recientes muestran que una serie de citocinas se encuentran incrementadas: IL17A, MIP-1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , CD40L, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , IL6, IL10, IL13 y GM-CSF y ratifican que no se encuentra una respuesta Th1 o Th2 polarizada (Saghaug et al., 2015). Al respecto los estudios transcripcionales de la respuesta inmunológica contra *Giardia* han mostrado que las quimiocinas CCL20 son inducidas en modelos *in vitro* y que otros 96 transcritos relacionados con mecanismos inmunológicos se encuentran incrementados durante la infección. La lectina de unión a manosa (MBL) es un ejemplo, ya que recientemente se mostró que esta proteína se une a los trofozoítos induciendo su lisis *in vitro* (Evans-Osses et al., 2010). Por otra parte, numerosos genes de células B y células cebadas también se encuentran incrementados en su expresión. En el caso de las células B estos corresponden a los genes de IgM e IgG1y al transcrito de la proteasa 1 (Mcp1), este último fue uno de los transcritos más abundantes a los 10 días post-infección además de genes asociados con el redox celular y la metaloproteasa 7 que actúa en el procesamiento de

defensinas, expresadas en las criptas (Tako et al., 2013). También se ha reportado recientemente que la producción de IL17 es importante en el control de *Giardia* tanto en modelos murinos como humanos (Dann et al., 2015; Dreesen et al., 2014; Saghaug et al., 2015). En estos estudios se encontró que esta interleucina está sobre-expresada en la fase temprana de la infección, que es necesaria para el transporte de IgA al lumen intestinal y para la eliminación de *Giardia*. Por lo anterior se postula que la respuesta Th17 es necesaria para la protección y la respuesta de memoria contra este parásito (Saghaug et al., 2015).

Un aspecto importante en la respuesta inmunológica contra *Giardia* es la respuesta contra los productos de excreción/secreción del parásito. Estudios previos han caracterizado la respuesta inmune en ratones infectados vía oral o sistémica con estos antígenos de entre 83 and 30 kDa, mostrando que existe una respuesta específica de anticuerpos sistémica y de mucosa así como cambios histológicos en el intestino delgado (Jimenez et al., 2009). En ratones BALB/c estos productos inducen una respuesta Th2 y la circulación de los anticuerpos IgG1-, IgG2a-, IgA e IgE, mientras que en las inmunizaciones con extractos solubles los títulos de anticuerpos son bajos indicando el poder inmunológico de las proteínas excretadas/secretadas (Jimenez et al., 2009). La producción de citocinas estimuladas por los productos de excreción/secreción muestra un alto incremento en IL-4, 7 días post-infección, en este modelo murino, aunque 14 días después esta se reduce y se incrementa la producción de INF- $\gamma$  e IL-5. Este perfil está relacionado con la reducción de quistes 21 días después de la infección, concomitante con el incremento en la producción de IL-10 y la reducción en la producción de INF por lo que esto puede ser un mecanismo por parte del parásito para regular la producción de IFN el cual también incrementa la producción de Óxido nítrico (NO) (Roxstrom-Lindquist et al., 2006). Otra evidencia de la importancia de estos productos en la modulación de la respuesta inmune es que cuando estos son tratados con el inhibidor de cisteína proteasas E-64 antes de la infección el perfil de citocinas tipo Th2 se ve reducido. Al respecto recientemente se ha mostrado que uno de estos productos secretados por el parásito pueden modular la respuesta inmune; específicamente la catepsina B degrada a la citocina CLCX8, un potente quimiotáctico de polimorfonucleares con lo que disminuye el número de estas células marcadores de la inflamación (Cotton et al., 2014; Faubert, 2000; Jimenez et al., 2000; Karr and Jarroll, 2004; Langford et al., 2002; Palm et al., 2003; Scott et al., 2004; Singer and Nash, 2000b; Stefanic et al., 2009).

Por último, la fase tardía de la infección con *Giardia* es mediada por células B. En el epitelio intestinal se encuentran principalmente los anticuerpos IgA e IgM, cuyos niveles se

encuentran elevados en la Giardiasis. En experimentos *in vitro* se ha observado que los anticuerpos de isotipo IgA se incrementan durante la fase tardía de la infección (10-13 días, en ratones); el mecanismo por el que estos actúan es mediante la exclusión inmune al cubrir a los trofozoítos, inmovilizarlos y separarlos del epitelio sin un efecto citotóxico en presencia del complemento (Yichoy et al., 2011). En cuanto a los anticuerpos de isotipo IgM e IgG estos matan al trofozoíto en presencia del complemento, formando poros en su membrana. *Giardia* también induce la producción del anticuerpo IgE, el cual identifica específicamente antígenos entre 175 y 17 kDa en los productos de excreción/secreción (Heyworth, 1992). No obstante, la efectividad de los anticuerpos se ve reducida por la habilidad del parásito para llevar a cabo cambios en sus antígenos de superficie las proteínas variables de superficie (VSP) pues los anticuerpos ejercen presión selectiva sobre los antígenos del parásito favoreciendo su recambio y si la respuesta inmune es deficiente se da lugar a reinfecciones.



**Figura 14. Respuesta inmune contra *Giardia***

Los síntomas de la Giardiasis se presentan 15 días después de la infección. El epitelio intestinal tiene un papel central en la respuesta inmune innata y adaptativa. Los diferentes componentes del sistema inmune intestinal se muestran en orden en el cual interactúan contra *Giardia* durante la infección, en los recuadros. El número de trofozoítos en el intestino durante el transcurso de la infección se representan como la curva en azul. Tomado de (Roxstrom-Lindquist et al., 2006).

Varios estudios han reportado que se puede inducir protección contra *Giardia* al inocular trofozoítos que expresan un repertorio amplio de VSPs por lo que lo que estos antígenos son candidatos potenciales para el desarrollo de vacunas contra *Giardia* (Adam, 2001; Nash et al., 2001; Rivero et al., 2010). Se han identificado otras proteínas inmunogénicas de *Giardia*: de la pared del quiste, de choque térmico, los antígenos GTA-1 y 2, giardina, tubulina, enolasa, fructosa-1, 6-bifosfato aldosa, ornitina carbamoil transferasa, arginina deaminasa, uridina fosforilasa, el antígeno 5G8 (con similitud a una VSP) y la proteína BIP (Lopez-Romero et al., 2017; Quintero et al., 2017; Singer and Nash, 2000b).

Como previamente se mencionó, la Giardiasis ha sido asociada con el síndrome de fatiga crónico, al respecto se ha reportado que existe una asociación entre los niveles de sCD40L en suero y el padecimiento de este síndrome sugiriendo que se establece una respuesta de células T de memoria contra *Giardia* (Hanevik et al., 2017).

### **Las Proteínas Variables de Superficie**

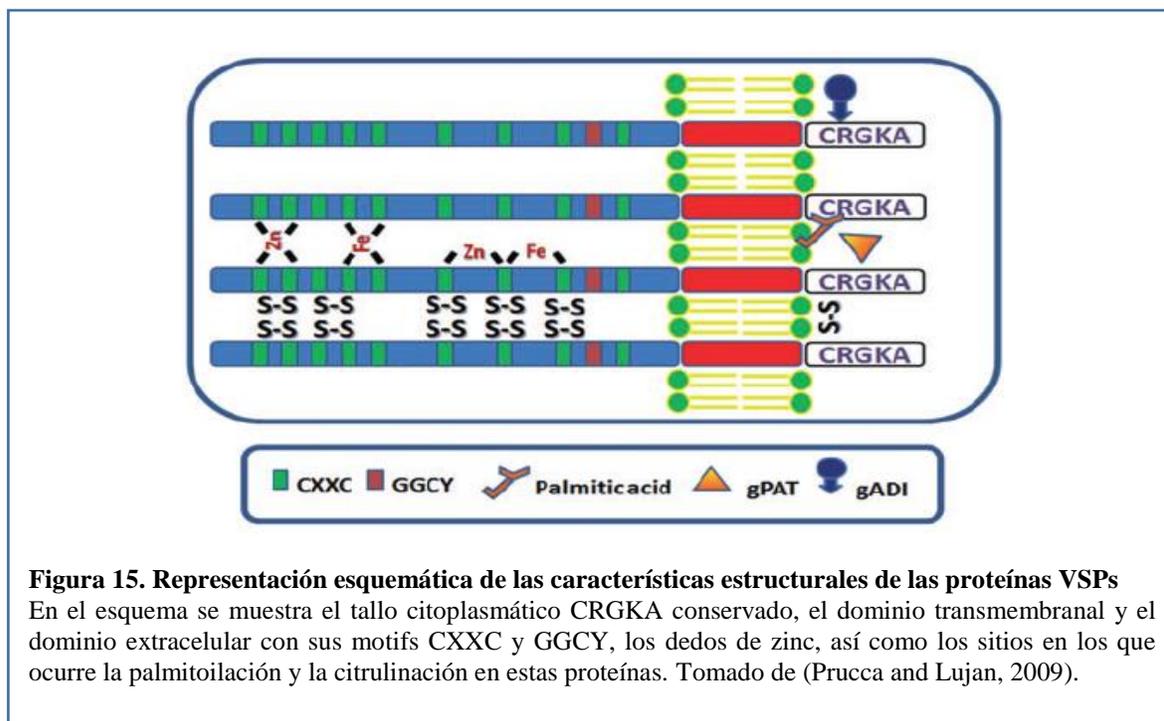
Las VSPs son proteínas integrales de membrana tipo 1 que se reciclan constantemente en la superficie del trofozoíto y se secretan al medio extracelular (Papanastasiou et al., 1996; Pimenta et al., 1991). Hasta el momento, se han reportado 165 proteínas que poseen las características de esta familia, con pesos que van de 20 a 200 kDa (Nash, 1992; Prucca and Lujan, 2009). Estas proteínas se sintetizan en el retículo endoplásmico y se transportan a la membrana celular en vacuolas a donde son dirigidas por un péptido señal hidrofóbico de 14 a 17 aminoácidos. El extremo C-terminal de estas proteínas de 38 kDa se encuentra altamente conservado y está a su vez conformado por un dominio transmembranal de 23 a 25 aminoácidos y un tallo invariable formado por los aminoácidos CRGKA anclado al citoplasma. Este tallo sufre modificaciones postraduccionales como palmitoilación en la cisteína y citrulinación en el residuo de arginina modificaciones que han sido implicadas en la segregación a las balsas lipídicas o como una señal de cambio respectivamente (Papanastasiou et al., 1996; Touz et al., 2008). Cerca de la región transmembranal pero en el extremo N-terminal extracelular está presente una secuencia específica de ruptura NKSGLS que libera a este extremo del C-terminal anclado a la membrana siendo probablemente este el mecanismo por el cual estas proteínas se liberan al medio (Papanastasiou et al., 1996), sin embargo esta secuencia solo se encuentra en la mitad de las proteínas que integran la familia de las VSP de *Giardia* (Adam et al., 2010).

Los genes que codifican para las proteínas VSPs se agrupan en clusters de 2 a 9 genes que se distribuyen a través de los cinco cromosomas de *Giardia*. Estas proteínas son muy similares en la región 5' río arriba del marco de lectura, lo que apoya la hipótesis de que se originaron por divergencia y recombinación, mientras que la región 3' tiene una porción altamente conservada de 120 pb que codifican el dominio C-terminal conservado en las VSPs. Otra característica de esta familia de genes es que no tienen intrones y sus 5' UTR y 3'UTR son muy cortos y si bien no se ha descrito un promotor para esta familia de genes (Kulakova et al., 2006) varios contienen la secuencia Py AatgTT en el extremo 5', la cual se ha postulado como un elemento iniciador (Inr); la ausencia o diferencia en estos iniciadores putativos sugiere que estos tienen una función en la expresión selectiva de estas proteínas (Adam et al., 1988).

Estructuralmente estas proteínas se caracterizan por ser ricas en cisteína (aproximadamente 12% de los aminoácidos totales) con una alta frecuencia de los motifs Cys-X-X-Cys que se ha sugerido proveen propiedades estructurales que les confieren resistencia a la digestión proteolítica y estabilidad redox en la superficie del parásito (Brown et al., 1998; Papanastasiou et al., 1997b) (Papanastasiou et al., 1997a; Wang et al., 2009). En particular los datos experimentales sugieren que los motifs GGCY pueden ser inmunogénicos ya que anticuerpos contra un fragmento que contenía estas secuencias causó el desprendimiento y la agregación de trofozoítos de *Giardia* (Adam et al., 2010). La parte central es altamente variable entre cada VSP, poseen repetidos en tándem en la porción que se encuentra más expuesta al ambiente y en treinta genes de proteínas VSPs analizados se determinó que todos poseen estos repetidos, pero estos son únicos en cada uno de los genes, comprendiendo una longitud de 105 a 516 pares de bases y con una frecuencia que va de dos a más de veinte repetidos. Al parecer el número y el tipo de repetidos juegan un papel importante en la modulación de la respuesta inmune del hospedero (Adam et al., 2010). Así mismo se han identificado motifs de dedo de Zinc que unen hierro, zinc, cadmio, cobalto, cobre y magnesio, característicos de proteínas que unen metales. Esta propiedad se ha relacionado con la deficiencia de estos metales en individuos infectados con *Giardia*, hecho que puede contribuir a algunos de los síntomas clínicos de la Giardiasis. Además, se ha propuesto que la coordinación con metales puede estabilizar a estas proteínas brindándoles resistencia al ataque proteolítico y manteniendo la integridad de la superficie. Entonces las VSPs pueden además

de funcionar como antígenos unir metales e inhibir a enzimas intestinales como carboxipeptidasas (Adam et al., 2010; Lujan et al., 1995).

En una revisión reciente se determinó que los únicos elementos en las VSPs necesarios para su localización en la membrana son dos secuencias estructurales bien conservadas en el extremo carboxilo terminal; con base en ellos solo 73 genes se identificaron como *vsp* en la base de datos GiardiaDB. De este grupo de VSPs, cinco carecen del extremo C-terminal CRGKA y 3 tienen uno modificado por tal razón se planteó que la secuencia CRGKA no se requiere para la expresión de las proteínas VSP en la membrana celular (Li et al., 2013).



Por otra parte se han identificado VSPs con secuencias “atípicas” como el dominio BmKX, un péptido pequeño bio-activo presente en el veneno de escorpión que actúa como un bloqueador de canales de potasio; dominios Lamina\_EGF y EGF\_CA así como dominios TIL y Furin-Like (proteasa) que son ricos en cisteínas (Adam et al., 2010). Si bien la función de estos dominios, así como su distribución dentro de esta familia de proteínas no ha sido determinada, su variedad puede implicar diversidad en las funciones de las proteínas VSPs haciéndolas blanco de estudio para determinar el papel que juegan dentro de la interacción parásito-hospedero y en el establecimiento de la infección.

Al respecto, varios estudios muestran que la expresión de estas proteínas se incrementa durante la interacción del trofozoíto con células epiteliales, constituyendo casi un tercio del total de proteínas incrementadas, y que estas se pueden encontrar como formas solubles en los medios de interacción (Bermudez-Cruz et al., 2004; Cabrera-Licona, 2010; Emery et al., 2016; Ma'ayeh and Brook-Carter, 2012; Nash, 1997; Papanastasiou et al., 1996), sugiriendo que existe una selección de variantes favorables para la patogénesis o virulencia (Emery et al., 2016; Emery et al., 2014; Gargantini et al., 2016; Singer et al., 2001). Recientemente se reportó en un estudio de proteómica comparativo entre dos cepas del ensamblaje A que existe una asociación entre la gran variación antigénica, es decir el número de proteínas VSP en la cepa BRIS/957HEPU/2041 y su virulencia en un modelo murino (Emery et al., 2014).

Así mismo se reportó que durante el enquistamiento existe una retención de la diversidad de las VSPs en aislados con potencial zoonótico sugiriendo que estas pueden participar en la capacidad infectiva del quiste así como en la re-infección (Emery et al., 2015).

### **Variación antigénica**

*Giardia* puede producir una infección persistente o re-infectar al hospedero haciendo uso de estrategias para evadir su sistema inmunológico; entre éstas se encuentra el mecanismo de variación antigénica, que constituye una adaptación para sobrevivir a las condiciones dentro del intestino. Esta consiste en un cambio continuo de los antígenos específicos de la superficie, las VSPs que recubren la superficie completa del trofozoíto incluyendo los flagelos para evadir la respuesta inmune (Mowatt et al., 1991). En el genoma del ensamblaje A de *Giardia* cepa WB se han identificado que del 3 al 5% son regiones codificantes para VSP, de las cuales 218 son genes completos y 75 incompletos (Adam et al., 2010). De esta familia de genes solo una proteína VSP se expresa en la superficie del parásito en un tiempo particular excepto durante el cambio de antígeno y el enquistamiento aunque en una misma población puede haber trofozoítos que expresen distintas VSPs, es decir su expresión no es homogénea (Carranza et al., 2002; Prucca and Lujan, 2009). La primera descripción de este fenómeno de evasión se remonta a 1988 cuando dos equipos de investigación lo observaron tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Adam et al., 1988; Aggarwal and Nash, 1988). En estudios *in vitro* se determinó que poblaciones de trofozoítos que son cultivados en presencia de anticuerpos monoclonales contra VSPs específicas se agregan y mueren (Nash et al., 1988). Sin embargo, este recambio también ocurre en ausencia de presión inmunológica cada 6 a 13

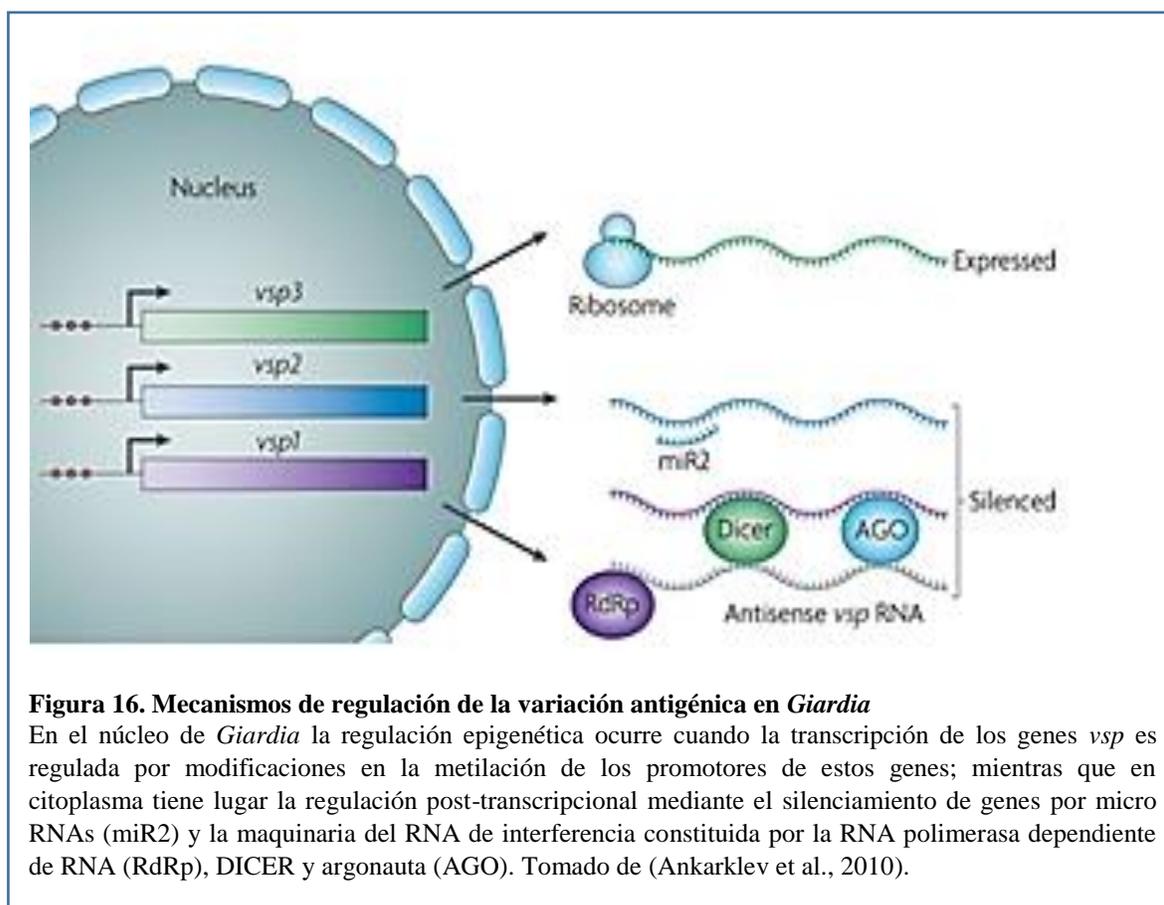
generaciones (Nash, 2002; Lujan *et al.* 1995) por lo que se cuestionó la relevancia de la variación antigénica en la inducción de infecciones persistentes y se propuso que pueden tener funciones adicionales en la biología de *Giardia*. Sin embargo el desacoplamiento de la variación genética en modelos experimentales de infección mostró su importancia como un mecanismo adaptativo para evitar la acción del sistema inmune del hospedero (Rivero *et al.*, 2010).

El mecanismo por el cual una sola VSP se expresa en la superficie del parásito, así como la vía por la cual se induce el recambio no se ha establecido. Se ha propuesto que el recambio se da como respuesta a la citotoxicidad mediada por anticuerpos y que al crearse una respuesta inmunológica contra la VSP que expresa el trofozoíto se encienden vías de señalización que llevan a la citrulinación del residuo de arginina del tallo citoplasmático mediado por la enzima ADI; sin embargo no se ha demostrado cómo esta modificación induce el recambio (Touz *et al.*, 2008).

En general se cree que la variabilidad de estas proteínas es producto de la duplicación de genes, mutaciones o eventos de recombinación (Prucca and Lujan, 2009) además no que se ha detectado ninguna alteración de la secuencia de DNA de estos genes o re-arreglos que influyan en su expresión. Además, estos genes no tienen intrones y sus extremos 5'-3' UTR son extremadamente cortos y no tienen un promotor consenso por lo que se ha postulado que su regulación se da a nivel epigenético. Al respecto existen estudios que muestran que la expresión de una VSP es dependiente de la acetilación de histonas (Kulakova *et al.*, 2006) ya que de los cuatro alelos que *Giardia* posee para cada gen de las VSPs solo uno se expresa., así mismo se mostró que cerca del 1% de los genes *vsp* son modulados por la hiper-acetilación de histonas. (Carranza *et al.*, 2016; Gargantini *et al.*, 2012; Gargantini *et al.*, 2016; Sonda *et al.*, 2010; Yang and Adam, 1994). Al respecto recientemente se reportó que la disminución en la acetilación de la histona H4 K8 y la metilación de la histona H3K9 ocurren durante la variación antigénica y que estas modificaciones pueden participar en la regulación de la expresión de las VSPs (Carranza *et al.*, 2016). Se plantea que existe una intercomunicación entre las modificaciones de histonas y la vía del RNA de interferencia (Gargantini *et al.*, 2016).

En un estudio más reciente se postuló que un mecanismo de silenciamiento de genes post-transcripcional similar al RNA de interferencia regula la expresión de esta familia de

proteínas (Prucca et al., 2008). El gen de la proteína Argonauta, un miembro del complejo de silenciamiento RISC que participa en el proceso de silenciamiento por Dicer se encuentra en el genoma de *Giardia*. Cuando la expresión de los genes de Dicer y RdRP se silenciaron en , los trofozoítos más de una VSP se expresaron a la vez en sus superficies (Rivero et al., 2010). Sin embargo, aún no se esclarece cómo solo una VSP es seleccionada para expresarse sobre otras, ya que todos los transcritos de estas proteínas se transcriben continuamente (Faghiri and Widmer, 2011; Prucca et al., 2008; Saraiya et al., 2014a).



**Figura 16. Mecanismos de regulación de la variación antigénica en *Giardia***

En el núcleo de *Giardia* la regulación epigenética ocurre cuando la transcripción de los genes *vsp* es regulada por modificaciones en la metilación de los promotores de estos genes; mientras que en citoplasma tiene lugar la regulación post-transcripcional mediante el silenciamiento de genes por micro RNAs (miR2) y la maquinaria del RNA de interferencia constituida por la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), DICER y argonauta (AGO). Tomado de (Ankarklev et al., 2010).

Una hipótesis que se ha propuesto señala que la concentración del transcrito es la clave de la selección (Gargantini et al., 2012; Prucca et al., 2008). Los estudios al respecto han identificado unos RNA pequeños (snoRNA) que dan origen a micro RNAs (miRNA) que tienen como blanco 22 genes de VPS, de los cuales cinco de ellos miR 2, 4, 5, 6 y 10, tienen la capacidad de regular la expresión de 178 VSPs mediante mecanismos que pueden ser

cooperativos. La represión de la traducción por estos miRNA se ha establecido y se ha observado que el 88% de los genes *vsp* poseen al menos un sitio blanco para uno de estos cinco miRNAs (Saraiya et al., 2014b). Así, el mecanismo involucrado en permitir la expresión de solo una VSP puede incluir la regulación de la expresión por diversos miRNAs (Carranza and Lujan, 2010; Dolezal et al., 2005; Jenikova et al., 2011; Lauwaet et al., 2007; Li et al., 2013; Saraiya and Wang, 2008).

Los sitios blanco de estos miRNAs, se pueden localizar tanto en la región 3'-UTR, donde los genes de estas proteínas se encuentran más conservados, en el codón de paro en ambas regiones del ORF (Adam, 2000, 2001; Saraiya et al., 2014b). Se ha reportado que la región 3'-UTR de *Giardia* es de 80 nucleótidos (Franzen et al., 2013) pudiendo contener más de un sitio blanco para miRNA. La investigación más reciente al respecto mostró que cuando todos los sitios blancos están saturados con su correspondiente miRNA la expresión del *vsp* mRNA se puede suprimir completamente (Saraiya et al., 2014b). Estos estudios también mostraron que una variedad de combinaciones de miRNA puede suprimir efectivamente la expresión de cada *vsp* mRNA por lo que la redundancia podrían mantener la mayoría de los VSPs en un estado silencioso y se requerirían solo seis miRNA con sitios no superpuestos en el ORF para la represión total de los mRNA (Saraiya et al., 2014b). Además, recientemente se demostró que en *Giardia* los transcritos de las VSPs sentido y anti-sentido se transcriben al mismo tiempo, por lo que los transcritos con sus correspondientes anti-sentidos formarían RNAs de doble cadena. los cuales serían degradados por Dicer, mientras que el transcrito sin un anti-sentido sería la VSP expresada (Guo et al., 2014).

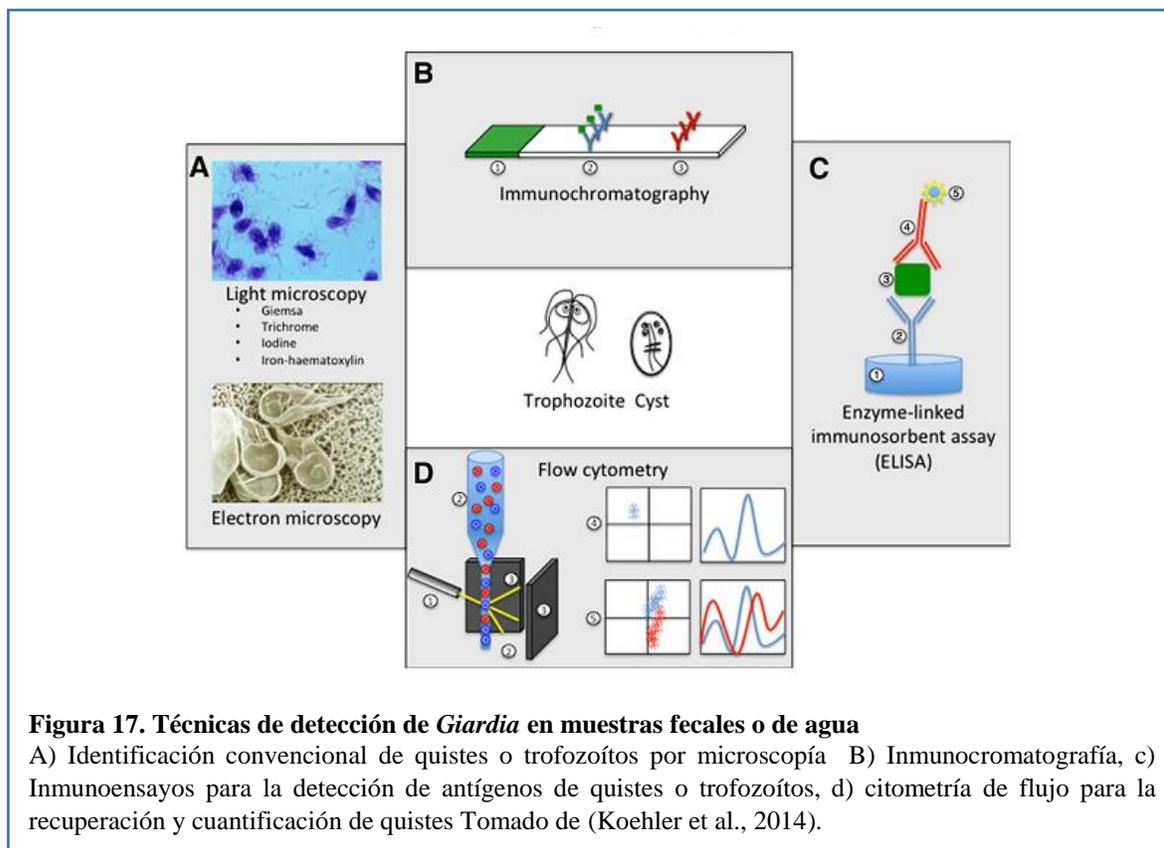
A grandes rasgos el mecanismo de silenciamiento inicia en el núcleo donde un miRNA primario es procesado por RNasaIII, Drosha/Pasha, para generar un pre-miRNA con forma de loop el cual es transportado hasta el citoplasma donde la RNasaIII, Dicer, la procesa hasta un miRNA de doble cadena. Posteriormente el RNA de doble cadena se une a la proteína Argonauta la cual libera esta forma transitoria y da lugar al miRNA, induciendo a la vez al complejo de silenciamiento miRISC; la interacción entre este complejo y el miRNA y su mRNA blanco resulta en la inhibición de la traducción y degradación del mRNA de los genes *vsp* (Prucca et al., 2008). En estudios más recientes demostraron que dentro de esta vía del RNA de interferencia pueden estar participando RNA helicasas que suplan la falta de este dominio en la proteína Dicer de *Giardia* (Gargantini et al., 2012).

## Diagnóstico

La gran variedad de síntomas clínicos que presenta la Giardiasis hace difícil el diagnóstico de esta parasitosis. En pacientes con cuadros diarreicos de manera rutinaria se realizan exámenes de para la determinación de *Giardia* sobre todo si el historial clínico del paciente muestra situaciones que involucren una higiene deficiente. Además, la infección con *Giardia* se distingue de una infección bacteriana o viral por la larga duración de los síntomas y por la pérdida de peso (Hill, 1993). Convencionalmente la detección de los quistes de *Giardia*, en el duodeno, heces y el ambiente o agua se lleva a cabo principalmente mediante el examen microscópico. La identificación de quistes e incluso trofozoítos en heces se realiza por métodos coprológicos como la concentración con formol o por sedimentación, seguido de tinción con Lugol, hierro-hematoxilina, Giemsa o tricrómica de Masson y observación al microscopio óptico (McHardy et al., 2014). Sin embargo los análisis se deben realizar en múltiples y sucesivas muestras fecales en un periodo de 1-2 semanas debido a la naturaleza intermitente de la excreción de quistes llegándose a obtener de esta manera la detección del 90% de las infecciones (Gardner and Hill, 2001; Soares and Tasca, 2016). En el caso de pacientes en los que no se puede obtener la muestra se llevan a cabo endoscopias en las que se toman de muestras de fluido duodenal y biopsias del tejido para detectar si el duodeno esta colonizado por trofozoítos (Gardner and Hill, 2001). Además de las pruebas coprológicas se han desarrollado pruebas más rápidas, sensibles, específicas y reproducibles que incluyen la detección de coproantígenos por inmunofluorescencia indirecta, inmunoensayos enzimáticos, inmunotinción, inmunohistoquímica e inmunocromatografía (Gardner and Hill, 2001; Johnston et al., 2003). El uso de la microscopía de fluorescencia y la fluorescencia directa con anticuerpos monoclonales contra *Giardia* acoplados a FITC (ITC-GmAb) los cuales reconocen epítopes específicos en el quiste incrementan la sensibilidad en la detección (93-100%) así como la especificidad (99.8-100%) para la detección de quistes en muestras fecales y ambientales (Koehler et al., 2014). Otros inmunoensayos enzimáticos han sido aplicados como pruebas de diagnóstico; estas incluyen ensayos de ELISA con una especificidad de 87-100% y una sensibilidad de 63-100%; e inmunocromatografías con especificidad de 79-100% y sensibilidad de 26-100% las cuales tienen como ventaja que pueden detectar la infección antes de la excreción de quistes en las heces y pueden ser empleados para la detección rápida en un gran número de muestras (Koehler et al., 2014).

En cuanto a la identificación de quistes en muestras de agua y ambientales, los métodos actuales se basan en la filtración, separación inmuno-magnética y la detección complementaria por inmunofluorescencia directa o microscopía de Normaski. La citometría de flujo también se aplica para la detección de quistes de *Giardia* en este tipo de muestras con la subsecuente inmuno-tinción y examen de microscopía; en particular esta técnica permite distinguir entre los quistes viables y no viables en una muestra al teñir los núcleos con yoduro de propidio (Koehler et al., 2014). También se aplican ensayos de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) para la detección de quistes basados en la hibridación con el RNA en una región de la subunidad pequeña del RNA ribosomal. En estas pruebas solo se pueden identificar quistes viables ya que el RNA es degradado en los quistes inviables, aunque no puede distinguir entre especies o ensamblajes.

En general existen limitaciones significativas en la detección y el diagnóstico de *Giardia* usando las técnicas convencionales de microscopía, bioquímicas, inmunológicas y serológicas. La desventaja principal de los métodos de diagnóstico mencionados es que no pueden diferenciar el genotipo/ ensamblaje al que pertenece el parásito causante de la infección ni ayudar a establecer si existen diferencias clínicas o epidemiológicas entre los ensamblajes A y B. Así se han utilizado técnicas de biología molecular como PCR, PCR de RFLPs, PCR en tiempo real e hibridación en muestras fecales para discriminar el ensamblaje que infecta al paciente (Helmy et al., 2009; Laude et al., 2016; Ng et al., 2005; van Lieshout and Roostenberg, 2015). Existen en el mercado kits de PCR multiplex para la detección de parásitos intestinales que son sensible para la detección de *Giardia* hasta en un 99.6% (Batra et al., 2016; Becker et al., 2017; Molling et al., 2016). En cuanto a estudios epidemiológicos a gran escala que permitan desarrollar genotipificación de alto rendimiento para las encuestas temporales y espaciales, así como el seguimiento de los cambios en el agua y el medio ambiente se consideran técnicas potenciales el PCR en tándem multiplex y Luminex (Koehler et al., 2014).

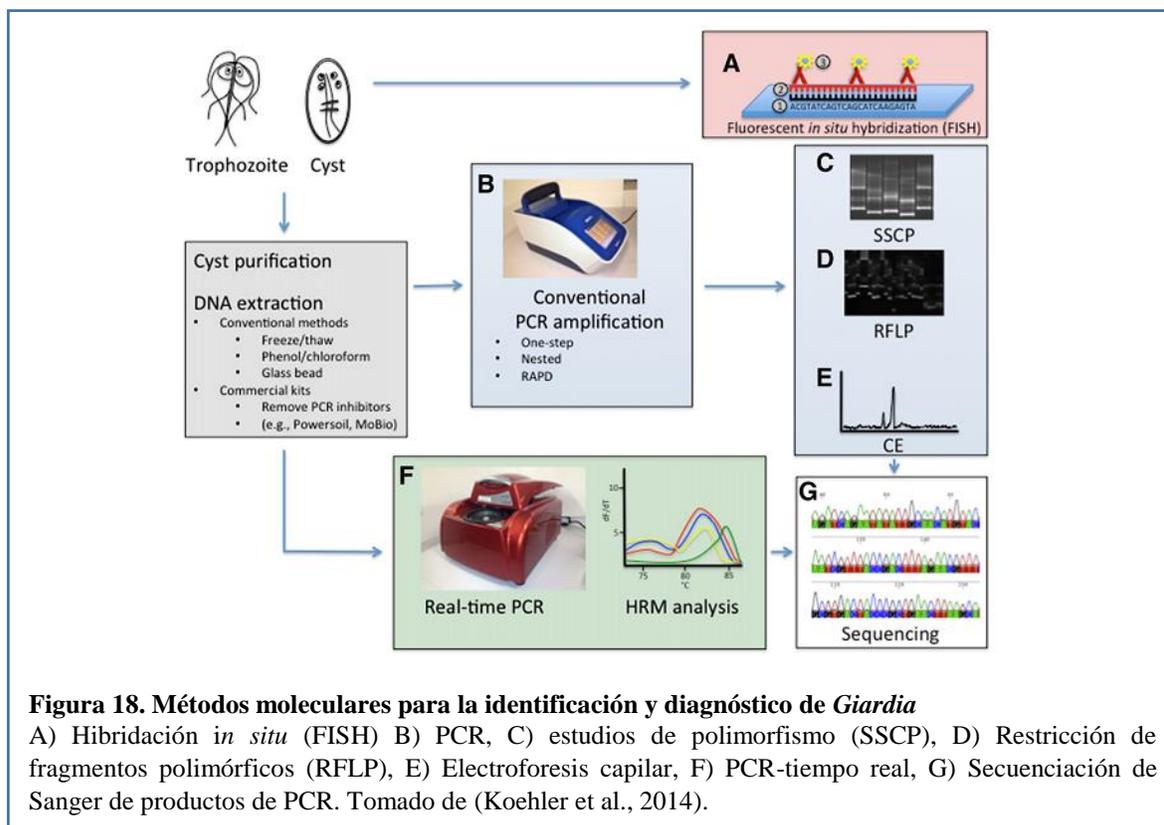


**Figura 17. Técnicas de detección de *Giardia* en muestras fecales o de agua**

A) Identificación convencional de quistes o trofozoítos por microscopía B) Inmunocromatografía, c) Inmunoensayos para la detección de antígenos de quistes o trofozoítos, d) citometría de flujo para la recuperación y cuantificación de quistes Tomado de (Koehler et al., 2014).

Al respecto se han hecho avances en el desarrollo de herramientas moleculares específicas y sensibles para la identificación y caracterización genética de *Giardia*, y el diagnóstico de Giardiasis. En particular, la identificación y clasificación de las especies y ensamblajes utilizando genes, tales como la unidad ribosomal SSU-rRNA, la enzima glutamato deshidrogenasa (gdh), beta-giardina, triosafosfato isomerasa (tpi) y el factor de elongación 1-alfa (ef1-alfa) en combinación con el rRNA han ayudado en la clasificación sistemática, la genética de poblaciones y la epidemiología de *Giardia*, y en la confirmación y el monitoreo de brotes en humanos y animales (Siripattanapipong et al., 2011; Wielinga and Thompson, 2007). Los ensayos de PCR basados en primers ensamblaje-específicos permiten la detección de *Giardia* ensamblaje A, B y E en muestras fecales con alta sensibilidad y especificidad (Van Lith et al., 2015). En el futuro se prevé que la secuenciación de todo el genoma de *Giardia* en conjunto con herramientas moleculares (ómicas) y bioinformáticas permitirá la definición de una amplia gama de marcadores genéticos para su uso en herramientas de diagnóstico específicas y sensibles así también como para estudiar la compleja red de factores

biológicos y ecológicos que intervienen en las interacciones entre *Giardia*, su hospedero y el medio ambiente (Koehler et al., 2014).



## Tratamiento

Una vez que se ha diagnosticado al paciente con Giardiasis se procede a elegir el tratamiento adecuado; ya que no existe una terapia farmacológica consenso debido a la variedad de síntomas que pueden presentarse en los individuos afectados y a que los fármacos disponibles pueden causar efectos adversos o ser contraindicados en ciertas situaciones clínicas; además de que la resistencia juega un papel importante en la infección (Gardner and Hill, 2001; Leitsch, 2015).

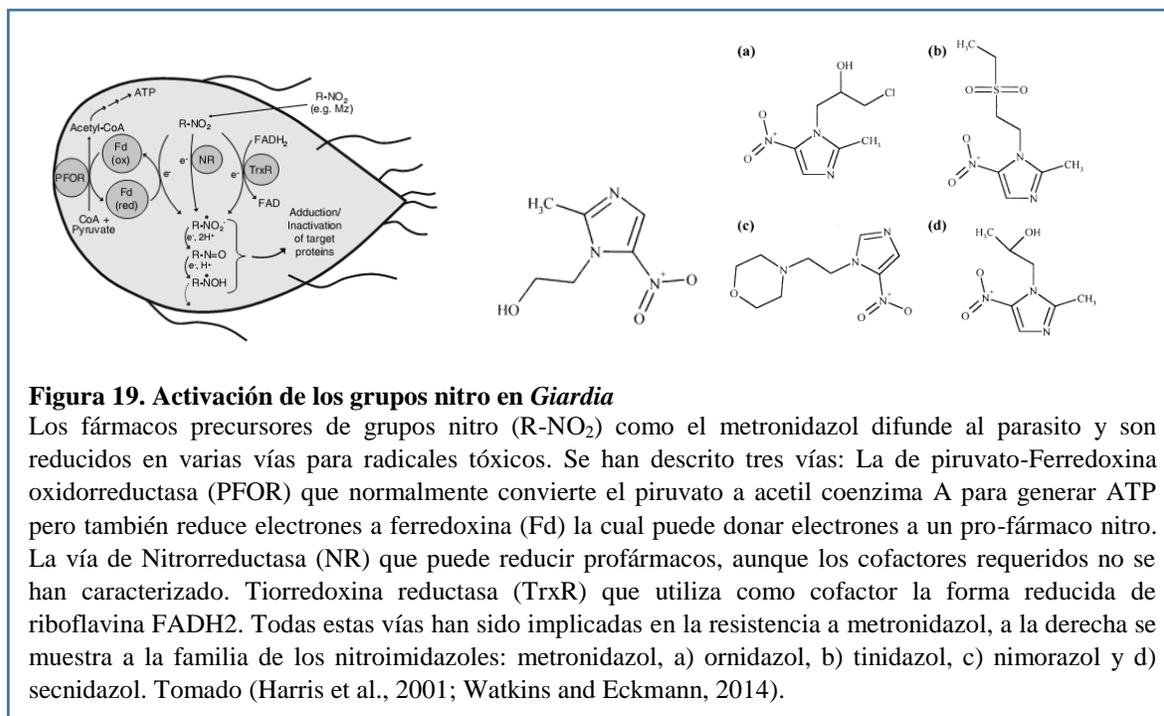
El metronidazol, fenbendazol y el febantel son los fármacos comúnmente usados en casos clínicos aunque también son empleados el albendazol, la nitazoxanida, la furazolidona, el tinidazol, la quinacrina y el ornidazol (Watkins and Eckmann, 2014). Este fármaco se ha utilizado recientemente en casos de resistencia a nitroimidazoles reportando una efectividad

del 100% por lo que se propone su uso en casos refractarios de Giardiasis (Requena-Mendez et al., 2017).

Históricamente la quinacrina, una acridina, fue el primer fármaco utilizado contra la Giardiasis, su ventaja radica en que tiene efecto sobre el trofozoíto y el quiste con una eficacia del 90%. El mecanismo de acción de este compuesto no es del todo claro pero se ha sugerido que está relacionado con la inhibición de la síntesis del DNA al intercalarse en la molécula aunque *Giardia* puede genera resistencia por exclusión y su uso es limitado por su toxicidad y producir una coloración amarilla en la piel y dermatitis exfoliativa (Harris et al., 2001).

La quinacrina fue reemplazada por los 5- nitroimidazoles que incluyen al metronidazol, el benzoil-metronidazol, el tinidazol, el ornidazol, el nimorazol y el secnidazol. El metronidazol es el fármaco más utilizado en el tratamiento de la Giardiasis en el mundo y se administra en dosis orales de 250 mg por día durante 5 a 10 días con una eficacia de 80 al 95% aunque recientemente el tinidazol se ha convertido en la droga de elección en los Estados unidos por su eficacia mayor al 90%, su tolerabilidad y la conveniencia de administración en una sola dosis; así mismo en un meta-análisis recientemente se mostró que su eficacia es similar al albendazol en el tratamiento de niños infectados con *Giardia* (Escobedo et al., 2016).

Todos los derivados del grupo 5-Nitroimidazoles son pro fármacos cuya especificidad hacia los microorganismos se debe al requerimiento de reducción de estos para generar radicales libres intermediarios por reacciones redox de bajo potencial que se llevan a cabo solo en organismos anaeróbicos (Watkins and Eckmann, 2014). En *Giardia* las enzimas piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) y Ferredoxina están implicadas en la activación de estos compuestos debido a su bajo potencial redox, así como la nitrorreductasa 1 y la tiorredoxina reductasa (Leitsch et al., 2011; Leitsch et al., 2016; Nillius et al., 2011). Los metabolitos reducidos se unen al RNA, el DNA y a proteínas causando estrés oxidativo y la muerte de los trofozoítos (Leitsch et al., 2011; Uzlikova and Nohynkova, 2014), sin embargo los trofozoítos de *Giardia* pueden llegar a desarrollar resistencia por disminución en la actividad de estas enzimas y por re-arreglos en el DNA (Ansell et al., 2015; Begaydarova et al., 2015; Leitsch, 2015; Leitsch et al., 2011; Muller et al., 2008; Muller et al., 2013; Upcroft et al., 1990; Upcroft, 1998). En general los casos de resistencia a esta droga en la Giardiasis se ven con poca frecuencia en la práctica clínica (Watkins and Eckmann, 2014).



Otro grupo de fármacos ampliamente utilizados en el tratamiento contra la Giardiasis son los carbamatos de benzimidazol como el albendazol o el mebendazol. El albendazol tiene una eficacia entre el 25 al 90% dependiendo de la dosis, similar al Metronidazol. Este fármaco se administra en una sola dosis durante 5 días mientras que el mebendazol tres veces al día (Watkins and Eckmann, 2014) y es la segunda opción de tratamiento cuando los pacientes son intolerantes al metronidazol. El mecanismo de acción de estos fármacos consiste en la producción de especies reactivas de oxígeno que dañan el DNA; además interactúan directamente con la  $\beta$ -tubulina evitando la polimerización de los microtúbulos (Paz-Maldonado et al., 2013). En aislados clínicos se ha encontrado resistencia a este fármaco (Farbey et al., 1995) y por el uso de modelos de resistencia generados *in vitro* se ha determinado que ésta puede ocurrir por reducción en el metabolismo del albendazol, incremento en las enzimas antioxidantes y por mutaciones en las proteínas  $\beta$ -tubulina, en el residuo 198, y en  $\beta$ -giardina (Arguello-Garcia et al., 2004; Jimenez-Cardoso et al., 2009; Leitsch, 2015; Muller et al., 2013; Paz-Maldonado et al., 2013; Upcroft et al., 1996).

La nitazoxanida, un nitrotiazol, también se utiliza en el tratamiento de la Giardiasis. Este fármaco tiene un amplio espectro de actividad contra parásitos intestinales y bacterias y su administración es en un esquema de tres días, aunque tiene como efecto adverso la

producción de malestares gastrointestinales. Su mecanismo de acción radica en que el fármaco es reducido por la enzima nitro reductasa GINR1 del parásito una forma tóxica que inactiva blancos en el parásito como la enzima PFOR. (Cedillo-Rivera et al., 2002; Muller et al., 2006; Pal et al., 2009). El mecanismo de resistencia de este fármaco estudiado en *Giardia* consiste en la expresión alterada de genes involucrados en la respuesta a estrés, que incluye a proteínas heat-shock y de proteínas de unión a nitazoxanida (Galeh et al., 2016; Leitsch, 2015; Muller et al., 2008; Nillius et al., 2011).

Otro fármaco utilizado contra la Giardiasis es la furazolidona, este nitrofurano actúa al ser reducido a radicales nitro por la NADH oxidasa los cuales dañan estructuras celulares, el DNA y disminuyen la habilidad de los trofozoítos para enquistarse (Hausen et al., 2006). Puede causar hemólisis en pacientes con deficiencia en la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Watkins and Eckmann, 2014). *Giardia* puede ser resistente a este fármaco por el incremento de las enzimas tiol que incrementan la resistencia al estrés oxidativo (Leitsch, 2015).

En el caso de mujeres embarazadas o de infecciones resistentes se prescribe Paromomicina, este medicamento es un aminoglucósido cuyo mecanismo de acción consiste en interferir con la síntesis de proteínas de *Giardia* al interactuar con las subunidades 50S y 30S del ribosoma (Kreutner et al., 1981; Meltzer et al., 2014). Finalmente la cloroquina, un fármaco anti-malaria que posee actividad anti-giardia más efectiva que el tinidazol, el albendazol y la paromomicina también es utilizada en contra de este parásito aunque no está disponible en Estados Unidos o Canadá (Watkins and Eckmann, 2014).

Una hipótesis de su mecanismo de acción es que este compromete la habilidad del trofozoíto para adherirse al epitelio intestinal (Baveja et al., 1998). Otros fármacos utilizados son la Mepacrina y la Bacitracina-Zinc, aunque su uso está restringido a casos de Giardiasis refractaria (Carter et al., 2017).

Las estrategias terapéuticas en la Giardiasis refractaria incluyen un incremento en la duración del tratamiento, así como dosis más altas del agente original, el cambio de fármacos o una combinación de fármacos, esto último incluso puede disminuir el riesgo del desarrollo de resistencia a los fármacos. Sin embargo, un número creciente de aislados de *Giardia* muestran resistencia a estos fármacos por lo que se han abierto líneas de investigación en la búsqueda de fármacos más eficaces que van desde la búsqueda de nuevas terapias basadas en

modificaciones químicas de estos compuestos; la búsqueda en bibliotecas de fármacos para identificar aquellos con actividad anti-giardia, así como la identificación de proteínas blanco del parásito para el desarrollo de fármacos específicos.

**Tabla 4. Fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de la Giardiasis y sus mecanismos de acción**

Grupo de Fármacos	Ejemplo	Mecanismo de acción
<b>5-Nitroimidazoles</b>	Metronidazol, Tinidazol	Formación de aductos e inactivación de Proteínas y DNA
<b>5-Nitrotiazoles</b>	Nitazoxanida	
<b>5-Nitrofuranos</b>	Furazolidona	
<b>Acridinas</b>	Quinacrina	Inhibición de la síntesis de DNA
<b>Benzimidazoles</b>	Albendazol, Mebendazol	Unión a tubulina, interferencia con el citoesqueleto
<b>Quinolonas</b>	Cloraquina	Desconocido
<b>Aminoglucósidos</b>	Paromomicina	Posible inhibición de la síntesis de proteínas

Adaptado de (Watkins and Eckmann, 2014)

En cuanto al diseño de nuevos fármacos se ha plantado la modificación en el núcleo del anillo de imidazol de la familia de los 5-Nitroimidazoles y la substitución de las cadenas en las posiciones 1, 2 y 4 del anillo por grupos funcionales más complejos. Estos análogos han mostrado una actividad anti-giardia incrementada hasta 500 veces. Actuando mediante la inducción de cambios en la morfología del parásito y afectando el tráfico vesicular y la diferenciación a quiste (Kim et al., 2017; Miyamoto et al., 2013; Valdez et al., 2009). Otra ventaja de estos nuevos compuestos además del incremento en la actividad es que han mostrado baja toxicidad. En una modificación realizada a la nitazoxanida donde un anillo de benceno se colocó entre el grupo nitro y el anillo de tiazol para crear un compuesto que es cinco veces más activo que la nitazoxanida y 18 veces más que el metronidazol con baja toxicidad en células de mamífero (Kulakova et al., 2014). Estrategias similares se han realizado con el benzimidazol encontrándose que la sustitución en la posición dos desempeña un papel crucial en el incremento de la potencia contra *Giardia*, dando como resultados

compuestos con actividad anti-giardia mayor al metronidazol y el albendazol (Flores-Carrillo et al., 2017; Navarrete-Vazquez et al., 2003; Valdez-Padilla et al., 2009; Valdez et al., 2002). También se han desarrollado nuevos compuestos a partir de la nitazoxanida que en modelos *in vitro* y murinos mostraron ser hasta 1015 veces más efectivos que esta (Colin-Lozano et al., 2017). Otro método del diseño de fármacos es el desarrollo de híbridos que combinen las mejores características de los fármacos originales. Al respecto se ha reportado que diez híbridos del benzimidazol y la pentamidina mostraron una potencia entre 3 y 9 veces mayor que los respectivos fármacos. Un híbrido entre la cloroquina, el etambutol e isoxil tuvo una potencia 670 veces mayor que el metronidazol (Kulakova et al., 2014). Recientemente se reportó que un híbrido entre nitazoxanida y el benzimidazol tiene una actividad anti-giardia mayor a la de la nitazoxanida, el albendazol y el metronidazol (Matadamas-Martinez et al., 2016).

Por otra parte, cuando se realizó la búsqueda en una librería constituida por 746 fármacos se encontró que la auranofina, que es usada en el tratamiento de la artritis reumatoide inhibe el crecimiento de varios aislados de *Giardia* y se ha establecido que su mecanismo de acción es la inhibición de la enzima tiorredoxina glutatión reductasa. El orlistat, el cual inhibe a las lipasas pancreáticas también inhibe la replicación de *Giardia* interfiriendo con las enzimas que metabolizan lípidos en el parásito y por la limitación que inducen de estos en el intestino. El miltefosina un agente anti-Leishmania también mostro actividad contra *Giardia* en el cual induce severos cambios morfológicos específicamente en el disco suctor (Kulakova et al., 2014). Recientemente se reportó que el rabeprazol, un inhibidor de la bomba de protones de la familia del omeprazol, puede inhibir a la triosafosfato isomerasa de *Giardia* específicamente (Garcia-Torres et al., 2016). El quitosán, un antifúngico, también mostró actividad contra el quiste de *Giardia* en ensayos *in vitro* (Yarahmadi et al., 2016).

En otra búsqueda en librerías de compuestos con actividad farmacéutica (HTS) que se acopló a un ensayo bioluminiscente que monitorea el contenido de ATP en los trofozoítos de *Giardia* que correlaciona con la viabilidad de estos se encontró que 43 de los 2816 fármacos son letales para los trofozoítos y no tóxicos para las células humanas (Kulakova et al., 2014). En este ensayo el disulfiram, un fármaco contra el alcoholismo crónico mostro gran eficacia en la eliminación de giardiasis en modelos murinos inhibiendo la enzima carbamato cinasa; la auranofina, un fármaco contra el reumatismo inhibe a la tiorredoxina oxidoreductasa de

*Giardia* (Kulakova et al., 2014). Por último la fumagilina, utilizada para el tratamiento de microsporidiosis en individuos inmunocomprometidos, inhibe a la enzima MetAP2 (metionina aminopeptidasa-2) que en *Giardia* se encuentra conservada además de que funciona en cepas resistentes a metronidazol así como los fármacos Carbadox y Tioxidazol que también fueron identificadas en este estudio (Kulakova et al., 2014). Otro ejemplo de fármacos con actividad anti-*Giardia* es el compuesto antitumoral NBDHEX que mostró ser efectivo contra los trofozoítos de *Giardia* que se une *in vitro* a las proteínas tioredoxina reductasa y el factor de elongación 1B- $\gamma$  (Camerini et al., 2017).

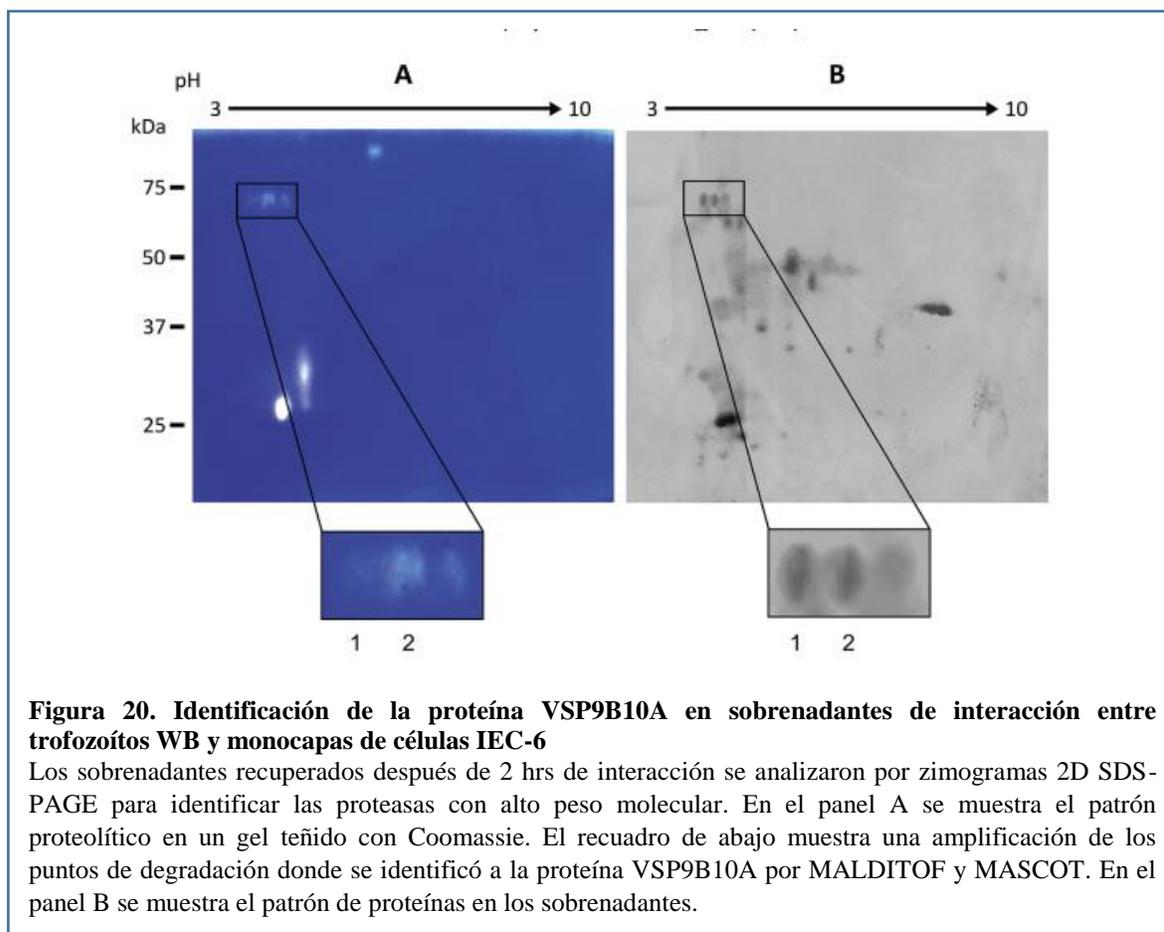
Como se señaló previamente, otro rubro importante en el diseño de fármacos contra *Giardia* es identificar moléculas blanco que difieran entre *Giardia* y su hospedero seguido del diseño de inhibidores específicos. Este es el caso de la arginina deaminasa (ADI), cuyo análogo no existe en humanos y que ha sido identificado como un factor de virulencia que restringe al hospedero de arginina desactivando la producción de NO; las proteínas CWP y la UDP-N-acetil glucosamina 4'-epimerasa, ambas involucradas en la síntesis de la pared del quiste también son proteínas de interés para el desarrollo de inhibidores pues la inhibición de estos componentes puede afectar la viabilidad del quiste en el ambiente externo y de esta manera se evitaría la diseminación de la infección. En particular la proteína mayoritaria de la pared del quiste, CWP2, ha sido evaluada como un candidato potencial para el desarrollo de vacunas con resultados positivos (Abdul-Wahid and Faubert, 2007; Lee et al., 2009). Sin embargo un estudio reciente mostró que existe variación genética en esta proteína entre el ensamblaje A y B y entre cepas y aislados clínicos por lo que se postula que su uso puede tener un espectro bajo de protección (Radunovic et al., 2017). Otras proteínas blanco son la cinasa ciclina-dependiente, la triosa fosfato isomerasa y la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa, la carbamato cinasa y las proteínas variables de superficie (VSPs) (Watkins and Eckmann, 2014). Al respecto la inmunización con extractos de *Giardia* que expresan todas las VSP, debido al silenciamiento de la maquinaria de represión de iRNA mostro que estos inducen protección en modelos murinos y que pueden ser una manera efectiva de prevenir las infecciones causadas por este parásito pues no existe una vacuna contra *Giardia* disponible (Rivero et al., 2010). Por otra parte, en modelos murinos se probó una vacuna construida a partir de una *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* atenuada recombinante, que expresa  $\alpha$ 1-giardina y otra que es una combinación de  $\alpha$ 1 giardina y CWP2. La administración oral de estas vacunas

induce IgG e IgA y confiere protección contra subsecuentes reinfecciones de *Giardia*, lo anterior soporta el uso de estas proteínas como un antígeno para el desarrollo de vacunas (Feng et al., 2016; Jenikova et al., 2011; Kulakova et al., 2014; Watkins and Eckmann, 2014). Una cuarta alternativa al tratamiento farmacológico convencional contra *Giardia*, así como una fuente de nuevos fármacos son los extractos de plantas utilizados de manera tradicional. En china se comercializan extractos de ajo *Allium sativum* cuya sustancia activa denominada alicina tiene una dosis letal para *Giardia* de 50 de 14µg/ml(Harris et al., 2001). En la herbolaria mexicana se reportan 14 plantas con actividad anti diarreica y antiparasitaria; seis de ellas *Justicia spicigera* (Muicle), *Lippia berlandieri* (Orégano), *Psidium guajava* (Guayaba), *Cuphea pinetorum*, *Rubus coriifolius* (Zarzamora) y *Helianthemum glomeratum* (Cenicilla) tienen actividad anti *Giardia* incluso mayor que el tinidazol. En los dos últimos casos se sabe que las sustancias activas son el kaempferol y la quercetina (Harris et al., 2001). Los extractos de *Yucca schidigera* (Yuca), *Geranium niver* (Geranio) también mostraron actividad anti-giardia *in vitro*, mientras que los extractos de *Pippali rasayana* y *Piper longum* tienen actividad en modelos murinos (Gardner and Hill, 2001). Un análisis de los extractos de la planta *Oxalis corniculata* permitió el aislamiento y la caracterización de un galactoglicerolípido con actividad comparable al del metronidazol. Otro ejemplo es el sándalo *Osyris alba* el cual se utiliza en la medicina tradicional en Jordania; contiene un alcaloide llamado pirrolizidina el cual tiene actividad anti-giardia así como el *Sambucus ebulus* cuyos extractos matan a los quistes de *Giardia* de manera dosis dependiente (Watkins and Eckmann, 2014). También se ha reportado actividad anti-giardia *in vitro* de extractos de *Artemisia annua* y *Curcuma longa* (Golami et al., 2016; Said et al., 2012). Por otra parte se ha determinado que los probióticos tienen un papel importante en la colonización de trofozoítos ya que en modelos murinos el establecimiento de la infección es dependiente de la composición de la microbiota y se ha demostrado que existe un sinergismo entre *Lactobacillus casei* y el albendazol además de que reduce los síntomas y restaura la morfología normal del intestino (Watkins and Eckmann, 2014).

## ANTECEDENTES DIRECTOS

La adhesión del trofozoíto de *Giardia duodenalis* al epitelio intestinal es un proceso multifactorial en el que intervienen el disco ventral, el flagelo ventral y moléculas de superficie que permiten la unión del trofozoíto al enterocito. El contacto del trofozoíto con su célula blanco induce la producción de moléculas del parásito que pueden contribuir al mantenimiento de la adhesión o a la activación de vías de señalización en el enterocito que desencadenan la patofisiología de la Giardiasis. A la fecha no se ha analizado con detalle estos productos denominados de excreción/secreción de *Giardia*. Los primeros intentos de caracterización se llevaron a cabo en el denominado secretoma de interacción de ensayos *in vitro* con monocapas de células epiteliales y en sobrenadantes de medios de cultivo de *Giardia*. Las principales proteínas secretadas identificadas son las enzimas metabólicas ADI, OCT y Enolasa, las proteínas VSPs y proteasas de tipo cisteína (Coradi and Guimaraes, 2006; de Carvalho et al., 2008; Guimaraes et al., 2003; Jimenez et al., 2000; Ringqvist et al., 2008; Rodriguez-Fuentes et al., 2006). En estos ensayos se han identificado proteasas de 135, 107, 73, 30 y 22 kDa. Cuando los trofozoítos de *Giardia* se trataron con los inhibidores de proteasas L-1-cloro-3-[4-tosilamido]-4-fenil-2-butanona y L-leucil amida (4-guanidino)-butano antes de la interacción con las células epiteliales se observó una disminución en la adhesión de los trofozoítos a estas células (Rodriguez-Fuentes et al., 2006). Estos resultados sugirieron que las proteasas pueden participar en la adhesión de *Giardia* al epitelio intestinal degradando la mucina o exponiendo receptores en el enterocito. Al respecto la cisteín proteasa Catepsina B-like ha mostrado ser necesaria en la adhesión y patogenicidad así como en la modulación de la respuesta inmunológica (Bhargava et al., 2015; Cotton et al., 2015; Cotton et al., 2014; Hernandez-Sanchez et al., 2008; Manko et al., 2017). Las cisteín proteasas son la familia de proteasas con más alta presencia en el proteoma de *Giardia*; 49.3% del total, además de que 1.46% del genoma de *Giardia* corresponde a posibles peptidasas y un 1.06% a homólogos inactivos (Williams and Coombs, 1995). Estas cisteína proteasas degradan colágena uno de los componentes mayoritarios de la matriz extracelular del epitelio intestinal habilidad que le permitiría al parásito diseminarse en el intestino y acceder a nutrientes (Coradi and Guimaraes, 2006). En nuestro grupo de trabajo una de las líneas de investigación es la caracterización de las proteasas que son liberadas por el trofozoíto de *Giardia* durante la interacción con células del epitelio intestinal de rata IEC-6. Interesantemente en estos trabajos

se identificó mediante 2D-zimogramas a la proteína VSP9B10A, que pertenece a la familia de las proteínas Variables de Superficie (Cabrera-Licona, 2010). La relevancia de este resultado radicó en que no se había mostrado que alguno de estos antígenos tuviera este tipo de actividad, por lo que su función puede ir más allá de la evasión de la respuesta inmunológica del hospedero.

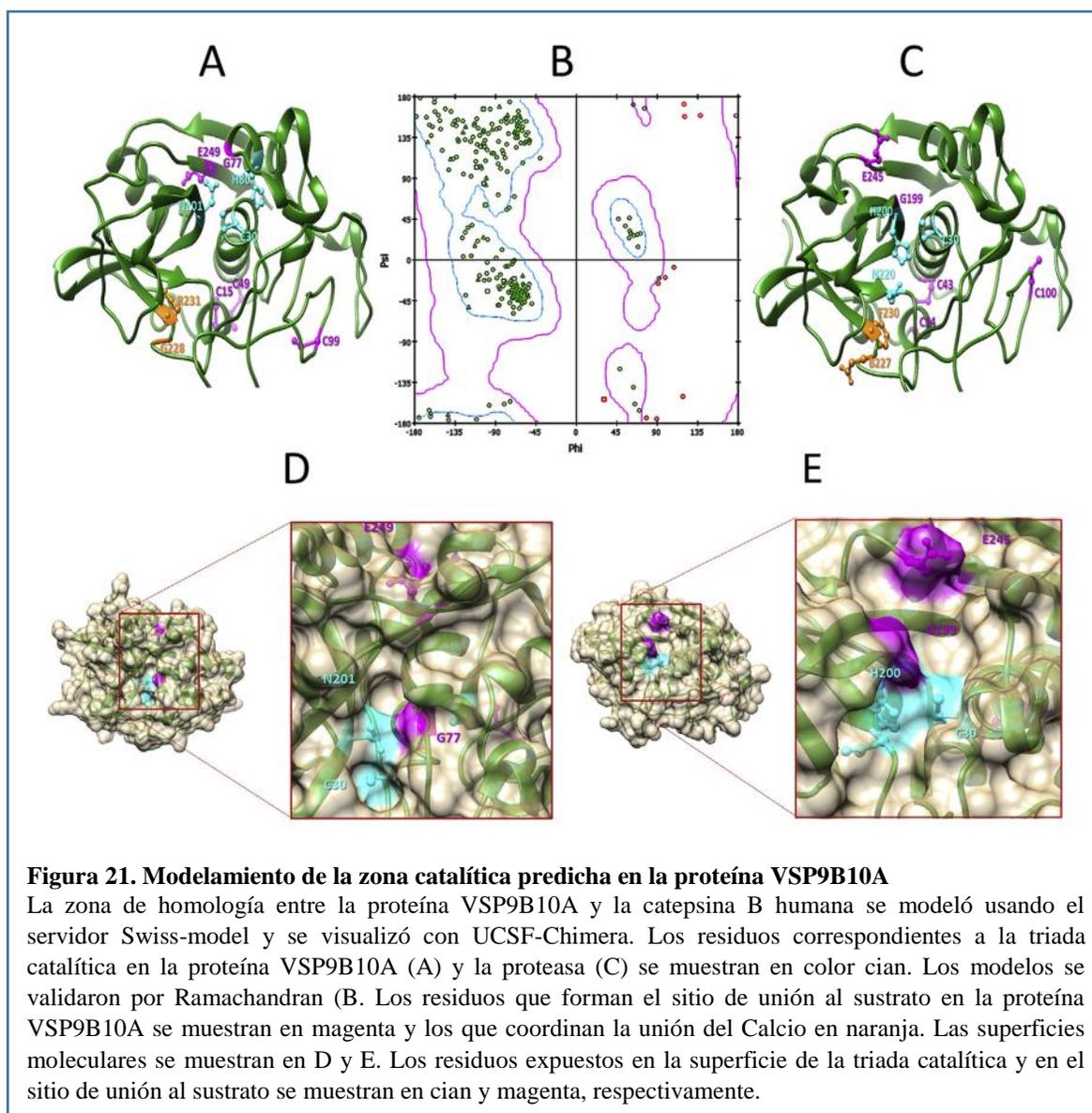


Así mismo previamente se reportaron evidencias de que esta proteína puede tener una participación en la adhesión de *Giardia* (Bermudez-Cruz et al., 2004) . En este estudio se caracterizó una proteína VSP de 63 kDa que tiene una homología de 99.5% con la proteína VSP9B10A. Además se observó que al incubar trofozoítos que expresan esta proteína con un anticuerpo policlonal anti-VSP63 previamente a los ensayos de interacción con la línea celular MDCK la adhesión de los trofozoítos se veía disminuida (Bermudez-Cruz et al., 2004).

Otros estudios sugieren la participación de las proteínas VSP en la patogenicidad y en la virulencia de *Giardia* y que sus particularidades estructurales pueden ser relevantes en estos procesos (Emery et al., 2016; Emery et al., 2015; Emery et al., 2014; Gargantini et al., 2016). Considerando estos antecedentes resulta relevante establecer qué papel tiene la proteína VSP9B10A durante la interacción del trofozoíto de *Giardia* y la célula del epitelio intestinal y si puede ser esta un factor de patogenicidad.

La proteína VSP9B10A fue identificada en 1995 por Lujan y colaboradores con el uso de el anticuerpo monoclonal 9B10 obtenido a partir de la inmunización de ratones con purificados de la pared de quistes generados *in vitro* de la cepa WB/127 de *Giardia*. Este anticuerpo reacciona con la superficie del trofozoíto y se estableció que reconoce a la proteína VSP9B10A de 76.76kDa y a la proteína VSP9B10B de 68.45 kDa en el fragmento homólogo de las proteínas que va del aminoácido 39 al 422. La diferencia entre estas proteínas es que la VSP9B10A posee en la región central 70 aminoácidos que no están presentes en la VSP9B10B además de que esta última se expresa exclusivamente durante el enquistamiento (Carranza et al., 2002). La región codificante de la proteína VSP9B10A es de 2220 bases cuyo producto es una proteína de 740 aminoácidos. Esta proteína, como otras VSPs tiene un extremo carboxilo conservado, repeticiones de los motif CXXC y GGCY, así como un dominio de dedo de zinc modificado. El alineamiento con base en la estructura, así como el modelamiento tridimensional de la proteína VSP9B10A con la cisteín proteasa de *Giardia* y la catepsina B consenso permitió determinar que esta proteína tiene una zona de homología con estas proteasas que no es evidente mediante el análisis de dominios conservados realizado con programas como Phyre o la herramienta de búsqueda de dominios conservados de NCBI. Este resultado sugirió que las diferencias probablemente se deban a la divergencia temprana de este parásito que hace que sus proteínas no sean convencionales. Mediante este análisis se identificaron en la zona de homología los residuos de cisteína característicos de las cisteín proteasas, en las posiciones 15, 49 y 99 que por modelamiento se observan en las mismas posiciones tridimensionales que los encontrados en la catepsina B de eucariontes superiores y la CP1 de *Giardia* en los residuos 14, 43 y 100. En cuanto al sitio de unión al sustrato S2 en la proteína VSP9B10A fue posible localizar los residuos de glicina y ácido glutámico en las posiciones 202 y 249 respectivamente que ayudarían a estabilizar la unión del sustrato al sitio catalítico y que tridimensionalmente son semejantes a las posiciones que ocupan en la

catepsina B en la posición 198 en el caso de la glicina y 245 en el del ácido glutámico (Cabrera-Licona, 2010). Por último también se identificaron residuos que pueden constituir la tríada catalítica en la proteína VSP910A estos incluyen: un residuo de cisteína en la posición 30, histidina en la posición 80 y ácido glutámico en la 249; aunque estos difieren con respecto a las posiciones que presentan en la catepsina B donde la cisteína se ubica en la posición 29, la histidina en la 199 y el ácido glutámico en la 245 el modelo tridimensional muestra que se encuentran muy cercanos y que por lo tanto pueden estar formando el sitio catalítico (Cabrera-Licona, 2010).



La identificación de estas características estructurales en la proteína VSP9B10A constituye una fuerte evidencia de que esta proteína posee actividad proteolítica y que puede tener un papel en la adhesión de *Giardia* al epitelio intestinal además del papel que se les ha dado en la evasión del sistema inmune y en las reinfecciones (Rivero et al., 2010). Sin embargo, debido a las características particulares en la expresión de las proteínas de la familia de las VSPs el estudio de su papel durante la interacción trofozoíto-célula requiere contar con una población que la exprese de manera estable. Aun cuando se han realizado trabajos con poblaciones en los que se obtuvieron por dilución trofozoítos que solo expresan una VSP los ensayos deben realizarse en las primeras doce horas de cultivo para minimizar la probabilidad de que ocurra el recambio; no obstante esto no asegura la homogeneidad en la expresión de la proteína en la población (Rivero et al., 2010). Debido a lo anterior en este trabajo se utilizaron poblaciones de trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A, obtenidas mediante transfección, para estudiar el efecto de esta durante la interacción con células epiteliales.

## JUSTIFICACIÓN

Una de las líneas de investigación dentro del estudio del parásito *Giardia* y la infección que genera, la Giardiasis, es establecer los mecanismos que permiten al trofozoíto interactuar con el enterocito para generar la patofisiología de esta infección. Algunos estudios pioneros utilizando transcriptómica y proteómica, han identificado un pequeño set de proteínas cuya expresión se incrementa durante la interacción parásito-célula, así como proteínas que son liberadas al medio durante esta interacción *in vitro*, sin embargo, no se ha determinado el papel específico de éstas. Dentro de este grupo de proteínas se encuentran los antígenos de la familia de las proteínas VSPs, una de la familia de genes más numerosa en el genoma de *Giardia* con una alta diversidad entre ellas. Aunque su papel principal en la biología de *Giardia* se relaciona con la evasión de la respuesta inmunológica del hospedero, la gran variabilidad entre ellas ha llevado a especular que pueden tener otras funciones durante la infección y estar relacionadas con la virulencia. Al respecto la proteína VSP9B10A, que fue identificada en interactomas de trofozoítos con células IEC-6, también mostró tener características estructurales de cisteín proteasas y fue identificada como una proteasa en estudios de proteómica. Esta actividad observada *in vitro* no había sido reportada para ninguna otra de las proteínas de esta familia por lo que es factible que la proteína VSP9B10A tenga un papel biológico distinto o complementario a la variación antigénica. Tomando en cuenta estas evidencias experimentales, en este trabajo se propuso determinar cuál es el efecto de una población de trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A durante la infección de células epiteliales. Los estos estudios sobre los posibles mecanismos de acción y la función biológica de esta proteína pueden aportar información que contribuya a comprender mejor los mecanismos de patogenicidad de *Giardia*.

## HIPÓTESIS

Si la proteína VSP9B10A tiene en el extremo N-terminal el sitio de unión al sustrato y la tríada catalítica característica de las cisteín-proteasas y es liberada al medio durante la interacción de los trofozoítos con células del epitelio intestinal, entonces la expresión constitutiva de la VSP9B10A en una población de trofozoítos de *Giardia* nos permitirá analizar el comportamiento de este antígeno durante el contacto temprano con las células, así como determinar si induce cambios citopáticos que pueden alterar la barrera epitelial y en las proteínas de las uniones estrechas que mantienen la estabilidad de ésta y definir si actúa como un factor de virulencia de *Giardia*.

## OBJETIVOS

### General

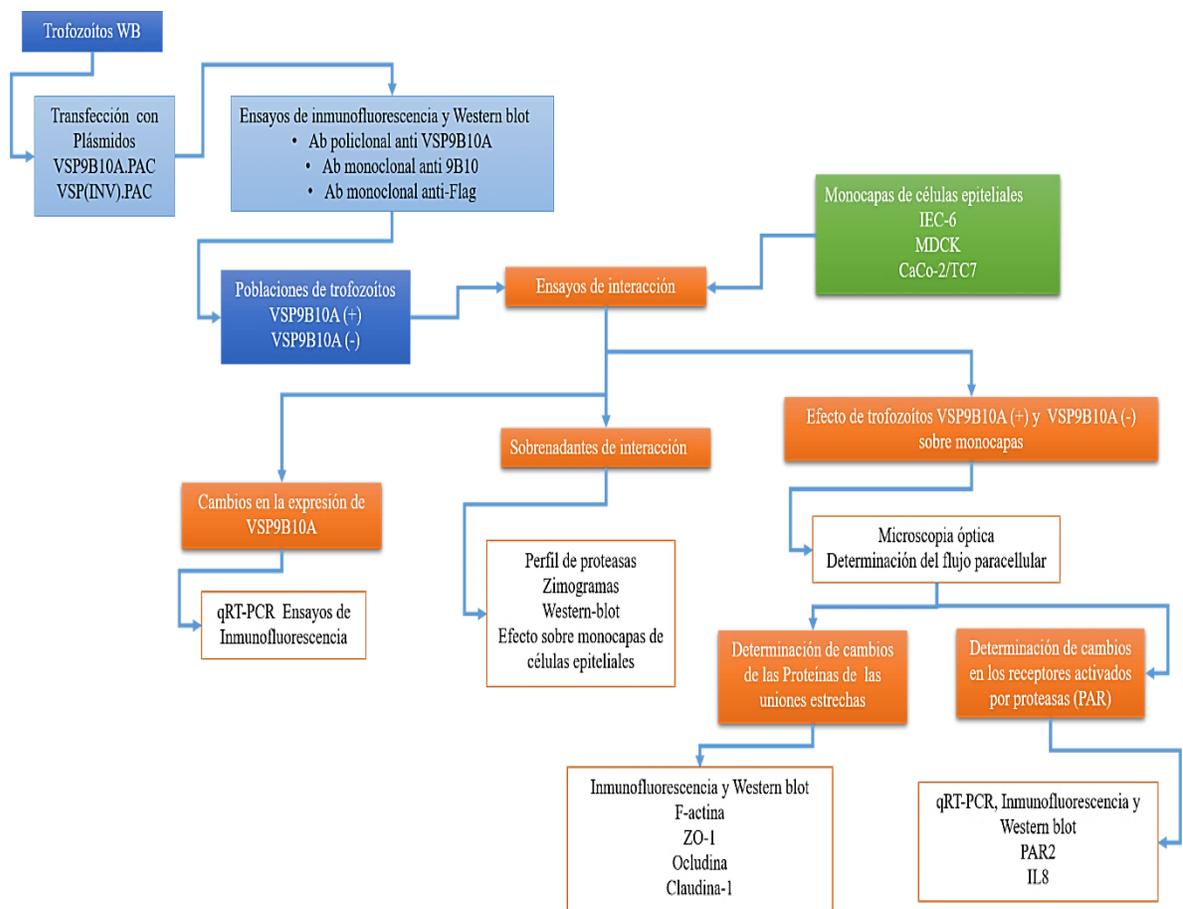
Caracterizar el efecto que tiene una población de trofozoítos de *Giardia duodenalis* que expresa constitutivamente a la proteína VSP9B10A sobre las monocapas de células epiteliales IEC-6, MDCK y Caco-2/TC7.

### Particulares

- Determinar *in vitro* el efecto de trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína de superficie VSP9B10A sobre la integridad de monocapas de células epiteliales IEC-6 y MDCK
- Analizar el perfil de proteasas presente en sobrenadantes de interacción de trofozoítos VSP9B10A.pAC con células epiteliales IEC6 y determinar su liberación durante este proceso empleando Western-blot y los anticuerpos policlonal y monoclonal específicos para la proteína VSP9B10A, así como el análisis de espectrometría de masas.
- Determinar si existe una relación entre la liberación de la proteína VSP9B10A durante la interacción con células *in vitro* de trofozoítos VSP9B10.pAC y los efectos citopáticos observados sobre la monocapa mediante ensayos de inhibición de la adhesión y Western-blot
- Determinar el efecto de los sobrenadantes obtenidos de la interacción IEC-6/Trofozoítos VSP9B10A sobre las monocapas de células epiteliales IEC-6

- Determinar el efecto de los trofozoítos VSP9B10A.pAC sobre la integridad de monocapas de células de intestino humano Caco-2/TC7
- Determinar el efecto de estos trofozoítos sobre la resistencia transepitelial de monocapas células Caco-2/TC7
- Determinar el efecto de estos trofozoítos sobre el cinturón de actina y las proteínas de las uniones estrechas
- Bloquear la expresión de la proteína VSP9B10A en trofozoítos WB y determinar su efecto sobre la integridad de monocapas de células Caco-2 /TC7 y en las proteínas de las uniones estrechas

## DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo de trofozoítos transfectados con el plásmido VSP9B10A.pAC

En este trabajo se emplearon cuatro poblaciones distintas de trofozoítos de *Giardia duodenalis*: I) los trofozoítos cepa WB C6 (ATCC#30957) empleados como control durante todos los experimentos llevados a cabo; II) trofozoítos de esta misma cepa transfectados con el vector vacío pAC específico para la expresión de genes en *Giardia* y que fue establecido como un control de los efectos de la transfección sobre la patogenicidad del parásito; III) trofozoítos WB transfectados con el vector VSP9B10A.pAC (Cabrera-Licona, 2010) que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A y IV) trofozoítos donde la expresión de la proteína fue silenciada mediante la transfección del vector VSP9B10A(INV).pAC. La secuencia reversa complementaria del gen de la proteína VSP9B1A (*Giardia* DB número de acceso GL50803 101074) se clonó en el vector de expresión pAC específico para *Giardia* (donado por el DR. Stefan Svärd, Uppsala University) (Jerlstrom-Hultqvist et al., 2012). Los oligonucleótidos VSP INV 5' 5'-GATATCGCCTTGCCTCTGCAC-3' y VSP INV 3' 5'-GCGGCCGCATGTTTGGCAGTT-3' se diseñaron utilizando el Software OLIGO 4; adicionando las secuencias de las enzimas de restricción Eco R5 y Not-1 en el primer 5' y 3' respectivamente con la finalidad de ligar la secuencia con el vector. La reacción de amplificación del inserto por PCR, la ligación, caracterización y secuenciación se realizaron siguiendo la metodología utilizada para obtener la construcción VSP9B10A.pAC (Cabrera-Licona 2010).

Todas las clonas se mantuvieron en tubos tipo Falcon® cónicos de 15 ml con medio modificado de Keister TYI-S-33 (Keister, 1983) adicionado con caseína y complementado con suero bovino HyClone al 10% y una solución al 1% de antibiótico/antimicótico 100x (HyClone) e incubados a 37°C. Los trofozoítos transfectados se mantuvieron bajo selección con dihidrocloruro de puromicina (Sigma) en distintas concentraciones para los trofozoítos con el vector vacío y aquellos que expresan establemente a la proteína VSP9B10A. La concentración utilizada fue de 20 µg/ml mientras para aquellos con dos vectores la concentración fue de 40 µg/ml. La expresión de la proteína VSP910A en la población de los trofozoítos transfectados se determinó periódicamente mediante inmunofluorescencias indirectas y Western-blot con los anticuerpos anti-FLAG® M2 (Sigma) que reconoce a la proteína VSP9B10A recombinante (VSP9B10A r) y los anticuerpos monoclonal VSP9B10A

(Lujan et al., 1995) y policlonal VSP9B10A (Cabrera-Licona, 2010). Los cultivos se renovaron cada tercer día despegando los trofozoítos adheridos a las paredes de los tubos por enfriamiento; 10 minutos en hielo. Alícuotas de 1 ml se transfirieron a tubos nuevos con medio complementado. Las clonas obtenidas durante este trabajo se crio-preservaron utilizando DMSO al 20% en N<sub>2</sub> líquido.

### **Cultivo de las líneas celulares IEC6, MDCK y Caco-2/TC7**

Las líneas celulares IEC-6 (ATCC CRL1592) MDCK (ATCC-CCL34) y la línea Caco-2 clona TC7 (Chantret et al., 1994) se mantuvieron en cajas para cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> (Sigma) con medio mínimo esencial DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) (GibcoBRL) suplementado con suero fetal bovino (HyClone) al 10 %, una mezcla de antibióticos/antimicóticos 100x (HyClone) al 1 %, Glutamina al 0.1 % e incubadas a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. El medio se reemplazó cada tercer día. Los cultivos confluentes se tripsinizaron (Sigma Trypsin 1:250 from porcine pancreas) por 5 minutos y una alícuota de 100 µl se transfirió a cajas nuevas con medio fresco para renovar los cultivos.

### **Ensayos de interacción**

Se sembraron en placas de 24 pozos (Corning<sup>®</sup>) en cuyo fondo se colocaron cubreobjetos estériles 24,000 células IEC6 o MDCK por pozo en fase exponencial de crecimiento y se incubaron por 48 hrs a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio DMEM completo para obtener capas confluentes. En el caso de la línea celular Caco 2/TC7 las células se utilizaron 3 o 21 días post confluencia para realizar los ensayos de interacción (Ringqvist et al., 2011).

En los ensayos de adhesión con monocapas de células IEC-6 estas se co-cultivaron con 2x10<sup>6</sup> de trofozoítos WB y transfectados, resuspendidos en 500 µl de medio DMEM sin suero por pozo; los trofozoítos se lavaron previamente tres veces con el medio incompleto frío. La interacción se llevó a cabo por 2 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> (McCabe et al., 1991). En el caso de las interacciones con monocapas MDCK y Caco 2/TC7 el inóculo de trofozoítos WB, pAC, VSP.pAC y VSP (INV).pAC utilizado fue de 5x10<sup>6</sup> y el tiempo de interacción de 18 y 24 respectivamente (Humen et al., 2011).

Una vez terminado el tiempo de incubación se recuperaron distintas muestras: los sobrenadantes de interacción de cada condición; los cuales se centrifugaron a 250g x 10

minutos para retirar los trofozoítos, después estos sobrenadantes se concentraron con centricones Millipore® con un poro de exclusión de 10 kDa. Las muestras se almacenaron en alícuotas a -70°C para posteriormente analizar el perfil proteico en estas. Los trofozoítos recuperados se fijaron con paraformaldehído al 4 % para emplearlos en ensayos de inmunofluorescencias o se almacenaron a -70°C para obtener RNA.

Las monocapas de células epiteliales se lavaron tres veces con PBS estéril y I) se fijaron con PFA al 4% para observar los cambios en la integridad de la monocapa o, II) para llevar a cabo inmunofluorescencias o III) se adicionó RIPA buffer al 1% (Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), 0.5% (v/v) Desoxicolato de Sodio, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 20 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1X Complete Miniprotease inhibitor tablet [Roche]) para obtener proteínas totales que se almacenaron a -70°C para ensayos de Western-blot; IV) se adicionó TRIzol® (Invitrogen) y se almaceno el lisado a -70°C para obtener posteriormente el RNA de estas monocapas.

### **Determinación de la actividad proteolítica en sobrenadantes de interacción por zimogramas**

Se analizaron las proteasas excretadas durante la interacción parásito-enterocito a través de SDS-PAGE en condiciones nativas no reductoras en geles al 12% de poliacrilamida copolimerizados con gelatina al 0.2% (Sigma). Se utilizaron 30 µl de cada sobrenadante concentrado: célula epitelial sin trofozoítos, células incubadas con trofozoítos WB, pAC, VSP.pAC o VSP (INV). pAC. A la par se realizó un gel SDS-PAGE sin gelatina para determinar el patrón proteico y asegurar la misma concentración de proteínas en cada condición.

Los geles se corrieron a 100 V por 2 hrs. Después estos se incubaron en una solución de Tritón X-100 al 2.5%(v/v) en agua por una hora y al término del tiempo de incubación se lavaron tres veces con agua bidestilada. Para desarrollar la actividad proteolítica los geles se incubaron en buffer de acetatos pH 5.5 con DTT  $1 \times 10^{-3}$ M por 16 hrs a 37 °C en agitación constante, se enjuagaron tres veces con agua bidestilada para retirar el buffer de activación y se tiñeron con azul de Coomassie por 2 horas a 37°C con agitación constante. Se lavaron con agua destilada para retirar el exceso de colorante y se incubaron con, una solución de ácido acético/metanol al 10%(v/v) hasta observar las bandas de actividad manifestadas como bandas blancas en un fondo azul (Lockwood et al., 1987). Las imágenes de los geles se

obtuvieron con el foto-documentador UVP High Performance Ultraviolet Transilluminator y el software Launch DocItLS.

### **Identificación de la proteína VSP9B10A en sobrenadantes de interacción por Western-blot y espectrometría de masas**

Los sobrenadantes de interacción obtenidos de cada condición se analizaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12 % en condiciones reductoras y desnaturalizantes ( $\beta$ -mercaptoetanol y 5 minutos a 90 °C). Las proteínas se separaron a 100 V por dos horas y se transfirieron a membranas de PVDF por 1:30 minutos a 300 mAp en frío. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5 % durante 1 hr a temperatura ambiente y agitación constante. Posteriormente se realizaron tres lavados con TBS-Tween al 0.01% y se procedió a incubar las membranas con una dilución 1:500 del anticuerpo Mc o Pol anti-VSP9B10A en leche al 5 % toda la noche a 4 °C en agitación constante. Una vez terminada la incubación el exceso de anticuerpo se retiró con cinco lavados de 10 minutos con TBS-T. En estos ensayos se utilizó una dilución de 1:20,000 del anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a HRP (Pierce® Antibody Mouse IgG (H-L) Horsedish Peroxidase) para incubar las membranas por 1 hr a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente se realizaron cinco lavados con TBS-T previos a revelar las membranas con el sistema Western Lightning®Plus ECL (PerkinElmer Inc). Las placas obtenidas se foto-documentaron con el equipo (UVP High Performance Ultraviolet Transilluminator) y el software Launch DocItLS.

Para comprobar la identidad de la proteína VSP9B10A se recortó una banda de actividad proteolítica de aproximadamente 75 kDa observada en los zimogramas y se envió para un análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF en la unidad correspondiente del Biomedical Center (BMC) de la Universidad de Uppsala Suecia. Los resultados se analizaron utilizando el software MASCOT.

### **Análisis de la expresión de la proteína VS9B10A durante la interacción por qRT-PCR e inmunofluorescencia indirecta**

Los trofozoítos obtenidos antes y después de la interacción con células epiteliales y que se fijaron con PFA al 4 % se bloquearon con una solución de BSA al 1 % en PBS por una hora a 37°C; se lavaron tres veces con 50  $\mu$ l de PBS estéril antes de ser incubados con una dilución 1:500 del anticuerpo monoclonal anti-VSP9B10 en BSA al 1 % por una hora a 37 °C en agitación. Al término de este proceso, los trofozoítos se lavaron tres veces con PBS y se

incubaron con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón acoplado a FITC (Anti-Mouse IgG whole molecule (Sigma) por 45 minutos a 37°C en agitación constante. Las pastillas se lavaron tres veces con PBS y se procedió a montar las preparaciones en portaobjetos con ProLong®Gold con DAPI (Life technologies). Las preparaciones se observaron con el microscopio óptico con sistema de epifluorescencia Axioskop40 ZEISS (AxioVision Rel 4.8) y con el microscopio confocal Leica TCS SP8 (LAS AF Lite software). Como control se incluyó en los ensayos de inmunofluorescencia trofozoítos que no se incubaron con el anticuerpo primario para descartar el fondo de isotipo.

El RNA total de trofozoítos tomados antes y después de la interacción se obtuvo siguiendo el protocolo de TRIzol® (Life Technologies). El RNA se cuantificó y su integridad se observó en geles de agarosa al 1.2%. Las muestras de RNA se trataron con DNaseI Amplification Grade (Life Technologies) por 30 minutos a 37 °C. Con un 1 µg de RNA libre de DNA se procedió a realizar la síntesis de cDNA utilizando los oligonucleótidos oligo(dT) y el Kit SuperScript II RNase H<sup>-</sup> Transcriptasa reversa (Invitrogen). En estos ensayos se emplearon 250 ng de cDNA para el ensayo de qRT-PCR llevado a cabo con el Kit S Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific). Al mix se añadieron 100 nM de los oligonucleótidos en cada reacción; los cuales se diseñaron en base a la secuencia del gen de la proteína VSP9B10A (*Giardia* DB número de acceso GL50803 101074) específicamente los nucleótidos que corresponden a la región N-terminal que va del residuo 210 al 280 la cual es característica de esta proteína, estos fueron asignados como VSP9B10A5´5´-AAGGGTTCTTCGCGAAA-3´ y VSP9B10A3´ 5´-TCTTCAGGTACGGCTTGT-3´. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem®). Los datos se analizaron mediante el método de CT comparativo  $\Delta Ct = (Ct_{gen} - Ct_{del\ gen\ basal})$  con el software del equipo normalizados contra los valores del gen ribosomal 28S (ORF 17,364) y la expresión de la proteína VSP9B10A en los trofozoítos WB sin interaccionar con las células epiteliales.

### **Determinación de la permeabilidad de las monocapas durante los ensayos de interacción por transporte de Dextrán**

Las células Caco 2/ TC7 se sembraron en placas de 24 pozos Corning ® HTS Transwell (Sigma-Aldrich), 8 días post-confluencia (Sambuy et al., 2005) se realizaron los ensayos de interacción infectando las monocapas con  $5 \times 10^6$  trofozoítos de la cepa WB, VSP9B10A.pAC

y como controles trofozoítos transfectados con el gen de la proteasa Catepsina B-Like 14019 y la Catepsina B purificada. Al medio de interacción en el lado apical se adicionó Dextrán acoplado a Isocianato de Fluoresceína FD-4 con un peso molecular de entre 3 y 5 kDa (Sigma). La detección de fluorescencia en el compartimento basal se midió durante 2, 4, 6, 8 y 24 hrs usando el lector de placas multi modal Infinite M200 (PRO TECAN). Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 490 y 520 nm respectivamente. Los resultados se expresaron como el porcentaje del valor basal. El transporte acumulativo de FD-4 se calculó como  $(\% \text{ del valor inicial}) = (\text{RFU}_{\text{expl}} \times 100) / \text{RFU}_{\text{control}}$  (Carrasco-Pozo et al., 2013). Cada ensayo se realizó por triplicado y los datos se analizaron con la prueba estadística de ANOVA de dos colas ( $P < 0.05$ ) con el software GraphPad Prism 7.0.

### **Determinación del efecto de los trofozoítos VSP9B10A.pAC sobre la polimerización de F-actina mediante inmunofluorescencia directa**

Las monocapas de células Caco-2 que se fijaron con paraformaldehído al 2 %, correspondiente a cada una de las condiciones de interacción con trofozoítos WB, VSP9B10A.pAC y VSP(INV).pAC se lavaron tres veces con PBS frío para retirar los trofozoítos adheridos, las células se permeabilizaron con NP-40 al 0.04 % en PBS por 15 minutos en agitación. El detergente se retiró y los restos se eliminaron con tres lavados con PBS estéril. Enseguida se procedió a bloquear las células con BSA al 0.5 % por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS las células se incubaron por 45 min a 37°C con una dilución de 1/500 en BSA al 0.01 % de AlexaFluor®488 Faloidina (Life Technologies). El fluoróforo se retiró con 3 lavados con PBS y dos más con agua bidestilada estéril. Las preparaciones se montaron en cubreobjetos con ProLong®Gold con DAPI (Life technologies™). Estas se observaron en el microscopio óptico con sistema de epifluorescencia Axioskop 40 ZEISS (AxioVision Rel 4.8) y en el microscopio confocal Leica TCS SP8 (LAS AF Lite software). Se documentaron 50 cortes ópticos horizontales de 0.20 µm de espesor. Así mismo, se obtuvieron imágenes de cortes transversales en 3D. Como control de estos ensayos se utilizaron monocapas de células Caco-2/TC7 sin infectar.

Para determinar si la polimerización de actina se ve afectada por la co-incubación con los trofozoítos se determinó la presencia o ausencia de G-actina mediante la tinción con AlexaFluor® 594 Desoxirribonucleasa 1 (Life technologies™). En estos ensayos se siguió el mismo procedimiento para la tinción con Faloidina, pero se adicionó un paso de incubación

con una solución de 0.3  $\mu$ M de DNAsa 1 en BSA 1% /PBS por 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

Con la finalidad de determinar si la despolimerización de actina esta mediado por la vía de las GTPasas pequeñas Rho/Rac/CDC42 se llevaron a cabo ensayos empleando extractos de las proteínas totales de monocapas no infectadas e infectadas con las tres poblaciones de trofozoítos: WB, VSP.pAC y VSP(INV). pAC. Los extractos se obtuvieron utilizando el Kit de activación RhoA/Rac1/Cdc42 (CELL BIOLABS inc); la co-precipitación e identificación de las proteínas por Western-blot se realizó siguiendo el protocolo indicado por el KIT.

### **Análisis del efecto de los trofozoítos VSP9B10A.pAC sobre la localización de las proteínas de las uniones estrechas ZO-1, ocludina y claudina-1 por inmunofluorescencia directa y Western-blot**

Las monocapas de células Caco-2/TC7 que se fijaron con PFA al 2 % se lavaron tres veces con PBS para retirarlo y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% en PBS por 3 minutos. Se retiró el detergente con tres lavados de PBS y las muestras se bloquearon con BSA 1% en PBS por una hora a temperatura ambiente en agitación constante. Enseguida se realizaron tres lavados con PBS antes de incubar las monocapas con diluciones de 1/500 en BSA al 1 % en PBS del anticuerpo de conejo policlonal anti ZO-1(Mid) (NOVEX Life technologies™), 1/250 del anticuerpo de conejo policlonal anti ocludina (NOVEX Life technologies™) y 1/100 del anticuerpo de conejo policlonal anti claudina-1 (NOVEX Life technologies), la incubación se realizó por una hora a 37°C en agitación constante. El exceso de anticuerpos se retiró lavando tres veces con PBS. El anticuerpo secundario anti conejo acoplado a FITC [(Anti Rabbit IgG (Whole molecule) FITC conjugate (Sigma)] se adicionó en una dilución de 1/250 en 1 % BSA-PBS. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS y dos con agua antes de montar las preparaciones en portaobjetos con ProLong®Gold con DAPI (Life technologies™). Las muestras se observaron en el microscopio óptico con sistema de epifluorescencia Axioskop40 ZEISS (AxioVision Rel 4.8) y posteriormente en el microscopio confocal Leica TCS SP8 (LAS AF Lite software). Se realizaron 50 cortes ópticos horizontales de 0.20  $\mu$ m de espesor; también se obtuvieron imágenes de cortes transversales.

Para determinar si existían cambios diferenciales en las monocapas de cada condición se obtuvieron extractos totales utilizando el buffer RIPA al 1% ((Tris-HCl 50mM (pH 7.5), 0.5% (v/v) Desoxicolato de Sodio, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40,

20 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1X Complete Miniprotease inhibitor tablet [Roche]). El buffer de lisis del Kit RhoA/Cdc42 Activation Assay (CELL BIOLABS, INC) también se utilizó debido a su composición distinta de detergentes, los cuales se encuentran en mayor cantidad que en el buffer RIPA. Los lisados se centrifugaron a 12,000g x 15 minutos en frío y el sobrenadante se recuperó y alicuotó. La concentración de proteínas se determinó utilizando el método del Pierce®BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) y se leyó la absorbancia a 562 nm en un lector de placas. Posteriormente 20 µg de las muestras en condiciones desnaturizantes y reductoras se separaron por SDS-PAGE en geles al 8 y 15 % de acrilamida. Los geles se transfirieron a una membrana de PVDF por 1:30 min a 300 mAp en frío. Las membranas se bloquearon con leche al 5 % por una hora a temperatura ambiente en agitación constante y se llevaron a cabo tres lavados con PBS para después incubar las membranas con los anticuerpos ZO-1, ocludina (geles al 8%) y claudina-1 (geles al 15%) en BSA 1% en PBS. Como control de carga se utilizó el anticuerpo de conejo anti β-actina (Sigma) en una dilución de 1/100 en BSA. La incubación con estos anticuerpos se llevó a cabo toda la noche a 4°C. Para eliminar el exceso de anticuerpos las membranas se lavaron tres veces y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario anti conejo acoplado a HRP (Pierce® Antibody Rabbit IgG (H+L) Horsedish Peroxidase Thermo Scientific)) en una dilución 1/20000 en PBS por una hora a temperatura ambiente y agitación constante. La reacción se reveló con el kit Western Lightning® Plus ECL (Perkin Elmer Inc.) y la documentación de las placas se realizó empleando el equipo UVP High Performance Ultraviolet Transilluminator y el software Launch DocItLS.

### **Determinación del efecto de los trofozoítos VSP9B10A.pAC sobre la activación de los receptores de proteasas PAR1 y 2 por RT-PCR, inmunofluorescencia indirecta y Western-blot**

El RNA de las monocapas de células Caco-2/TC7 incubadas o no con trofozoítos de las poblaciones mencionadas se obtuvieron mediante el método de TRIzol® (Invitrogen). El RNA obtenido se cuantificó y su calidad se analizó en geles de garosa al 1.2%. Estas muestras se trataron con DNaseI Amplification Grade (Life Technologies) por 30 minutos a 37 °C. Con un 1 µg de RNA libre de DNA se procedió a realizar la síntesis de cDNA utilizando los oligonucleótidos oligo (dT) y el Kit SuperScript II RNase H<sup>-</sup> Transcriptasa reversa (Invitrogen). En el ensayo de qRT-PCR se utilizaron 250 ng de cDNA empleando el Kit S

Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific). Para el ensayo se utilizaron 100 nM de los primers en cada reacción. Estos se diseñaron con base a la secuencia de los genes de los receptores PAR 1-4: PAR 1 NCBI Reference Sequence: NM\_001992.3(5') 5'-AGGTGCTGAGTGTACAGA-3', PAR 1(3') 5'-TACATCACACTCTATGCA-3'; PAR 2 GenBank: U34038.1(5') 5'-TTCATTCCTGCCCTGAACATC-3', PAR 2(3') 5'-TGAACATGTCTCCCACCAAGAG-3'; PAR 3 GenBank: AK312848.1(5') 5'-ATCATCTCAATGGGAACA-3'; PAR 3(3') 5'-ACATGTTGCCATAGAAGA-3' y PAR 4 GenBank: AY431102.1(5') 5'-TCCAAGGCCTCTGCGGAA-3' PAR 4(3') 5'-TCCCCACTTTGTGTC-3'. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem®). Los datos se analizaron mediante el método de CT comparativo  $\Delta C_t = (C_t \text{ gen} - C_t \text{ del gen basal})$  con el software del equipo normalizados contra los valores del gen GAPDH y la expresión de los receptores en las monocapas de células Caco-2/TC7 sin trofozoítos.

Para determinar si existen cambios en la expresión de proteínas o cambios en el receptor se obtuvieron proteínas totales de monocapas de células Caco2/TC7 sin infectar y monocapas incubadas con los trofozoítos VSP9B10A.pAC y los trofozoítos WB y VSP(INV). pAC como controles. Los extractos se obtuvieron incubando la monocapa por 15 minutos con RIPA buffer y centrifugando a 12,000xg por 15 minutos a 4°C. Se hicieron alícuotas de los sobrenadantes y la concentración de proteína en cada una de las muestras se determinó por el método Pierce®BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) utilizando el Kit Western Lightning®Plus ECL (PerkinElmer Inc). Posteriormente se separaron 20 microgramos de las muestras en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones reductoras y desnaturalizantes a 100 V por 2 horas. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF durante 1:30 horas a 300 mAp. Las membranas se bloquearon con una solución de leche al 5 % en PBS por 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante. En seguida se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-T y se procedió a incubar con una dilución 1:250 del anticuerpo PAR2 (Santa Cruz Biotechnology) en leche al 5 % toda la noche a 4°C en agitación. Para retirar el exceso de anticuerpo se realizaron tres lavados con TBS-T y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario anti conejo acoplado a HRP (Pierce® Antibody Rabbit IgG (H-L) Horsedish Peroxidase) por una hora a temperatura ambiente en una dilución 1:20000. La reacción se llevó a cabo con el Kit Western Lightning®Plus ECL (PerkinElmer Inc.) y la

documentación de las placas se realizó empleando el equipo UVP High Performance Ultraviolet Transilluminator y el software Launch DocItLS

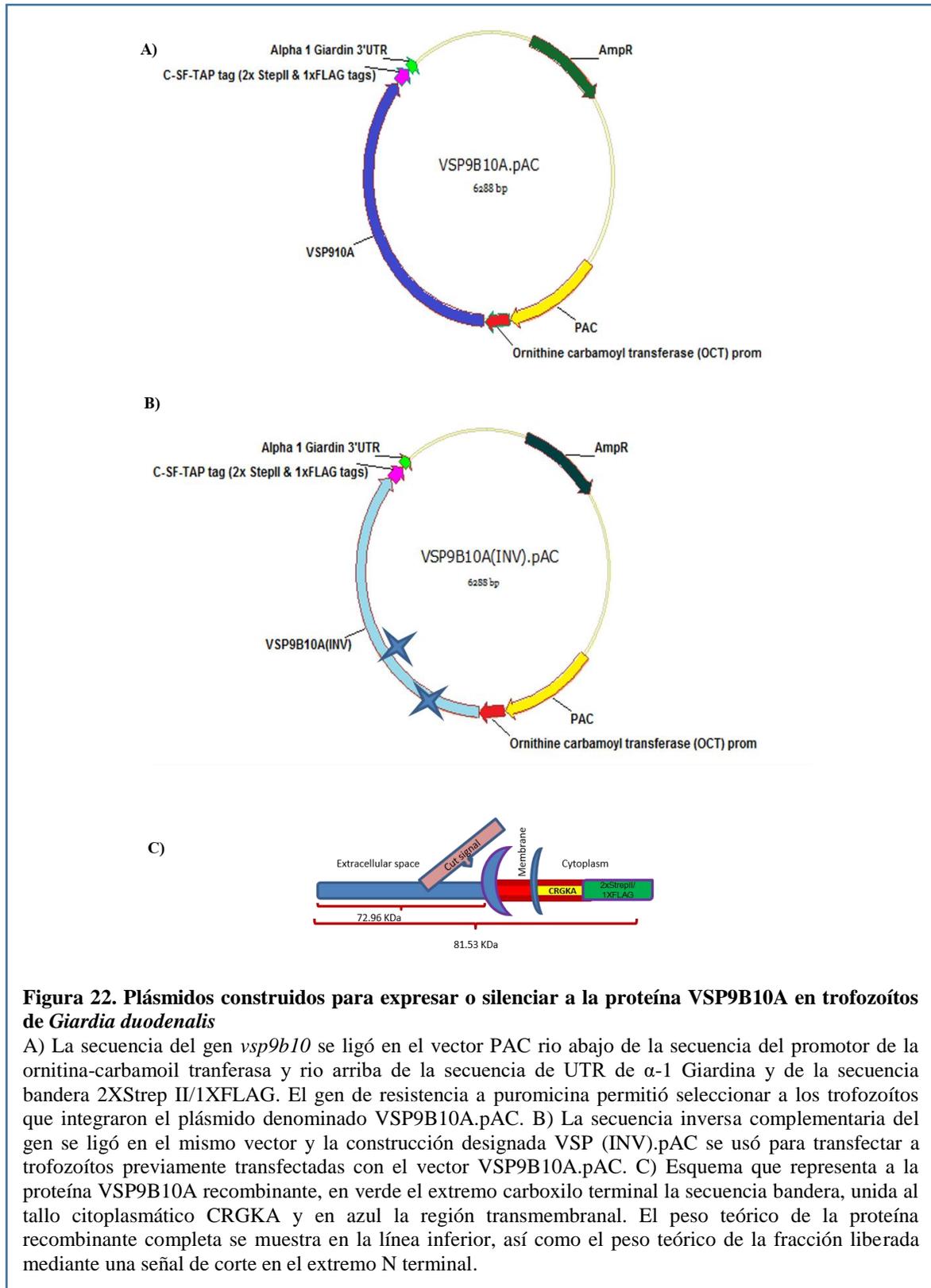
Por otra parte, se utilizaron monocapas fijadas con PFA al 2 % para realizar los ensayos de inmunofluorescencias con el anticuerpo anti PAR2 (H-99) (Santa Cruz Biotechnology). Las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% en PBS por tres minutos. El detergente se retiró con tres lavados de PBS estéril. El bloqueo de las monocapas se realizó con BSA al 1 % en PBS por una hora a temperatura ambiente. En seguida se incubaron con una dilución 1:100 del anticuerpo PAR-2 en BSA al 1 % toda la noche a 4°C en agitación. El exceso de anticuerpo se retiró con tres lavados de PBS. Las muestras se incubaron por una hora a 37°C en agitación con el anticuerpo secundario anti-Igs de conejo (Anti Rabbit IgG (Whole molecule) FTC conjúgate (Sigma). Al término de la incubación las monocapas se lavaron 3 veces con PBS y dos veces más con agua. Las preparaciones se montaron en portaobjetos utilizando el ProLong®Gold con DAPI (Life technologies™) para marcar los núcleos y conservar la inmunofluorescencia. Las laminillas se observaron en el microscopio óptico con sistema de epifluorescencia Axioskop40 ZEISS (AxioVision Rel 4.8) y en el microscopio confocal Leica TCS SP8 (LAS AF Lite software). En estas muestras se realizaron 50 cortes ópticos horizontales de 20 µm, así como cortes en transversal.

## RESULTADOS

### Expresión de la proteína VSP9B10A en poblaciones de trofozoítos transfectados con el plásmido VSP9B10A.PAC

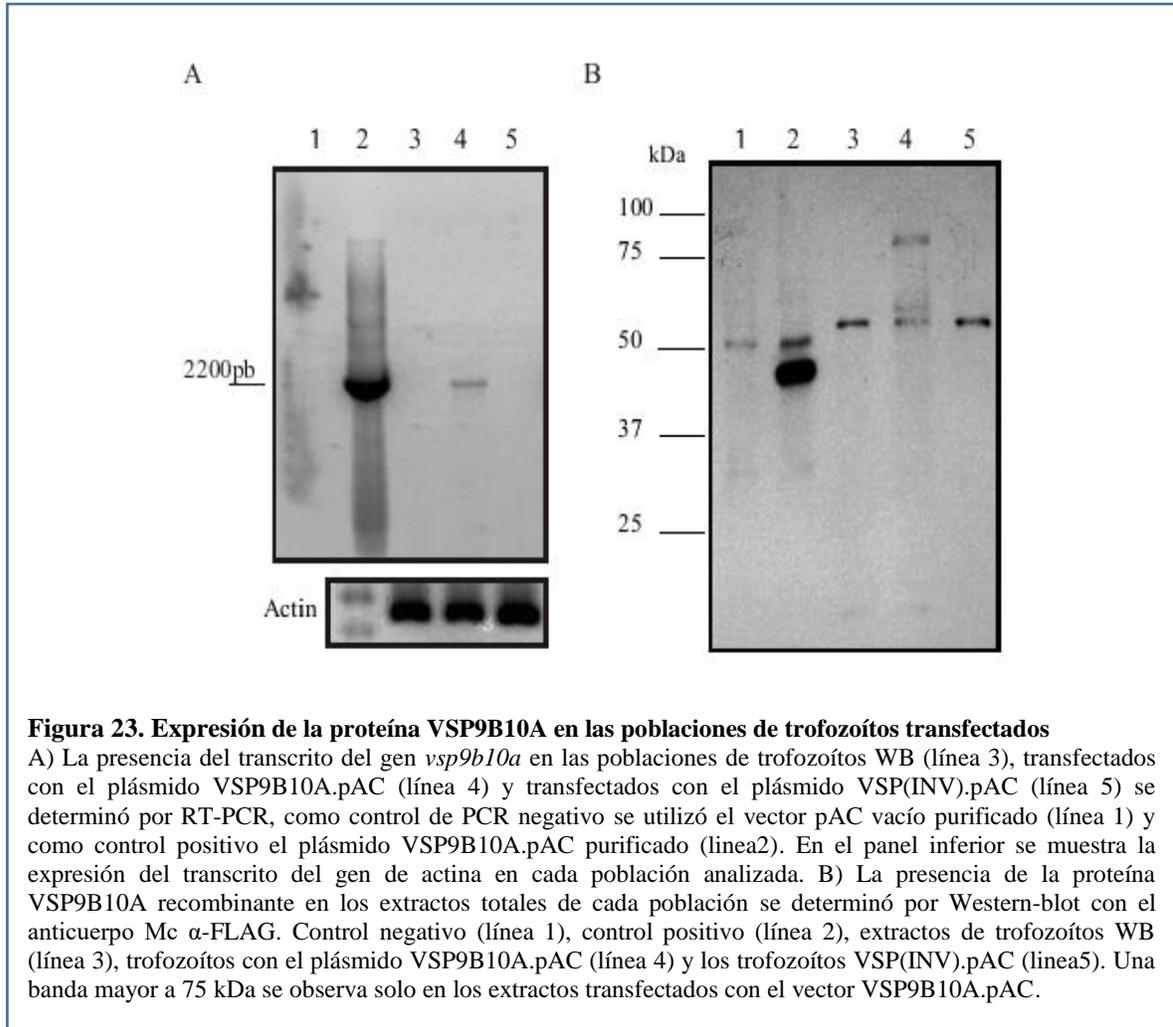
En este trabajo se propuso estudiar el efecto de poblaciones de trofozoítos que expresan o no a la proteína VSP9B10A en su superficie sobre monocapas de células del epitelio intestinal. Este análisis se realizó empleando distintas poblaciones de trofozoítos. La denominada VSP9B10A.pAC, que fue obtenida mediante la transfección de trofozoítos WB con el plásmido VSP9B10A.pAC. Este fue construido al ligar el gen *vsp9b10* en el vector de expresión PAC, específico de *Giardia*. En este vector el gen se encuentra bajo la regulación del promotor constitutivo del gen de la ornitina carboamil transferasa (**Figura 22**) que permite la expresión constante del gen y no está sujeto al mecanismo de variación antigénica (Cabrera-Licona, 2010). También se utilizaron durante los ensayos poblaciones de trofozoítos transfectados con el vector vacío, como un control de transfección; esta se denominó PAC. Las poblaciones de trofozoítos WB, se utilizaron como control en los ensayos de interacción. En estos trofozoítos la expresión de la proteína VSP9B10A está bajo la regulación endógena y es aleatoria. Finalmente, se generó una población de trofozoítos donde la expresión de la proteína VSP9B10A se silenció por transfección. Esta se denominó VSP(INV).pAC ya que lleva la secuencia inversa complementaria del gen *vsp9b10a* en el vector PAC (**Figura 22**).

Todas las poblaciones de trofozoítos transfectados, así como los trofozoítos WB sin transfectar se caracterizaron para determinar tanto la presencia o ausencia del transcrito *vsp9b10a* y la expresión de la proteína VSP9B10A. Los resultados de RT-PCR mostraron que solo la población transfectada con el vector VSP9B10A.pAC tiene un amplicon de 2200-pb, correspondiente al transcrito del gen *vsp9b10a*. Así mismo, la inmuno-detección realizada con el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -Flag®, que reconoce específicamente la bandera adicionada en el extremo C-terminal unida al tallo citoplasmático CRGKA de la VSP, mostró que solo en la población VSP9B10A.pAC hay reconocimiento de una banda de aproximadamente 83 kDa correspondiente al peso molecular de la proteína VSP9B10A recombinante (**Figura 23**).

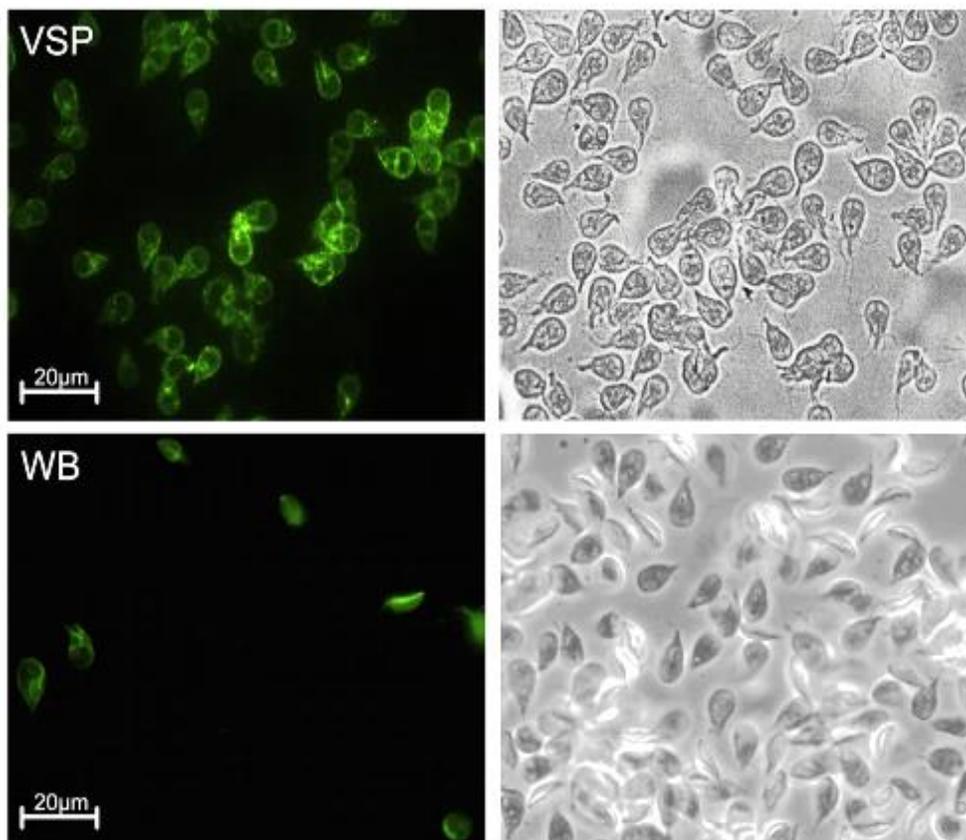


**Figura 22. Plásmidos construidos para expresar o silenciar a la proteína VSP9B10A en trofozoítos de *Giardia duodenalis***

A) La secuencia del gen *vsp9b10* se ligó en el vector PAC río abajo de la secuencia del promotor de la ornitina-carbamoyl transferasa y río arriba de la secuencia de UTR de  $\alpha$ -1 Giardina y de la secuencia bandera 2XStrep II/1XFLAG. El gen de resistencia a puomicina permitió seleccionar a los trofozoítos que integraron el plásmido denominado VSP9B10A.pAC. B) La secuencia inversa complementaria del gen se ligó en el mismo vector y la construcción designada VSP (INV).pAC se usó para transfectar a trofozoítos previamente transfectadas con el vector VSP9B10A.pAC. C) Esquema que representa a la proteína VSP9B10A recombinante, en verde el extremo carboxilo terminal la secuencia bandera, unida al tallo citoplasmático CRGKA y en azul la región transmembranal. El peso teórico de la proteína recombinante completa se muestra en la línea inferior, así como el peso teórico de la fracción liberada mediante una señal de corte en el extremo N terminal.



En los ensayos de inmunofluorescencias realizados contra el extremo amino terminal de la proteína VSP9B10A que se expresa en la superficie del trofozoíto, se utilizaron el anticuerpo monoclonal 9B10 (Lujan et al., 1995; Nash et al., 2001) y el policlonal mono-específico VSP9B10A. Ambos anticuerpos reconocen a la proteína VSP9B10A reactiva y aunque mostraron que esta proteína se expresa en la membrana del trofozoíto en el patrón de distribución característico de las VSPs en la población VSP9B10A.pAC también muestran células reactivas en las otras poblaciones antes descritas pero en menor proporción (**Figura 24**). Con base en estos resultados se estableció que las poblaciones a utilizar en los ensayos de interacción debían ser para la VSP9B10A.pAC: Flag (+) /9B10 (+); y para las poblaciones WB, PAC y VSP(INV).pAC: Flag (-)/9B10(-).



**Figura 24. Detección de la expresión de la proteína VSP9B10A por inmunofluorescencia indirecta.** La mayor parte de la población transfectada con el plásmido VSP9B10A.pAC expresa a la proteína VSP9B10A en su superficie en comparación con una población de trofozoítos WB sin transfectar como se muestra en el panel inferior. Las inmunofluorescencias se realizaron utilizando el anticuerpo monoclonal anti-9B10.

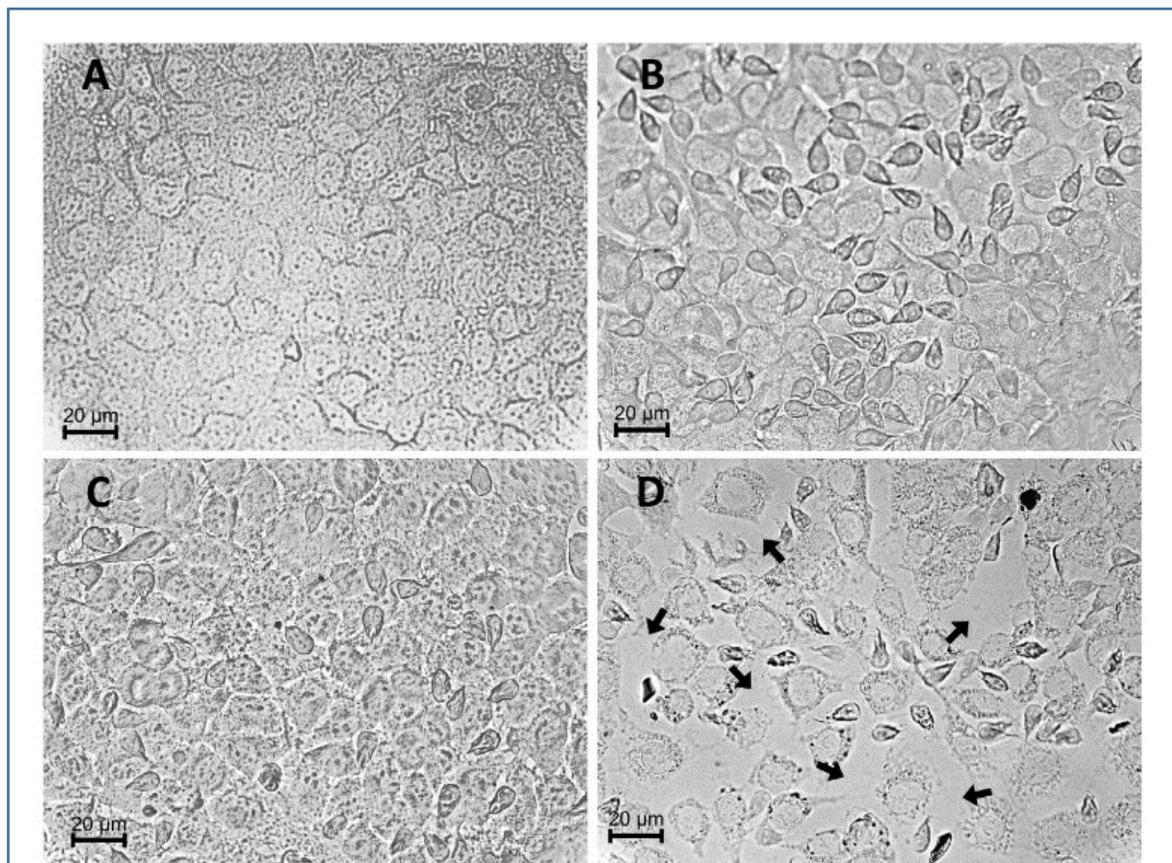
### **Establecimiento del efecto de las poblaciones de trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A en monocapas de células IEC-6**

Una vez caracterizadas las poblaciones se procedió a establecer el efecto de éstas sobre monocapas de células de intestino de rata IEC-6 un modelo ya validado en el estudio del efecto de *Giardia* sobre células epiteliales *in vitro*, con el objetivo de establecer si la proteína VSP9B10A puede estar actuando como un factor de patogenicidad de este parásito.

Después de dos horas de interacción, en condiciones que no afectan la viabilidad de los trofozoítos y permiten la adhesión del parásito, así como la actividad de las proteasas; se

recuperaron los sobrenadantes de interacción. Mientras las monocapas fijadas se analizaron por microscopía óptica de campo claro.

Los resultados mostraron que en aquellas monocapas infectadas con la población de trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A se presenta daño, evidenciado por la pérdida de la continuidad de la monocapa. En éstas, las células IEC6 se separan y pierden su morfología normal tipo romboide y se redondean. Estos efectos no se observaron en aquellas monocapas que fueron co-incubadas con las poblaciones que expresan en menor cantidad a la proteína VSP9B10A, los trofozoítos WB y los trofozoítos PAC (Figura 25).



**Figura 25. Efecto de la población de trofozoítos VSP9B10A.pAC sobre las monocapas de células IEC6**

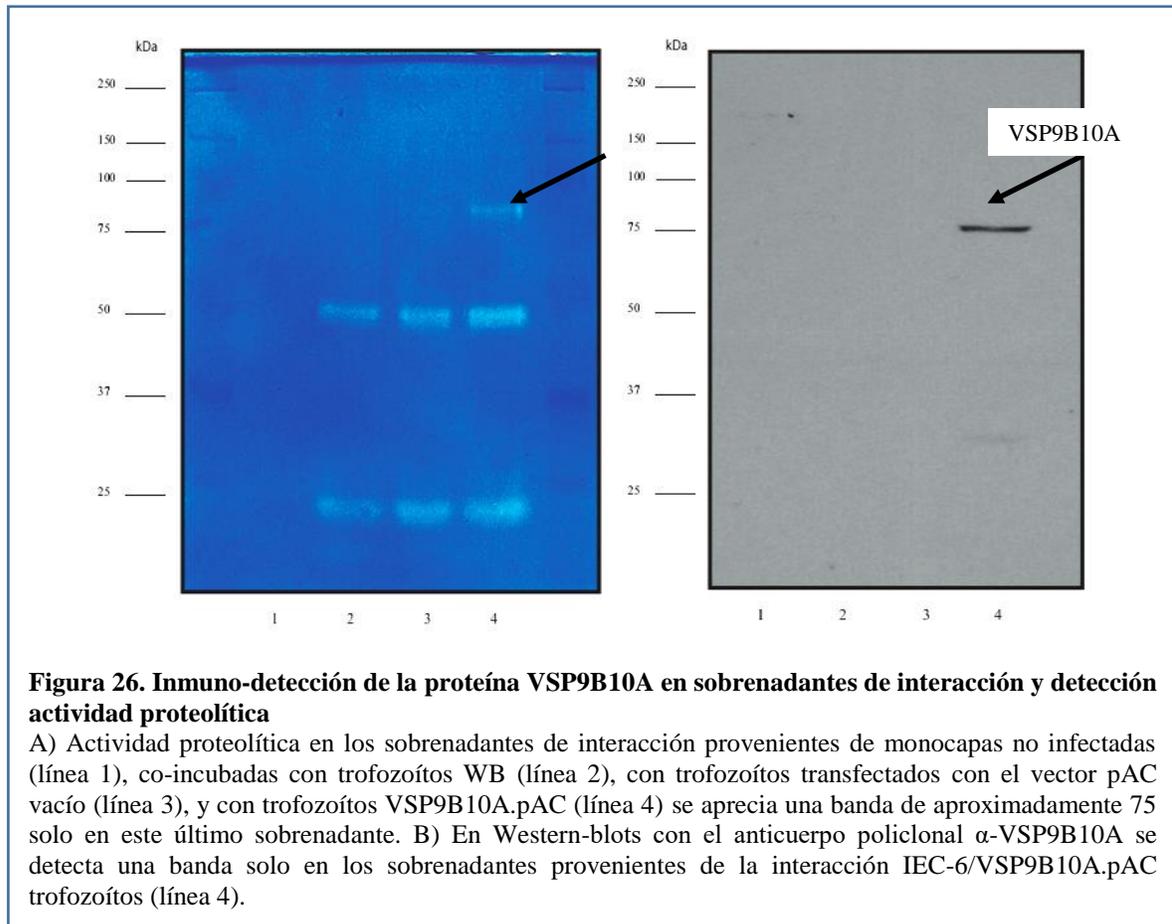
A) Monocapas de células IEC-6 después de dos horas de incubación en ausencia de trofozoítos de *Giardia*, la morfología normal de células hexagonales y la continuidad de la monocapa se aprecian en la microfotografía. B) Monocapas incubadas con trofozoítos WB; C) Monocapas incubadas con trofozoítos transfectados con el vector PAC vacío, D) Monocapas incubadas con los trofozoítos VSP9B10A.pAC, las puntas de flechas muestran las regiones vacías entre las células, la pérdida de la continuidad de la monocapa y el cambio de morfología de las células.

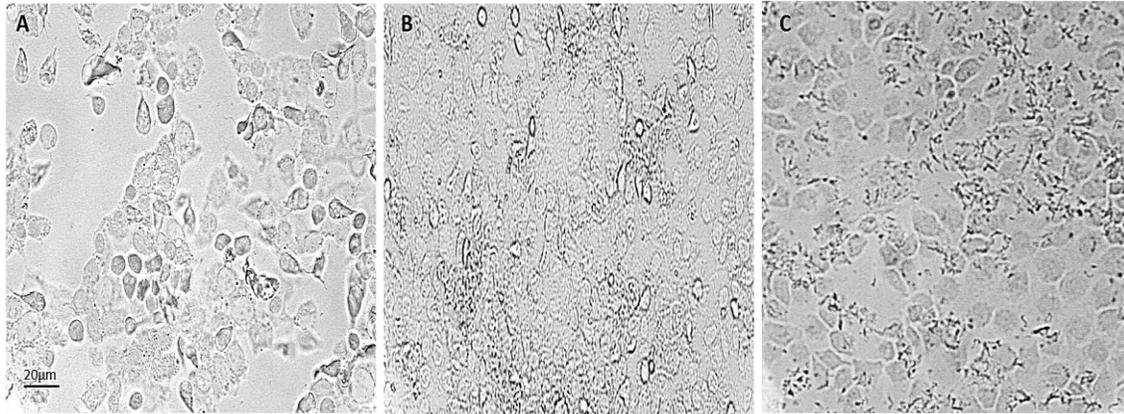
Es importante señalar que en estos ensayos la incubación se llevó a cabo utilizando un inóculo de 1 millón de trofozoítos VSP9B10A.pAC (ver materiales y métodos) mientras que, en los ensayos previos a este trabajo, donde la proteína VSP9B10A fue identificada por primera vez como una proteasa, se utilizaron 2 millones de trofozoítos. Así mismo, cuando en los ensayos de interacción se emplearon poblaciones de trofozoítos WB que expresaban mayoritariamente a la proteína VSP9B10A se observaron los mismos efectos sobre las monocapas

### **Determinación de la presencia de la proteína VSP9B10A en los sobrenadantes de interacción y en zimogramas del interactoma**

Con la finalidad de determinar si la proteína VSP9B10A se libera al medio durante la interacción y si su actividad de cisteín proteasa-like pudiera ser la que ocasiona los daños observados en la monocapa se realizaron zimogramas y ensayos de inmuno-detección por Western-blot de los sobrenadantes provenientes de cada interacción. En los sobrenadantes se detectó una banda de proteólisis de aproximadamente 75 kDa en los sobrenadantes provenientes de la interacción con la población de trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A; dicha banda fue reactiva al anticuerpo policlonal mono específico anti VSP9B10A que reconoce su extremo N-terminal (**Figura 26**). Cuando las monocapas IEC-6 se trataron con este sobrenadante, en ausencia de trofozoítos, se observó el mismo daño que el generado por los trofozoítos (**Figura 27C**). En cambio, cuando se incubaron los trofozoítos que constitutivamente expresan a la proteína VSP9B10A con el anticuerpo policlonal mono específico previo a los ensayos de interacción, no se detectó daño a la monocapa (**Figura 27 A y 27B**). Este último resultado sugiere que el anticuerpo puede o inhibir la liberación de la proteína o su actividad putativa de proteasas, aunque otros ensayos son necesarios para establecer que ocurre cuando estos trofozoítos son incubados con el anticuerpo anti VSP9B10A. Así mismo la presencia de la forma libre de la proteína VSP9B10A en los sobrenadantes de los co-cultivos en función del tiempo se evaluó por inmuno-detección a tiempos más cortos: 30, 45, 60, 75 y 90 minutos. En estos ensayos se observó que esta proteína está presente en todos los tiempos que se analizaron mientras que en los sobrenadantes provenientes de la interacción con trofozoítos WB su detección solo ocurre a tiempos largos mayores a 90 minutos (**Figura 28**).

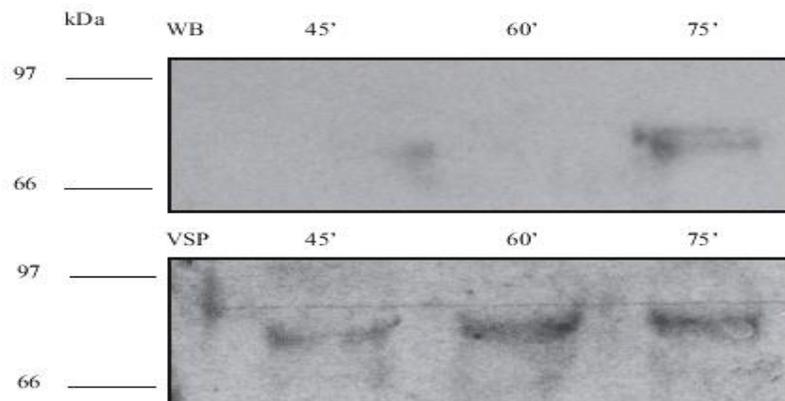
Lo anterior sugiere que el daño generado a la monocapas se relaciona, en parte, con la expresión, presencia y liberación de la proteína VSP9B10A durante la interacción y que es su presencia desde el inicio de la co-incubación es clave para la producción del efecto.





**Figura 27. Efecto de la incubación de trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A con el anticuerpo anti VSP9B10A en co-cultivos con monocapas de células IEC-6.**

En el panel A) se observa el efecto de la población de trofozoítos VSP9B10A.pAC en la integridad de la monocapa de células IEC-6. En el panel B) se observa que no hay daño en la monocapa cuando los trofozoítos VSP9B10A.pAC son incubados con el anticuerpo policlonal  $\alpha$ -VSP9B10A previo a la incubación con las células epiteliales. En el panel C) se observa el daño a la monocapa cuando esta se incubo con el sobrenadante proveniente de la interacción IEC-6/VSP9B10A.pAC.



**Figura 28. Cinética de la liberación de la proteína VSP9B10A durante la interacción con monocapas de células IEC-6**

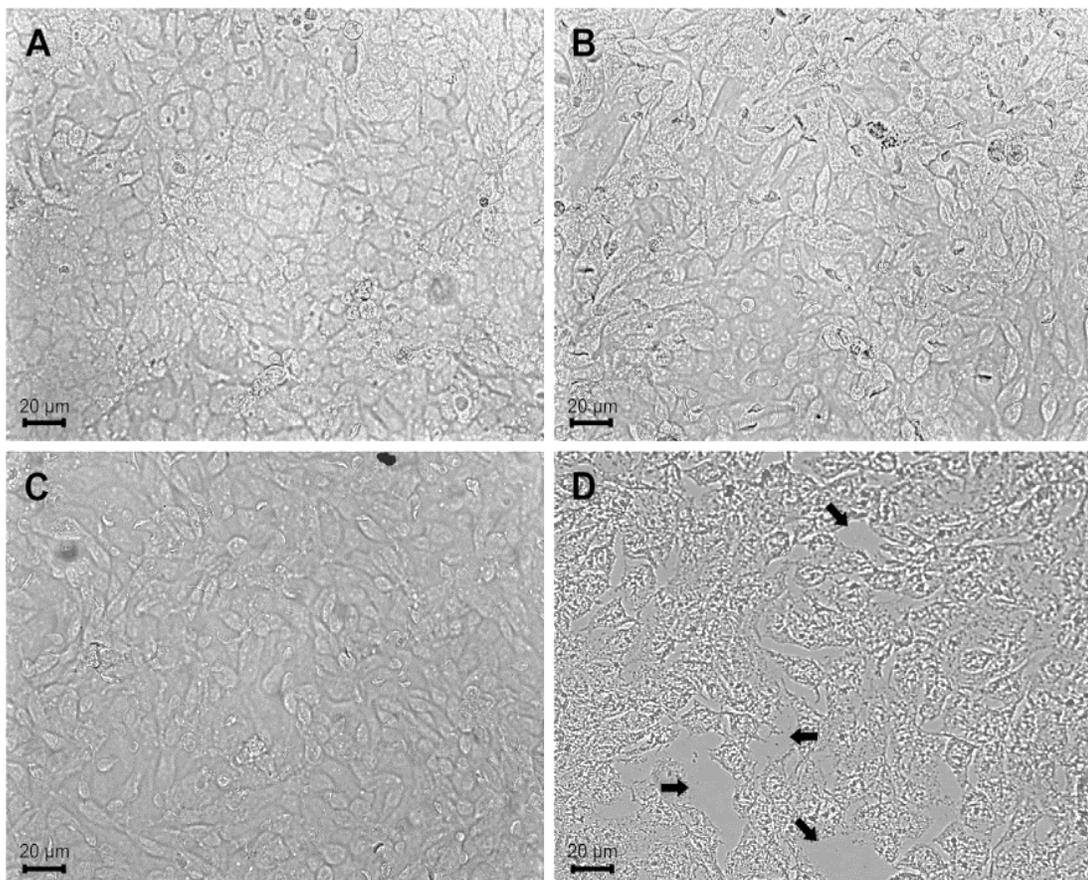
La presencia de la proteína VSP9B10A en los sobrenadantes de interacción se analizó por Western-blot a distintos intervalos de tiempo, durante las dos horas de interacción. En el panel superior se observa que ésta solo se encuentra 75 minutos después del inicio de la interacción entre IEC-6-WB trofozoítos; mientras que en los sobrenadantes provenientes de la co-incubación de células IEC.6 con los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A la banda está presente en todos los tiempos analizados y se observó un incremento de esta en función del tiempo.

### **Establecimiento del efecto de la población de trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A en monocapas de células MDCK y proteínas de las uniones estrechas**

Los resultados obtenidos en los experimentos con el modelo de las células epiteliales IEC-6 sugirieron que la proteína VSP9B10A puede estar, en parte, actuando directa o indirectamente sobre los contactos célula-célula que mantienen las uniones entre ellas. Para estudiar el efecto sobre estos complejos celulares en esta fase experimental se empleó como modelo la línea epitelial MDCK debido a que éstas poseen, por su origen, uniones más densas y estables que las células IEC-6. En los ensayos de interacción con las células MDCK se observó que los daños a la monocapa son similares a los generados en las monocapas de IEC-6 durante la incubación con los trofozoítos VSP9B10A.pAC; caracterizado por la separación de las células (**Figura 29**). Lo anterior nos permite sugerir que el efecto de los trofozoítos que establemente expresan a la proteína VSP9B10A no es dependiente de la fuerza de las uniones celulares ni del modelo celular usado por lo que es posible que actúe a través de un mecanismo general.

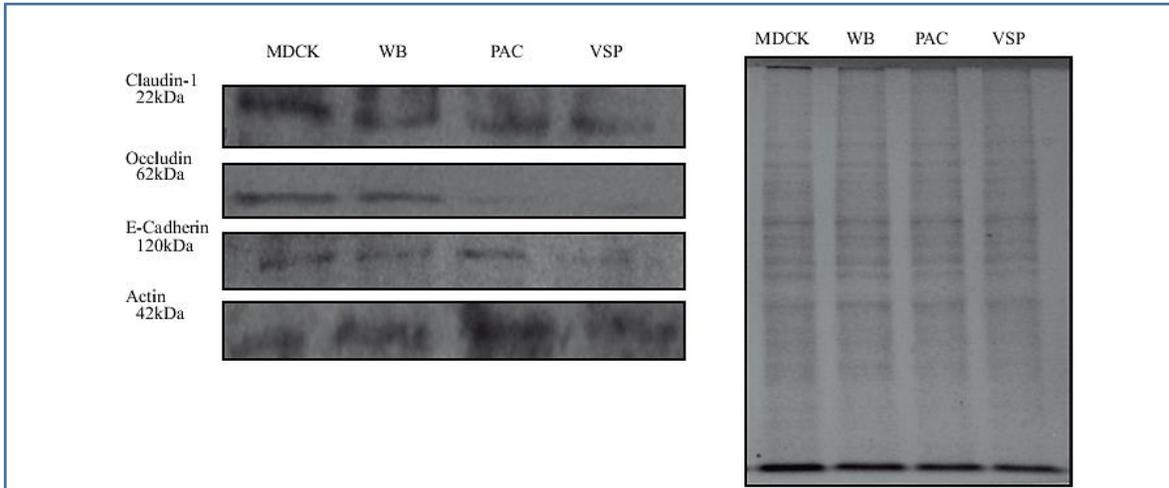
Con base en estas consideraciones se procedió a evaluar el estado de las proteínas que mantienen las uniones inter celulares y que son relevantes en conservar la integridad de la barrera epitelial. Específicamente se evaluaron las proteínas de las uniones estrechas, ocludina y claudina-1; y el estado de la proteína E-cadherina de las uniones adherentes por inmunodetección. En estos ensayos se observó una disminución en ocludina y E-cadherina con respecto al control de actina en las monocapas incubadas con los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A. (**Figura 30**). Estos ensayos deben llevarse a cabo nuevamente con la finalidad de determinar la reproducibilidad de los mismos.

En este mismo modelo celular se cuantificó el daño a la monocapa mediante ensayos de viabilidad con el método de MTT. Los resultados obtenidos mostraron que las monocapas incubadas con los trofozoítos VSP9B10A.pAC son menos viables que las incubadas con las poblaciones de trofozoítos que no expresan esta proteína (**Figura 31**). Todos los resultados previamente descritos sugieren que los trofozoítos que constitutivamente expresan a la proteína VSP9B10A alteran, en parte, el estado de las proteínas que forman las uniones intercelulares generando la pérdida de la continuidad de las monocapas.



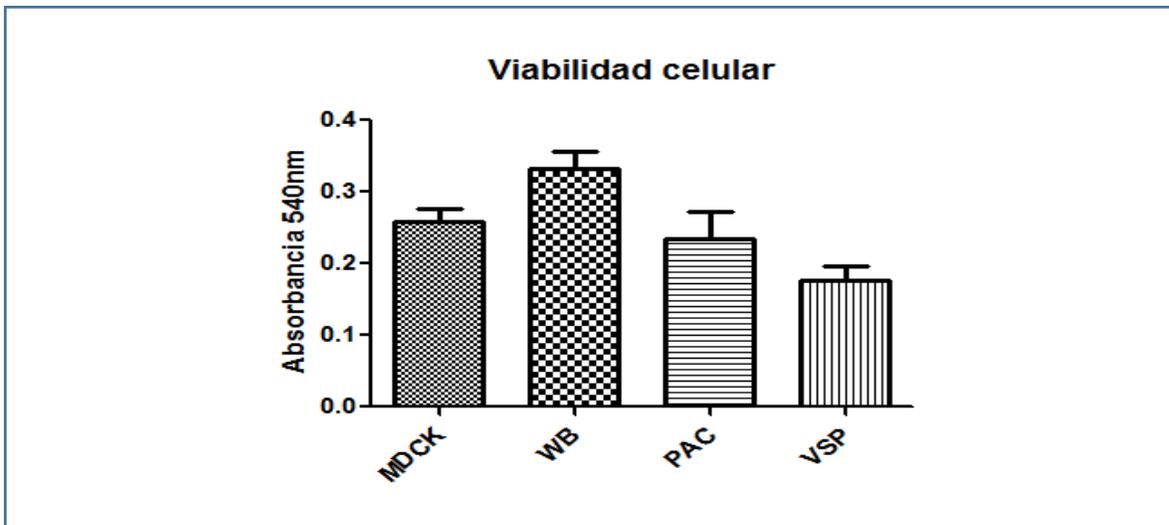
**Figura 29. Efecto de los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VS9P9B10A sobre monocapas de células MDCK**

En A) se muestra la monocapa de células MDCK sin incubar con trofozoítos. En B) las monocapas co-incubadas con trofozoítos WB y en C) con trofozoítos transfectados con el vector vacío. En estas monocapas no se observaron daños o cambios en la morfología celular. En las monocapas incubadas con los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A se observaron daños a la integridad de la monocapa y la separación de las células.



**Figura 30. Efecto de los trofozoítos VSP9B10A.pAC sobre las proteínas de las uniones estrechas y adherentes en monocapas de células MDCK**

Las proteínas de las uniones estrechas Claudina 1 y Ocludina se evaluaron en monocapas MDCK cuando se incubaron con trofozoítos control o transfectados con el vector VSP9B10APAC. En el panel A se muestran los resultados de la inmuno-detección. En estos se observó la disminución de la proteína Ocludina de las uniones estrechas y de E-cadherina de las uniones adherentes, solo en los extractos de las monocapas incubadas con los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A. La proteína actina se empleó como control de carga. En el panel B se muestran las proteínas totales de los extractos de las monocapas visualizadas por tinción de azul de Coomassie.



**Figura 31. Evaluación de la viabilidad celular en monocapas de células MDCK incubadas con los trofozoítos VSP9B10A.pAC**

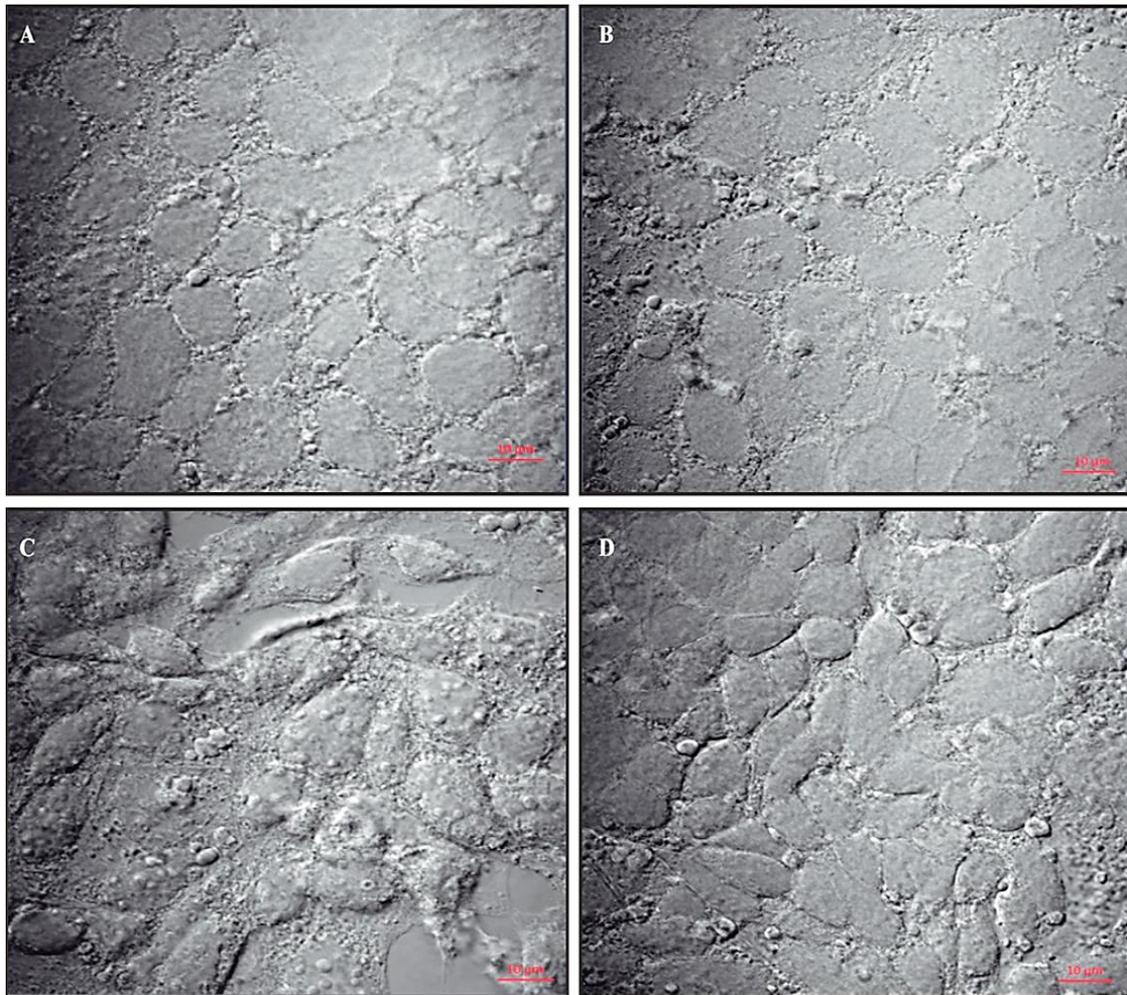
Se realizaron ensayos de MTT para determinar la viabilidad de las células MDCK incubadas con las diferentes poblaciones de trofozoítos que expresan o no la proteína VSP9B10A después de 18 horas de co-incubación. La gráfica muestra que en la población que expresa la proteína VSP9B10A disminuye la viabilidad celular en mayor proporción que las poblaciones que no la expresan (n=9, P< 0.05).

### **Establecimiento del efecto de la población de trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A en monocapas de células Caco-2/TC7**

Debido a que la integridad de la barrera epitelial en el intestino es primordial para evitar la entrada de patógenos intestinales y a que la célula blanco de *Giardia* es el enterocito se procedió a evaluar el efecto de estos trofozoítos sobre monocapas de células Caco-2/TC7 de intestino humano. Esta línea celular corresponde fenotípicamente al intestino delgado humano y puede diferenciarse de un fenotipo proliferativo representativo de las células de la cripta del intestino a células no proliferativas correspondientes a las células de las vellosidades intestinales (Maia-Brigagao et al., 2012; Sambuy et al., 2005). En estos ensayos se observó que los daños más evidentes se presentan en las monocapas no diferenciadas, en las cuales se presenta el redondeamiento de las células y la pérdida de la continuidad de la monocapa (**Figura 32 y 39**). Estos daños solo se encontraron en aquellas monocapas incubadas con los trofozoítos VSP9B10A.pAC y no en las incubadas con los trofozoítos WB o con la población de trofozoítos donde la expresión de la proteína VSP9B10A se silenció (VSP9B10A-INV.pAC).

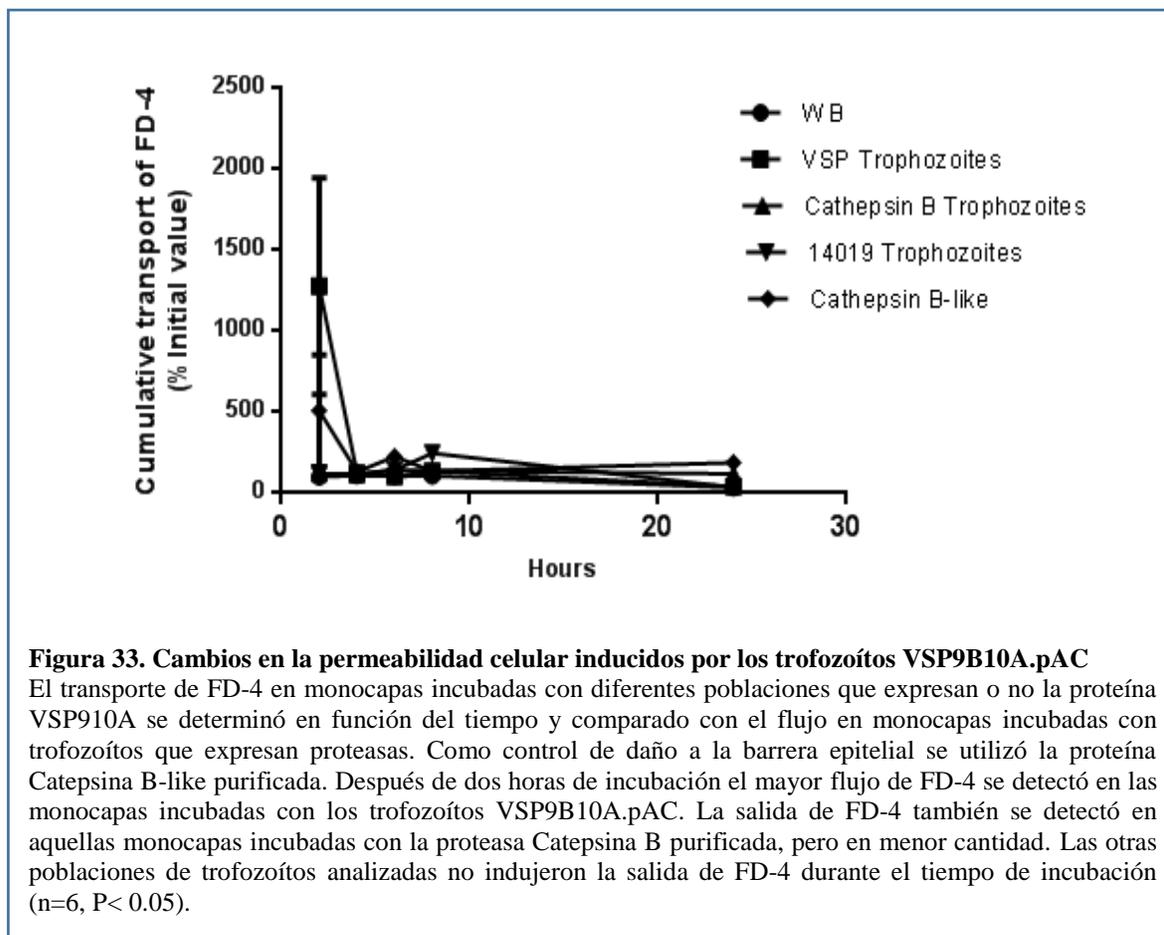
El daño generado en estas monocapas por la población de trofozoítos VSP9B10A.pAC se cuantificó de manera indirecta por el incremento del flujo paracelular a través de la evaluación de la presencia de una molécula marcada con un fluoróforo (DEXTRAN-FITC), en la zona basal de las monocapas en función del tiempo 2, 4, 6, 8 y 24 horas. En este ensayo se incluyó a poblaciones de trofozoítos transfectados que expresan constitutivamente a las proteasas Catepsina B-like y la 14019 de *Giardia*; así como a la proteína Catepsina B like purificada, la cual previamente se estableció que altera la TEER de monocapas de células MDCK (Gomez-Mondragon, 2011).

Los resultados mostraron que la mayor cantidad de dextrán se encuentra en la parte basal de aquellas monocapas incubadas con los trofozoítos VSP9B10A.pAC a solo dos horas de interacción (**Figura 33**) y que este efecto es similar al inducido por la proteasa Catepsina B-Like purificada mientras que con las otras poblaciones de trofozoítos no se observa un incremento en la presencia de esta molécula incluso al final del experimento; estableciendo de esta manera una relación directa entre los daños observados a nivel microscopia y la pérdida de la integridad de la barrera epitelial.



**Figura 32. Efectos de los trofozoítos VSP9B10A.pAC y  $\Delta$ VSP9B10A.pAC en monocapas de células Caco-2/TC7**

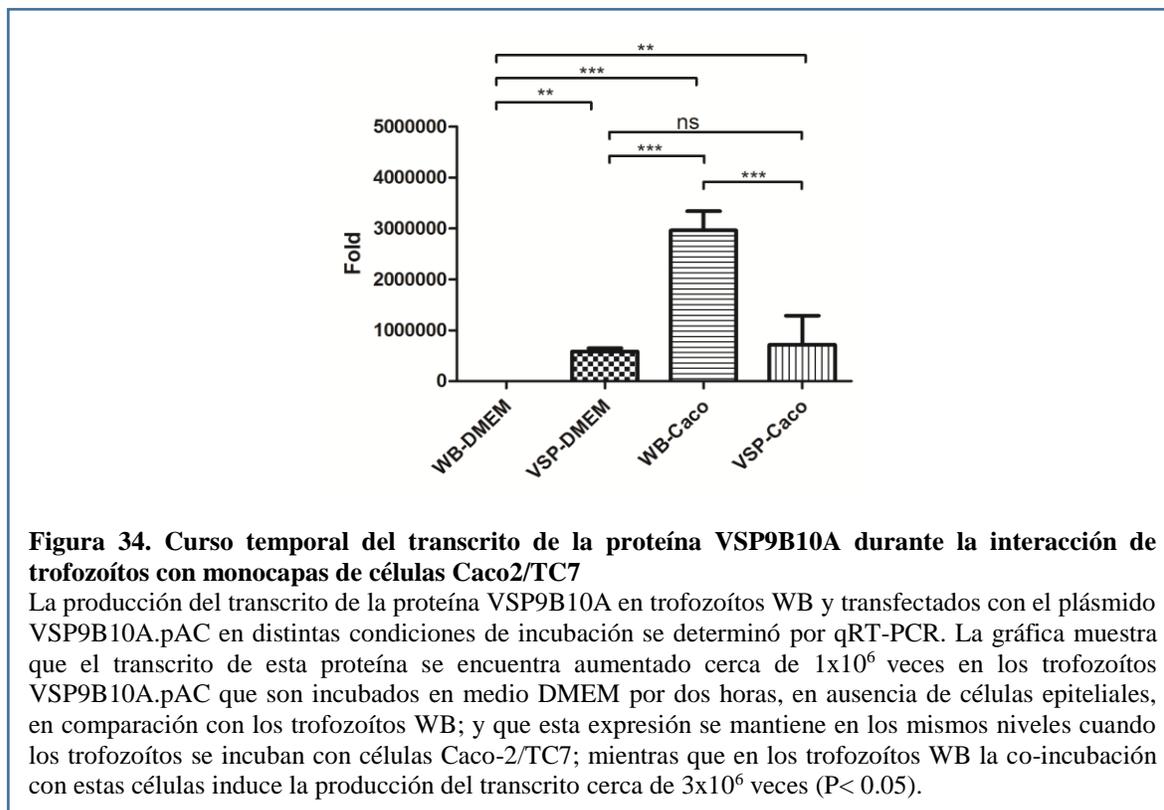
Micrograffías de microscopia confocal que muestran en A) la morfología normal de una monocapa de células epiteliales Caco2/TC7. En B) Monocapas incubadas por 24 horas con trofozoítos WB, no se observan cambios entre las dos monocapas. En C) se observa la pérdida de la integridad de la monocapa y de las uniones célula -célula en aquellas monocapas incubadas con trofozoítos VSP9B10A.pAC. El efecto no se observa cuando la monocapa es incubada con trofozoítos donde la expresión de la proteína VSP9B10A se silenció D).



### Determinación de cambios en la expresión del transcrito y la proteína VSP9B10A durante la co-incubación con monocapas de células Caco-2/TC7

De manera complementaria se analizó el comportamiento del transcrito y la proteína VSP9B10A antes y después de la interacción con las monocapas de células Caco-2/TC7. La cuantificación del transcrito por la técnica de PCR en tiempo real mostró que este se incrementa  $3 \times 10^6$  veces en los trofozoítos WB dos horas después de la interacción en comparación con los trofozoítos que no fueron incubados con células epiteliales y disminuye 24 horas después. En la población de trofozoítos VSP910A.pAC, la presencia del transcrito es alta en los trofozoítos que no fueron incubados con células epiteliales,  $1 \times 10^6$  veces, y se mantiene en el mismo nivel de expresión durante las 2 y 24 horas de co-incubación con estas (Figura 34).

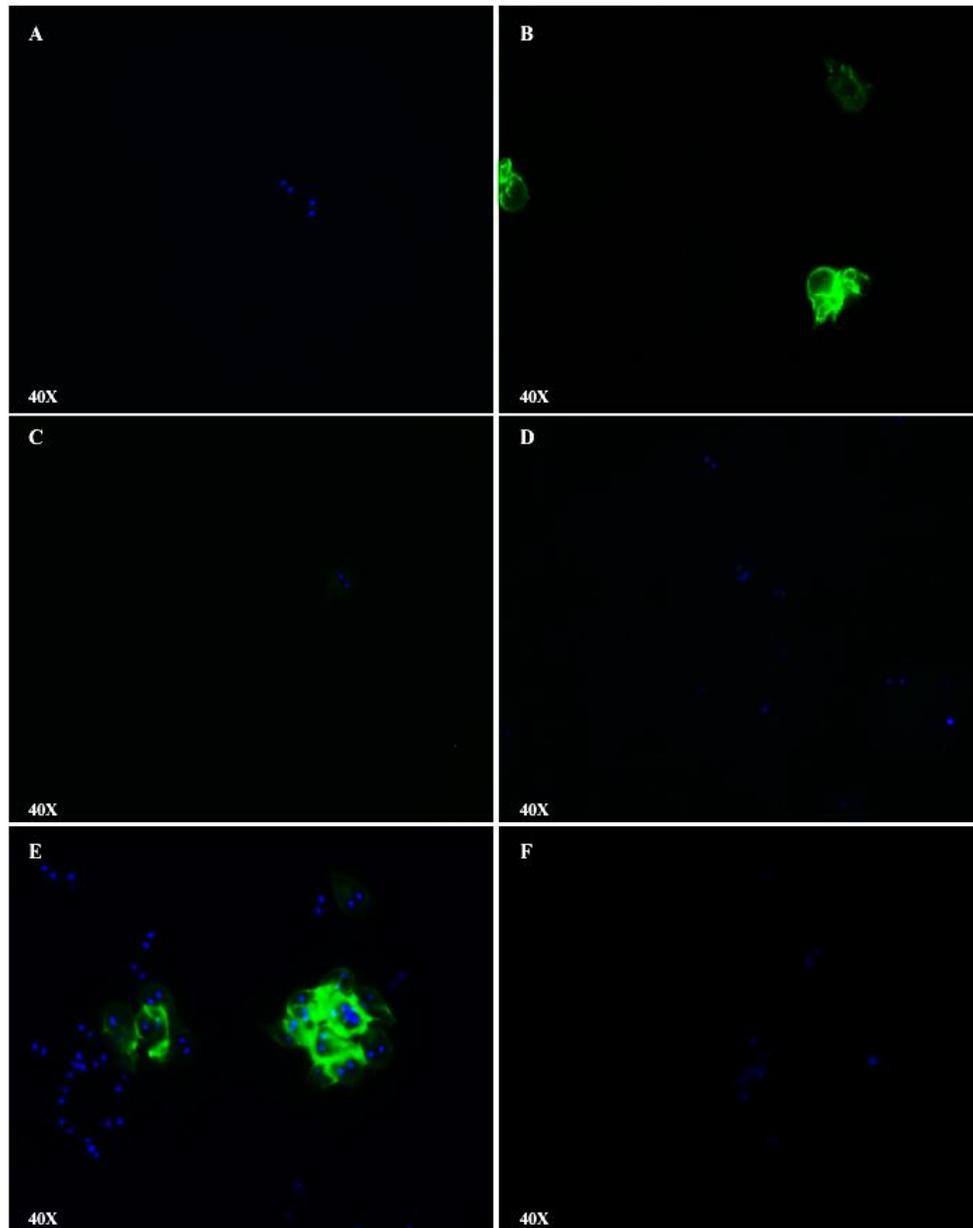
En cuanto a la expresión de la proteína VSP9B10A ésta se analizó por inmunofluorescencia en trofozoítos antes y después de la interacción y en presencia y ausencia de monocapas utilizando el anticuerpo monoclonal anti-9B10 (Lujan et al., 1995; Nash et al., 2001) se observó que la proteína VSP9B10A no se expresa en trofozoítos WB en ausencia de monocapas de células Caco-2/TC7.



**Figura 34. Curso temporal del transcrito de la proteína VSP9B10A durante la interacción de trofozoítos con monocapas de células Caco2/TC7**

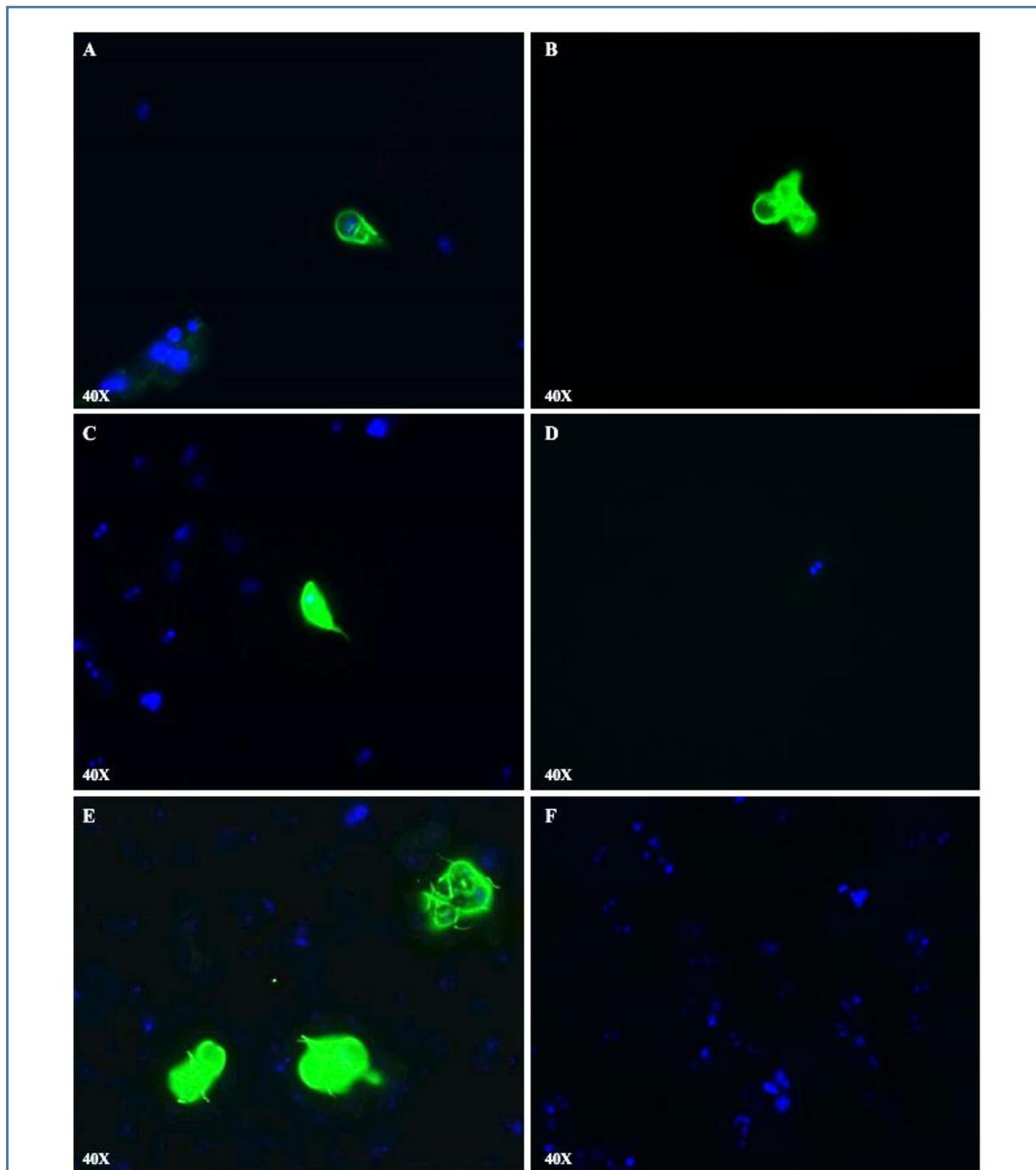
La producción del transcrito de la proteína VSP9B10A en trofozoítos WB y transfectados con el plásmido VSP9B10A.pAC en distintas condiciones de incubación se determinó por qRT-PCR. La gráfica muestra que el transcrito de esta proteína se encuentra aumentado cerca de  $1 \times 10^6$  veces en los trofozoítos VSP9B10A.pAC que son incubados en medio DMEM por dos horas, en ausencia de células epiteliales, en comparación con los trofozoítos WB; y que esta expresión se mantiene en los mismos niveles cuando los trofozoítos se incuban con células Caco-2/TC7; mientras que en los trofozoítos WB la co-incubación con estas células induce la producción del transcrito cerca de  $3 \times 10^6$  veces ( $P < 0.05$ ).

Sin embargo, después de dos horas en contacto con las células epiteliales el número de trofozoítos reactivos al anticuerpo se incrementó (**Figura 35**), coincidiendo con el incremento del transcrito. En contraparte en los trofozoítos VSP9B10A.pAC la expresión de la proteína es constante en ausencia y presencia de células epiteliales (**Figura 36**) de igual manera que el transcrito. Los ensayos de inmunofluorescencias también permitieron observar que en los trofozoítos recuperados después de 24 horas de interacción el patrón de distribución de la proteína VSP cambió a puntos discontinuos en la superficie del trofozoíto (**Figura 37**). Durante estos ensayos de interacción también se analizó el perfil de las proteasas presentes en cada sobrenadante proveniente de las distintas co-incubaciones.



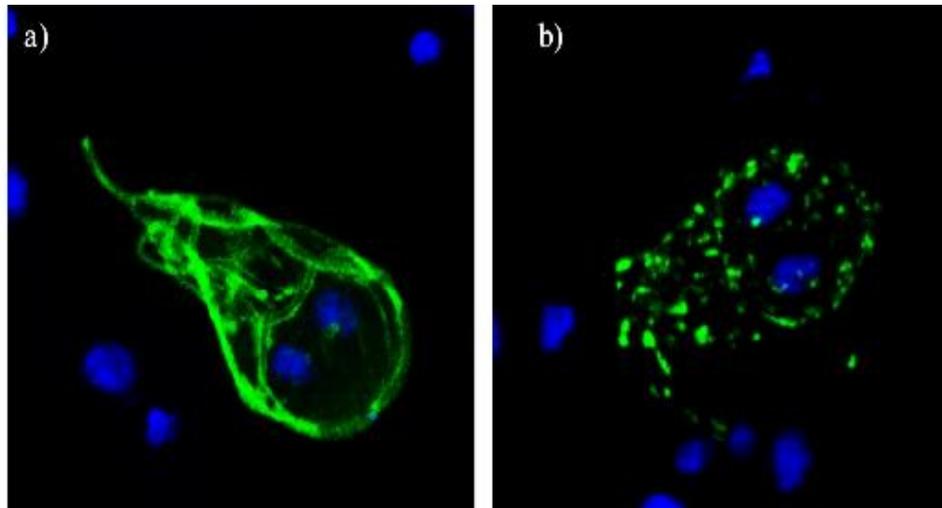
**Figura 35. Expresión de la proteína VSP9B10A en trofozoítos WB incubados con monocapas de células Caco2/TC7.**

Mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo Mc anti 9B10 se determinó la expresión de la proteína VSP9B10A en trofozoítos WB a 2 y 24 horas de incubación en presencia y ausencia de células epiteliales. En A) se muestra a la población de trofozoítos al inicio del ensayo en la cual se encontraron pocas células reactivas. Dos horas después en medio específico para *Giardia* algunas células son reactivas B), Cuando los trofozoítos se incuban en medio DMEM durante 2 y 24 horas en ausencia de células epiteliales no hay reactividad al anticuerpo C) y D). El número de células reactivas se incrementa cuando los trofozoítos se incuban en presencia de la monocapa de células Caco-2 /TC7 por 2 horas E), después de 24 horas de interacción pocas células son reactivas F).



**Figura 36. Expresión de la proteína VSP9B10A en trofozoítos VSP9B10A.pAC incubados con monocapas de células Caco-2/TC7.**

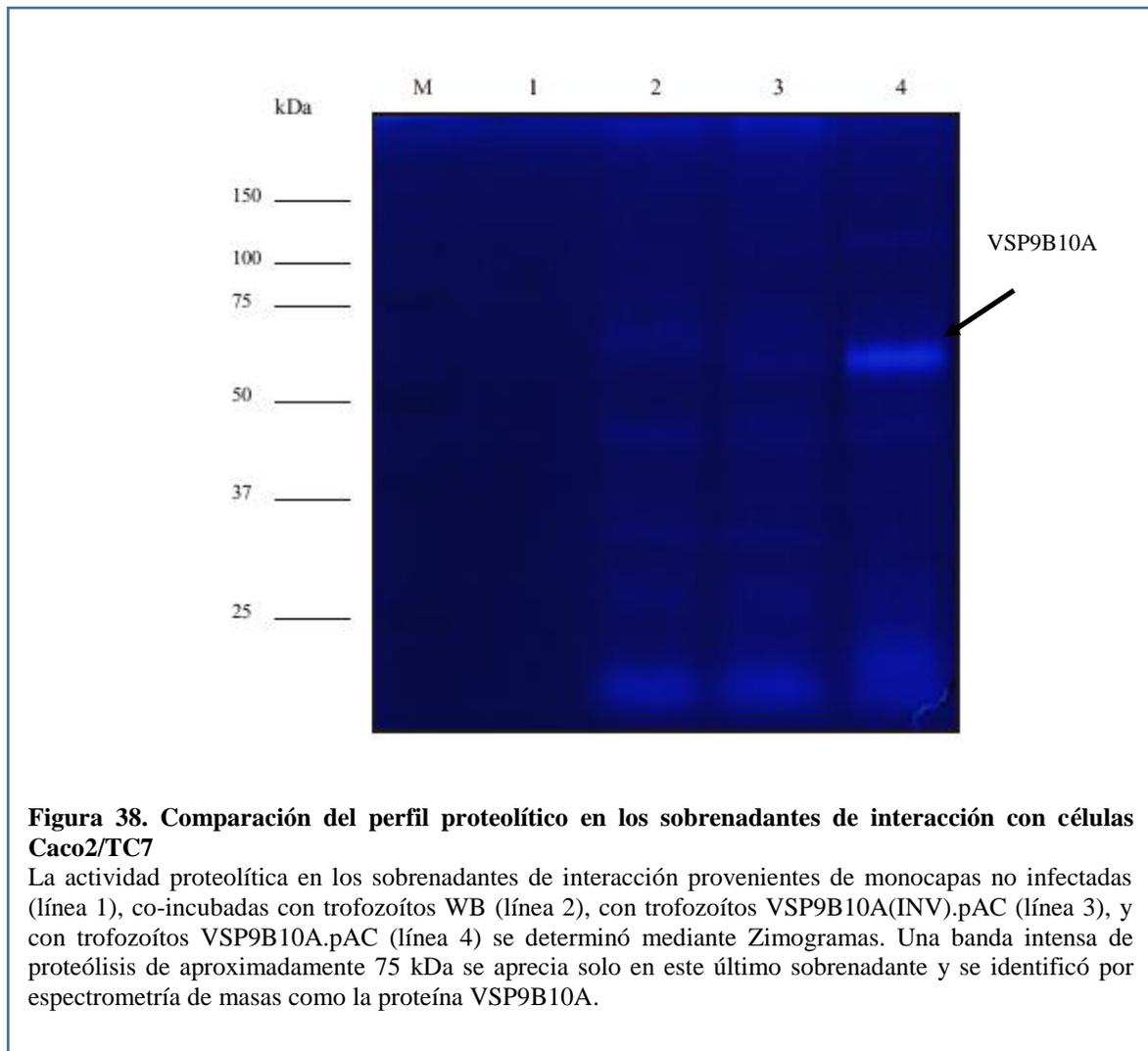
La expresión de la proteína VSP9B10A en trofozoítos VSP9B10A.pAC se determinó a 2 y 24 horas de incubación en presencia o ausencia de células epiteliales. Al inicio del experimento la población expresó a la proteína A). Dos horas después de la incubación en medio específico de *Giardia* la población sigue siendo reactiva B) Cuando los trofozoítos se incuban en medio DMEM en ausencia de células epiteliales por 2 horas éstas siguen siendo reactivas C); 24 horas después no se detectan trofozoítos positivos D). En presencia de las monocapas de células Caco-2/TC7 se observaron más células reactivas E) y 24 horas después de la co-incubación se detectaron pocas células positivas F).



**Figura 37. Cambios en el patrón de localización de la proteína VSP9B10A después de la interacción con células Caco2/TC7**

El patrón normal de localización de la proteína VSP9B10A en los trofozoítos VSP9B10A.pAC se muestra en la microfotografía a) en trofozoítos antes de ser co-incubados con monocapas Caco-2/TC7. La localización de esta proteína cambia después de 24 horas de co-incubación y el patrón se observa como puntos dispersos en la superficie del trofozoíto b).

En estos se observó una banda de actividad proteolítica de aproximadamente 75 kDa solo en aquellos provenientes de la interacción de la monocapa con trofozoítos VSP9B10A.pAC (**Figura 38**) similar a los resultados obtenidos cuando los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A se incubaron con monocapas de células IEC-6. Esta banda se analizó por espectrometría de masas y se identificó como la proteína VSP9B10A junto con otras proteasas como alanil dipeptidil peptidasa y Xaa\_Pro dipeptidasa, además de proteínas no proteolíticas como Hsp70 y 90, peroxirredoxina, ADI, OCT y glucosa -6 fosfato isomerasa. Los resultados obtenidos en su conjunto sugieren que al entrar en contacto los trofozoítos con las células epiteliales la proteína VSP9B10A se libera, cambiando su distribución en los trofozoítos, y que es esta forma libre de la proteína la que en parte ocasiona la pérdida de la integridad de la monocapa probablemente debido a su actividad proteolítica, como se observó en zimogramas.



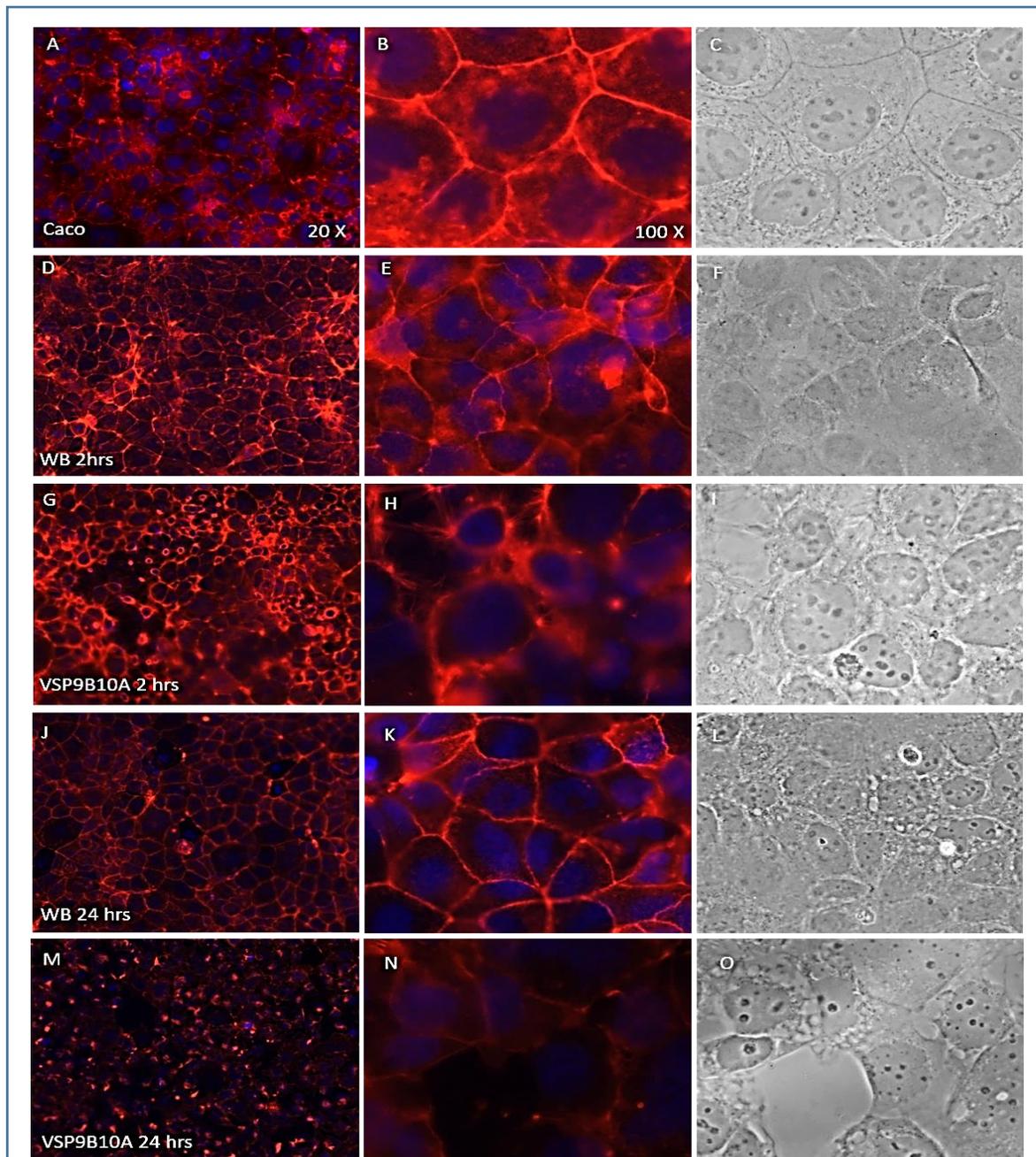
**Figura 38. Comparación del perfil proteolítico en los sobrenadantes de interacción con células Caco2/TC7**

La actividad proteolítica en los sobrenadantes de interacción provenientes de monocapas no infectadas (línea 1), co-incubadas con trofozoítos WB (línea 2), con trofozoítos VSP9B10A(INV).pAC (línea 3), y con trofozoítos VSP9B10A.pAC (línea 4) se determinó mediante Zimogramas. Una banda intensa de proteólisis de aproximadamente 75 kDa se aprecia solo en este último sobrenadante y se identificó por espectrometría de masas como la proteína VSP9B10A.

### **Determinación del efecto de la población de trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A en las proteínas de las uniones estrechas de monocapas de células Caco-2/TC7**

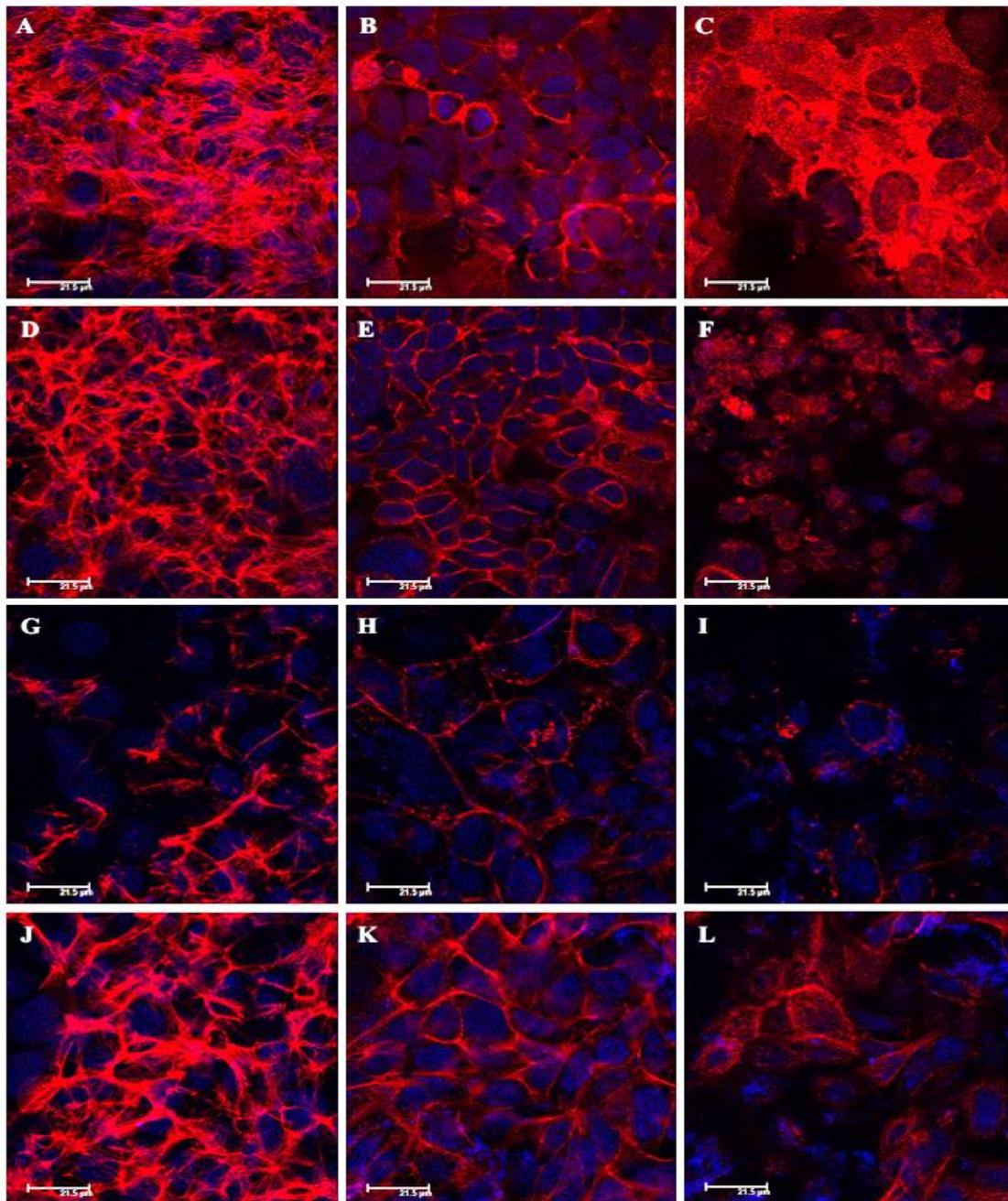
Se determinó el estado de las proteínas de las uniones célula-célula durante la co-incubación de las células Caco-2/TC7 con los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A. La localización de las proteínas del complejo de unión apical F-actina, ZO-1, Ocludina y Claudina se analizaron mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta y por inmuno-detección empleando ensayos de Western-blot. En el caso de la proteína F-actina, ésta forma el cinturón que mantiene los contactos célula-célula en el complejo de unión apical, los contactos focales que permiten la unión a la matriz celular y las microvellosidades en la parte apical de los enterocitos. En las monocapas incubadas con las diferentes

poblaciones de trofozoítos que expresan o no a la proteína VSP9B10A se evaluó la localización de F-actina a través de inmunofluorescencia directa con Faloidina y microscopía de epifluorescencia. En estos ensayos se observó que después de 2 horas de co-incubación con los trofozoítos que constitutivamente expresan a la proteína VSP9B10A se generaron cambios en la distribución de F-actina y daños a la monocapa de células Caco-2 TC7 proliferativas (**Figura 39**). Específicamente se observó se pierde el patrón de localización característico en forma de “panal de abeja” de esta proteína y su distribución en las microvellosidades del enterocito. Después de 24 horas los daños en la integridad de la monocapa y la pérdida completa de la localización de actina en las uniones estrechas, que da paso a la aparición de estructuras redondeadas, es aún más evidente en las monocapas incubadas con los trofozoítos VSP9B10A.pAC. Los cortes horizontales obtenidos por microscopía confocal permitieron un estudio más detallado de los efectos de los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A sobre las estructuras formadas por F-actina. En estos se observó que después de 24 horas de incubación el acortamiento de las microvellosidades es inducida por las tres poblaciones de trofozoítos utilizadas: los WB, los que expresan establemente la proteína VSP9B10A y la población de trofozoítos donde la expresión de esta proteína se silenció; mientras que en la monocapa sin infectar las microvellosidades se encuentran intactas. (**Figura 40**). En contraste, en los cortes correspondientes a la ubicación de las uniones estrechas, el patrón de “panal de abeja” se mantiene en las monocapas sin infectar y en aquellas infectadas con los trofozoítos WB y VSP (INV).pAC; mientras que éste sufre modificaciones en las monocapas incubadas con los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A (**Figura 40**). Finalmente, la distribución de actina en los contactos focales también se ve alterada en las monocapas provenientes de esta interacción y no así en aquellas incubadas con las poblaciones control. En conjunto, estos resultados sugieren que, aunque la liberación de la proteína VSPB10A por los trofozoítos altera la organización de F-actina en los tres niveles de unión celular, su efecto es específico en las uniones estrechas y los contactos focales. (**Figura 40**). La pérdida en la continuidad del cinturón de F-actina, así como los cambios en la distribución normal de esta proteína se observaron con más detalle en los cortes en transversal X---Z que se muestran más adelante en la **Figura 46**.



**Figura 39. Alteraciones del patrón de F-actina en monocapas de células Caco-2/TC7 después de 2 y 24 horas de interacción.**

Los cambios en la distribución de F-actina durante dos y 24 horas de interacción se analizaron en las células Caco2/TC7 incubadas con las poblaciones de trofozoítos que expresan o no la proteína VSP9B10A. A, B y C, vistas horizontales de microscopía de epifluorescencia de F-actina en las monocapas de células Caco-2 sin tratamiento durante dos horas. D, E y F muestran a monocapas después de 2 horas de interacción con trofozoítos WB, en estas se observaron cambios en las microvellosidades s. En G, H e I, la pérdida de la integridad de las uniones célula-célula se observó después de dos horas de interacción con la población de trofozoítos que expresan a la proteína VSP9B10A, el patrón de “panal de abeja se pierde en algunas zonas y la separación de las células se observa en la micrografía de campo claro. En J, K y L se muestran las monocapas después de 24 horas de interacción con los trofozoítos WB en éstas se observó que cambios empiezan a aparecer, pero el patrón de distribución de actina se mantiene. En las micrografías M, N y O, se observó la pérdida en la continuidad de la monocapa y alteración en el patrón de actina.

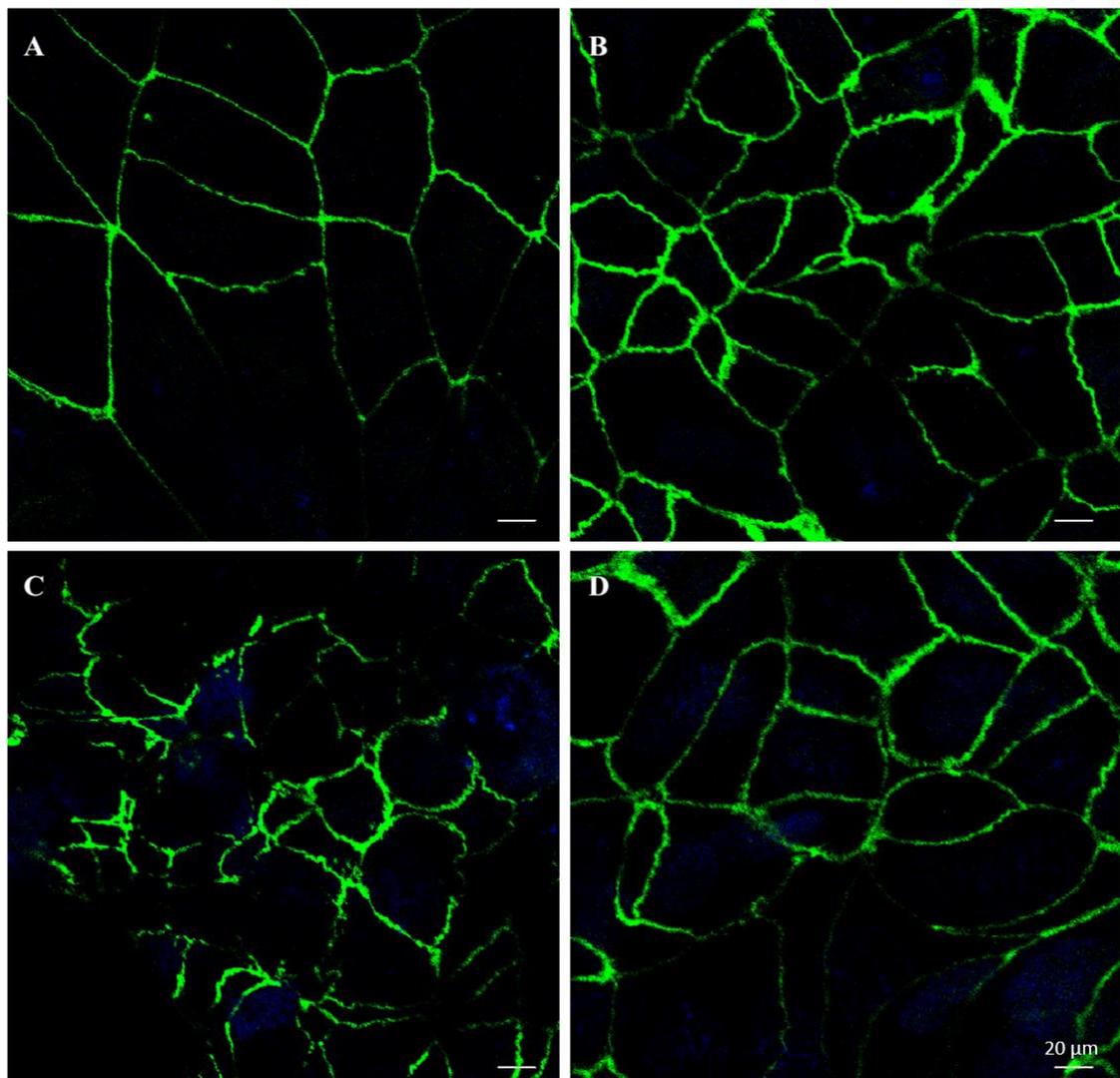


**Figura 40. Cortes horizontales que muestran la localización de F-actina en monocapas de células Caco-2/TC7 incubas con las diferentes poblaciones de trofozoítos que expresan o no la proteína VSP9B10A.**

Micrografías de microscopía confocal CLMS en secciones horizontales mostrando la localización de F-actina en monocapa sin trofozoítos A) plano basal correspondiente a los contactos focales de actina, B) plano medio que muestra las uniones estrechas y C) corte apical donde se aprecian las microvellosidades de actina. D, E y F) muestran los cambios en la distribución de F-actina en las monocapas co-incubadas con trofozoítos WB, específicamente en el plano apical donde las microvellosidades se ven reducidas. G, H e I) Monocapas incubadas con los trofozoítos VSP9B10A.pAC en estas se observan cambios en la distribución de F-actina en todos los planos, específicamente la disminución de F-actina en los contactos focales, las uniones estrechas y en las microvellosidades en la región apical. J, K y L) muestran la distribución de F-actina normal cuando las monocapas son incubadas con la población de trofozoítos que no expresa la proteína VSP9B10A, VSP9B10A (INV).pAC.

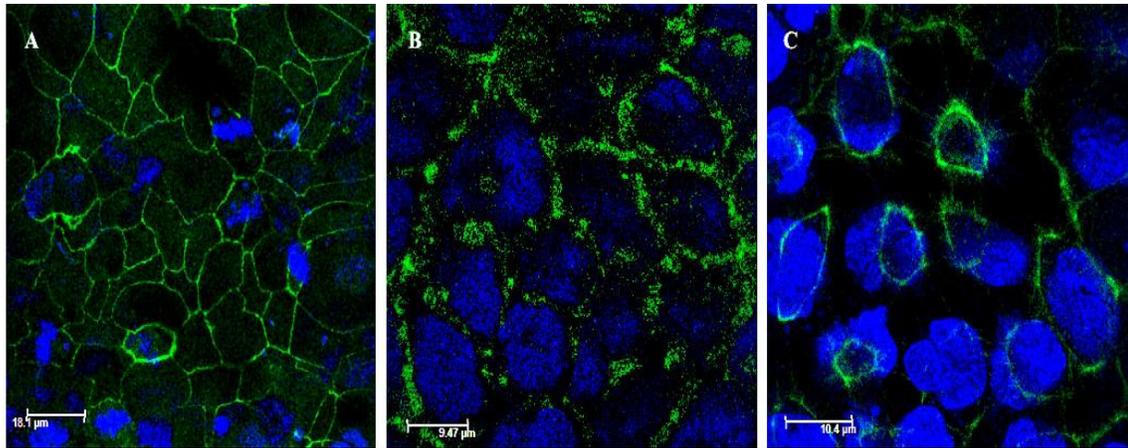
La siguiente proteína que se evaluó del complejo de unión apical fue ZO-1. Esta funciona como un anclaje entre los filamentos de actina y las proteínas Ocludina y Claudina por lo que es esencial en el mantenimiento de la integridad del complejo de unión apical. Normalmente esta proteína se localiza en los contactos célula-célula formando un patrón de “panal de abeja” similar al de F-actina en la zona apical, excepto que ZO-1 solo se localiza en la región media-apical que se aprecia como una línea continua en cortes verticales. Este patrón se observa claramente en las monocapas Caco-2/TC7 sin infectar en cortes horizontales de microscopía confocal (**Figura 41**). Cuando éstas son infectadas con la población de trofozoítos que mayoritariamente expresa la proteína VSP9B10A este patrón se altera; la proteína ZO-1 se localiza en zonas aisladas que no forman el patrón de “panal de abeja” y se puede localizar también en los cortes basales. Esta redistribución no es inducida por los trofozoítos WB o la población donde la proteína VSP9B10A se silenció (**Figura 41**).

Cabe señalar que en algunos ensayos esta redistribución se manifestó como anillos en el citoplasma de la célula epitelial (**Figura 42**). Esta forma citoplasmática parece corresponder con proteína ZO-1 desensamblada de las uniones estrechas la cual es soluble a detergentes, ya que la proteína ZO-1 no es soluble cuando se encuentra ensamblada en el complejo de unión apical. Lo anterior es relevante para la interpretación de los resultados obtenidos en la inmuno-detección por Western-blot que se realizó de esta proteína. En ensayos donde se utilizaron extractos totales de monocapas obtenidos con Tritón X-100 como único detergente, en la fracción soluble se detecta la proteína ZO-1 y se observa una pequeña disminución en aquellas monocapas que se incubaron con trofozoítos VSP9B10A.pAC (**Figura 43**). En cambio, cuando se utiliza un buffer rico en detergentes, la proteína ZO-1 en la fracción soluble se detecta intensamente en los extractos provenientes de estas monocapas y no en los correspondientes a la infección con trofozoítos WB o VSP(INV).pAC (**Figura 43**). Los resultados de la inmuno-detección de ZO-1 sugieren que una forma soluble de la proteína se encuentra solo en las monocapas co-incubadas con los trofozoítos que establemente expresan a la proteína VSP9B10A indicando que no se encuentra ensamblada en el complejo de unión apical y formando parte de las uniones estrechas.



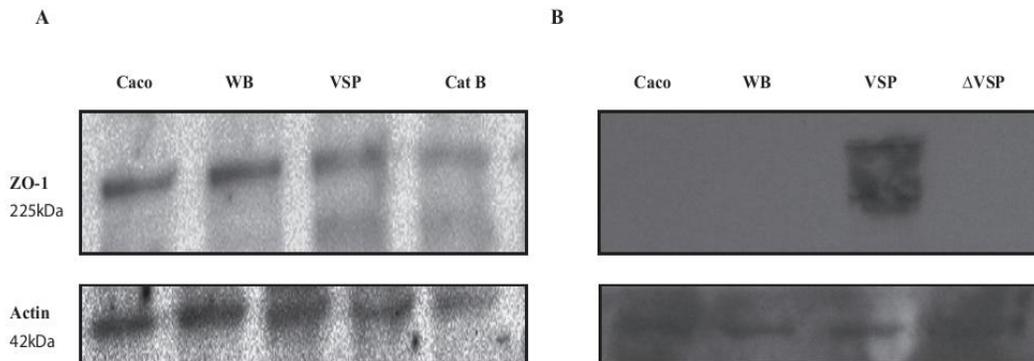
**Figura 41. Efecto de los trofozoítos VSP9B10A.pAC sobre la distribución de ZO-1**

Micrografías de microscopía confocal CLMS en secciones horizontales en las que se detectó mostrando la localización de la proteína ZO-1 en panal de abeja. A) Monocapa sin trofozoítos se aprecia el patrón normal de distribución de la proteína ZO-1 en panal de abeja. B) Este patrón no se ve afectado cuando la monocapa se incubaba con trofozoítos WB. C) Cuando las monocapas se co-cultivan con los trofozoítos VSP9B10A.pAC se observa la pérdida de la continuidad de las uniones y la deslocalización de ZO-1. D) La distribución de ZO-1 no se altera cuando las monocapas son incubadas con la población VSP9B10A (INV).pAC donde su expresión se silenció.



**Figura 42. Distribución citoplasmática de la proteína ZO-1 en monocapas incubadas con trofozoítos VSP9B10A.pAC**

A) Patrón normal de distribución de ZO-1 en las monocapas de células CaCo-2/TC7. B) Se observan cambios pequeños cuando las monocapas se incuban con trofozoítos WB. C) Se observa una distribución anormal de la proteína ZO-1, en anillos citoplasmáticos en las monocapas incubadas con trofozoítos que expresan la proteína VSP9B10A.

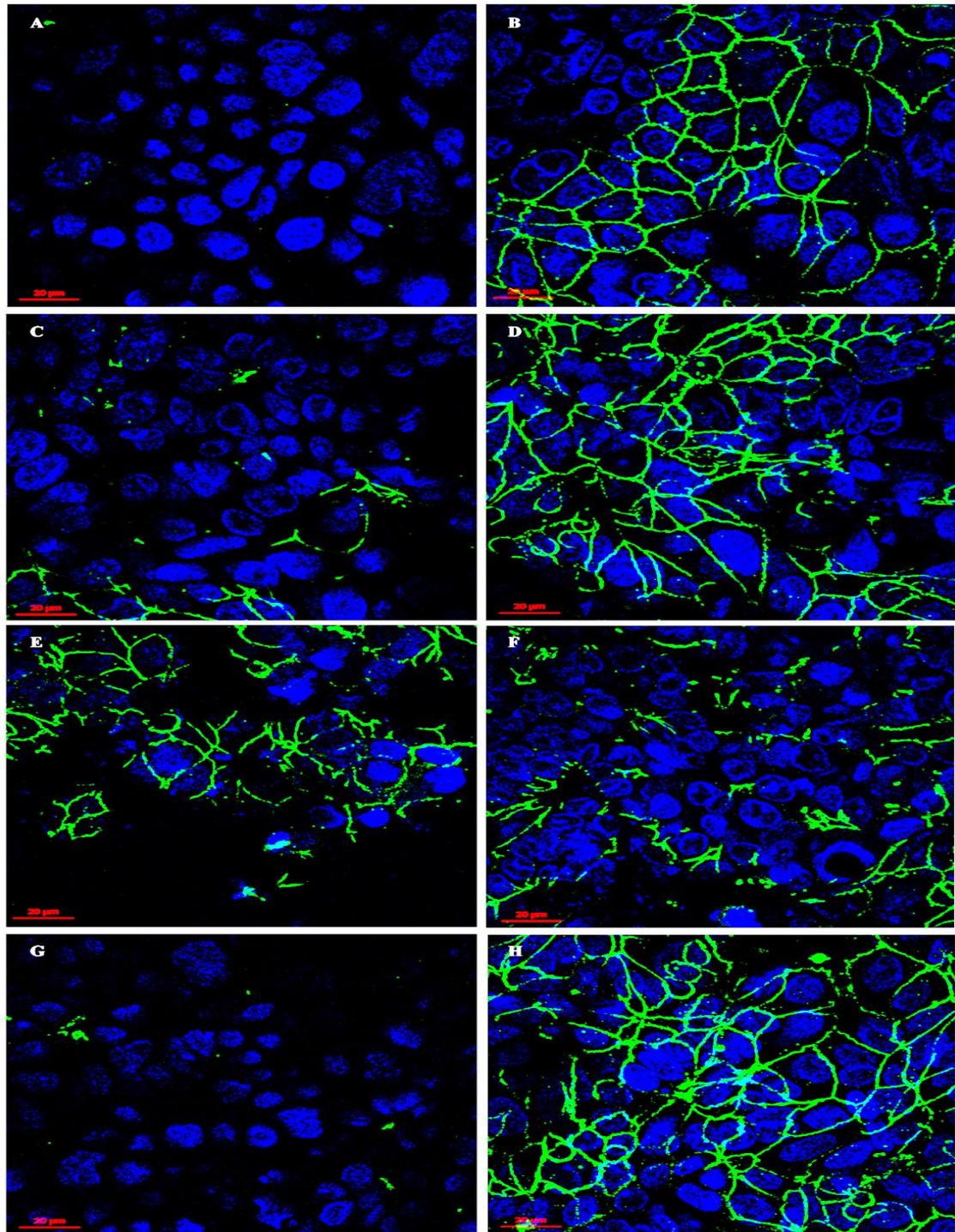


**Figura 43. Inmuno-detección de la proteína ZO-1 en fracciones solubles de monocapas CaCo-2/TC7 incubadas con diferentes poblaciones de trofozoítos que expresan o no la proteína VSP9B10A.**

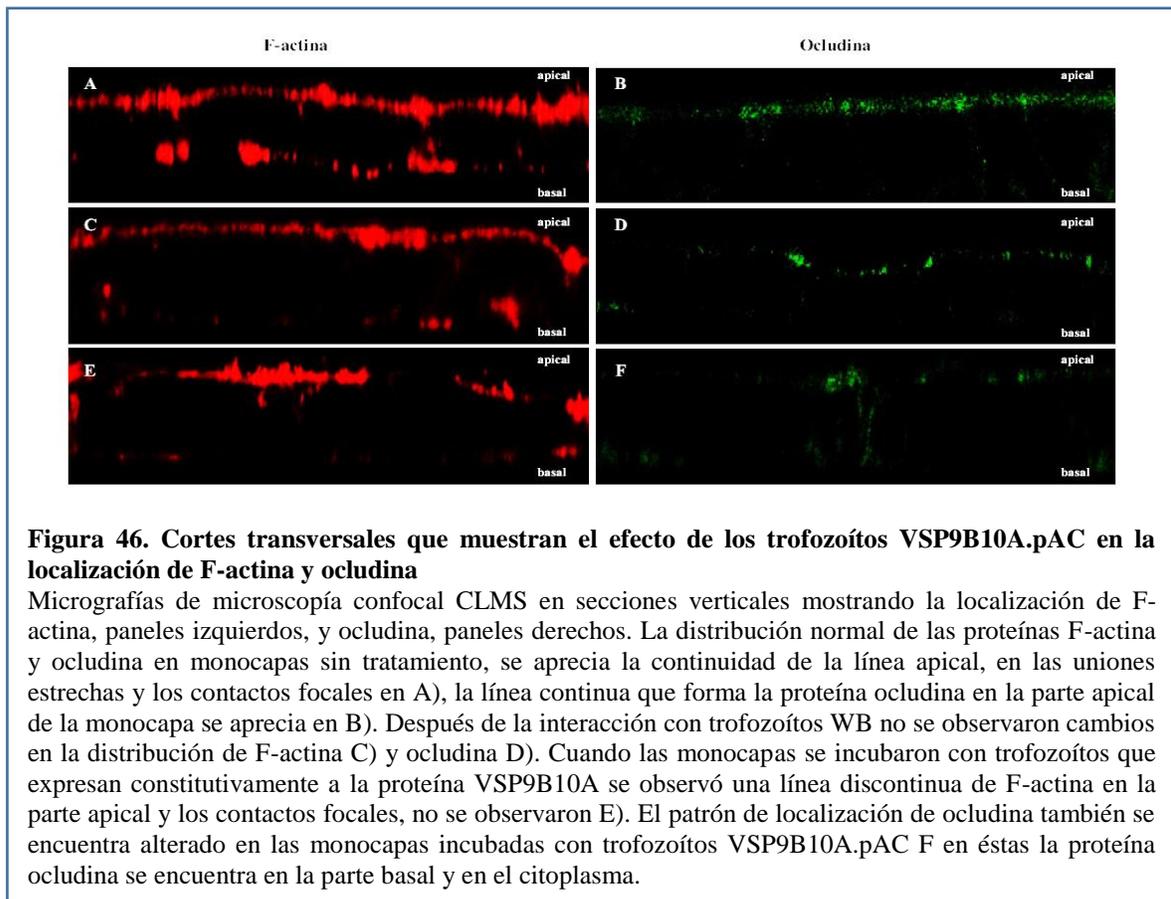
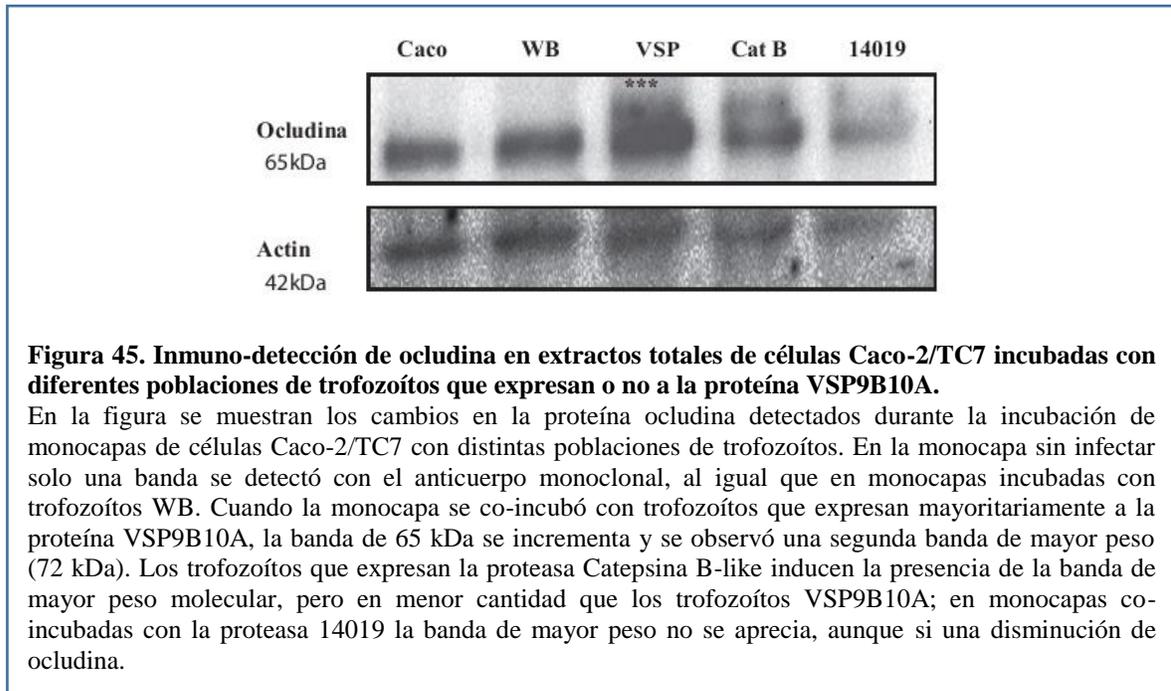
En el panel (A) se observa la inmuno-detección de ZO-1 en la fracción insoluble a detergentes de extractos de monocapas incubadas con las diferentes poblaciones de trofozoítos. En estos se detectó una pequeña disminución de ZO-1 en aquellas monocapas incubadas con trofozoítos que establemente expresan a la proteína VSP9B10A después de 2 horas de interacción en comparación con monocapas incubadas con trofozoítos WB; se observó una mayor disminución cuando se utilizaron trofozoítos que expresan la cisteín proteasa Catepsina B-Like. En el panel B, se muestran los resultados de la inmuno-detección en fracciones solubles a detergentes. En estos se observa inmuno-reactividad solo en los extractos de las monocapas incubadas con trofozoítos que expresan la proteína VSP9B10A.

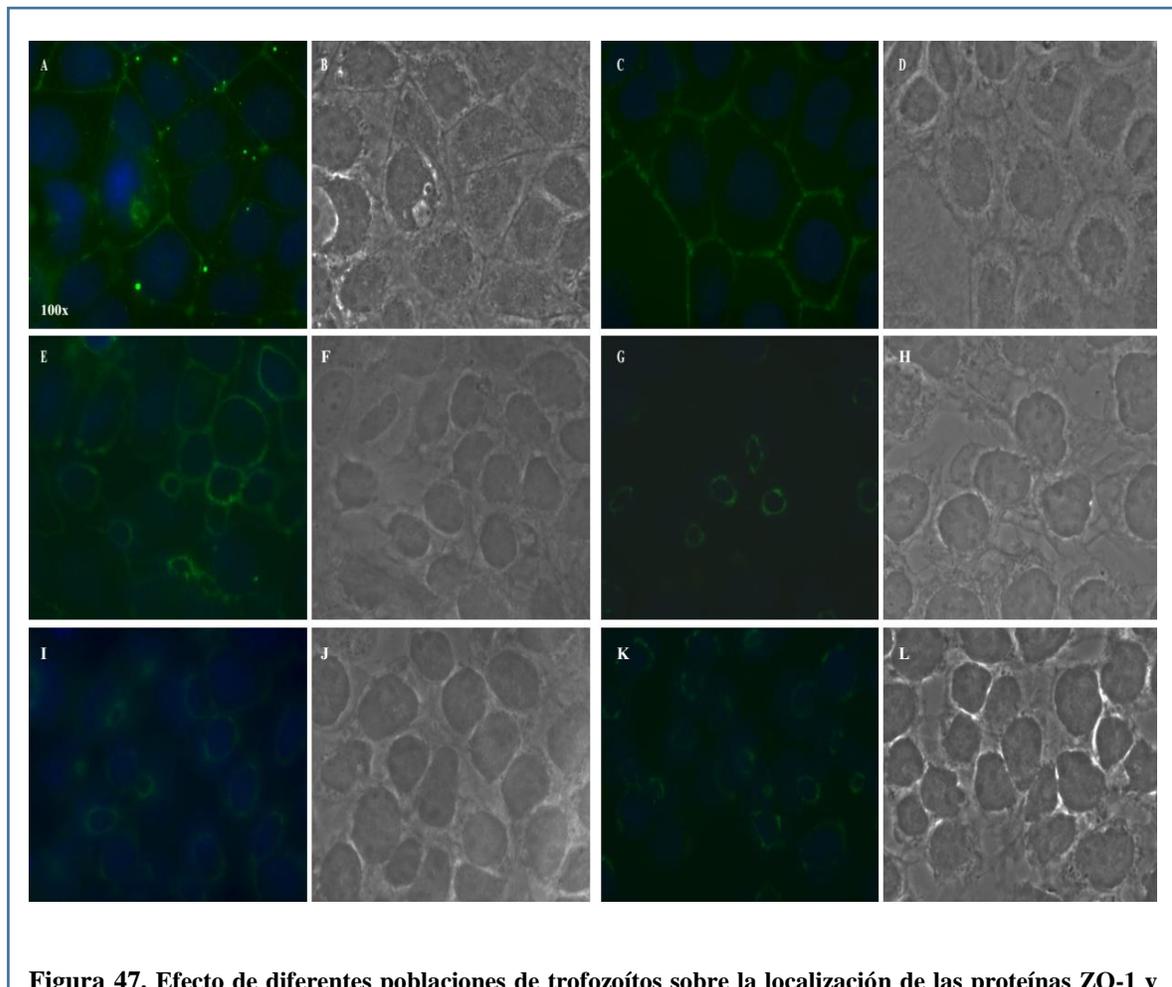
En el caso de la proteína ocludina, ésta se une a otra proteína ocludina presente en la membrana de la célula vecina formando así las uniones estrechas propiamente. Esta se localiza en la región apical también en un patrón de “panal de abeja”, como se aprecia en las monocapas de células Caco-2/TC7 sin tratamiento (**Figura 44**). Las microfotografías de microscopía confocal mostraron que este patrón se mantiene en aquellas monocapas incubadas por 24 horas con los trofozoítos WB y no así en las infectadas con la población que expresa constitutivamente a la proteína VSP9B10A. De igual manera que con ZO-1, esta proteína no forma el patrón normal y se redistribuye aberrantemente en los cortes basales (**Figura 44**). Cuando se utilizaron los trofozoítos en los cuales la expresión de esta proteína está silenciada en los co-cultivos con las monocapas estos cambios en la localización no se observaron manteniéndose la distribución normal de ocludina (**Figura 44**).

Por otro lado, en los ensayos de inmuno-detección por Western-blots se identificaron dos bandas una correspondiente al peso molecular de 65 kDa de ocludina y otra de mayor peso molecular (**Figura 45**). Es posible que esta banda corresponda a una forma hiper fosforilada de esta proteína que se distribuye en el citoplasma y no puede ensamblarse en el complejo de unión apical. Los cambios en la distribución de esta proteína y F-actina se muestran en cortes verticales donde la pérdida de la línea continua en la parte apical y su presencia en la región media y basal se aprecian en una sola micrografía (**Figura 46**). Así mismo se muestra una comparación de la localización de ZO-1 y ocludina en las monocapas de células Caco-2/TC7 incubadas con los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A y trofozoítos WB que expresaron mayoritariamente a la VSP al inicio de los ensayos de co-incubación (**Figura 47**); en esto se observó que los cambios en la distribución de ambas proteínas son similares en la monocapas incubadas con estas poblaciones. Lo anterior sugiere que la expresión de la proteína VSP9B10A afecta el complejo de unión apical desensamblando a las proteínas F-actina, ZO-1 y ocludina.



**Figura 44. Efectos en la distribución de ocludina en monocapas incubadas con trofozoítos VSP9B10A.pAC**  
Micrografías de microscopía confocal CLMS en secciones horizontales en las que se muestra la localización de ocludina en monocapa sin infectar A) plano basal, B) plano medio que muestra el patrón de panal de abeja típico de ocludina en las uniones estrechas. C) corresponden a monocapas incubadas con los trofozoítos WB. E y F) muestran la pérdida del patrón de distribución normal en aquellas monocapas incubadas con trofozoítos VSP9B10A.pAC. Es importante notar que la proteína aparece en el corte basal. Estos cambios no se observan en aquellas monocapas que se incubaron con trofozoítos que no expresan la proteína VSP9B10A en G y H.

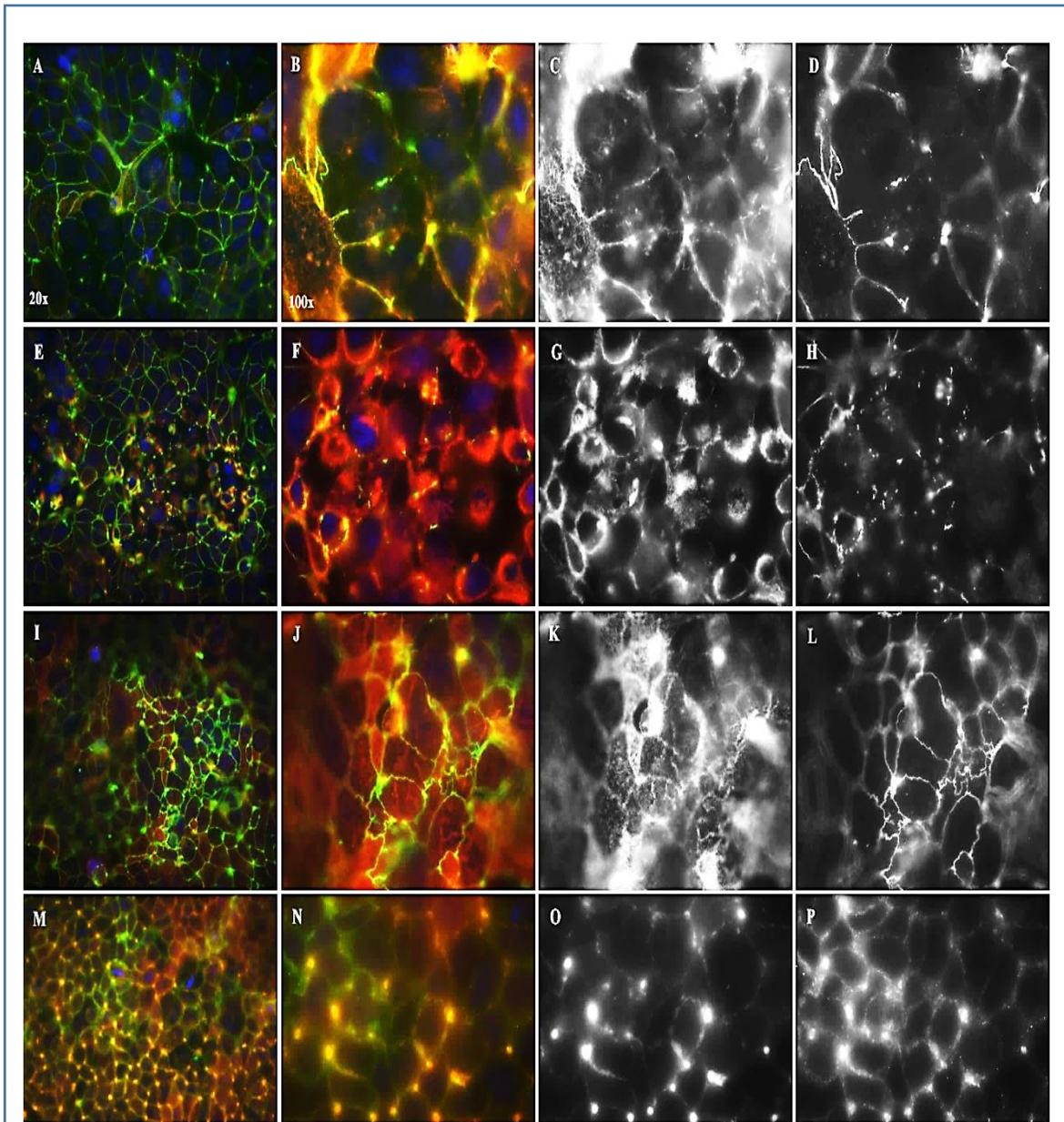




Para establecer si los efectos observados sobre F-actina y ocludina por los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A durante la interacción con células del epitelio intestinal es similar al producido por proteasas bien caracterizadas se utilizaron poblaciones de trofozoítos transfectados para expresar constitutivamente las proteínas Catepsina B y 14019 de *Giardia duodenalis*, así como el inhibidor E-64, específico para cisteín proteasas. Los trofozoítos que expresaban a la proteasa Catepsina B no afectaron la integridad de la monocapa de células Caco-2/TC7, ni el patrón de localización de F-actina y ocludina a los tiempos evaluados. (**Figura 48**). Cuando la población de trofozoítos

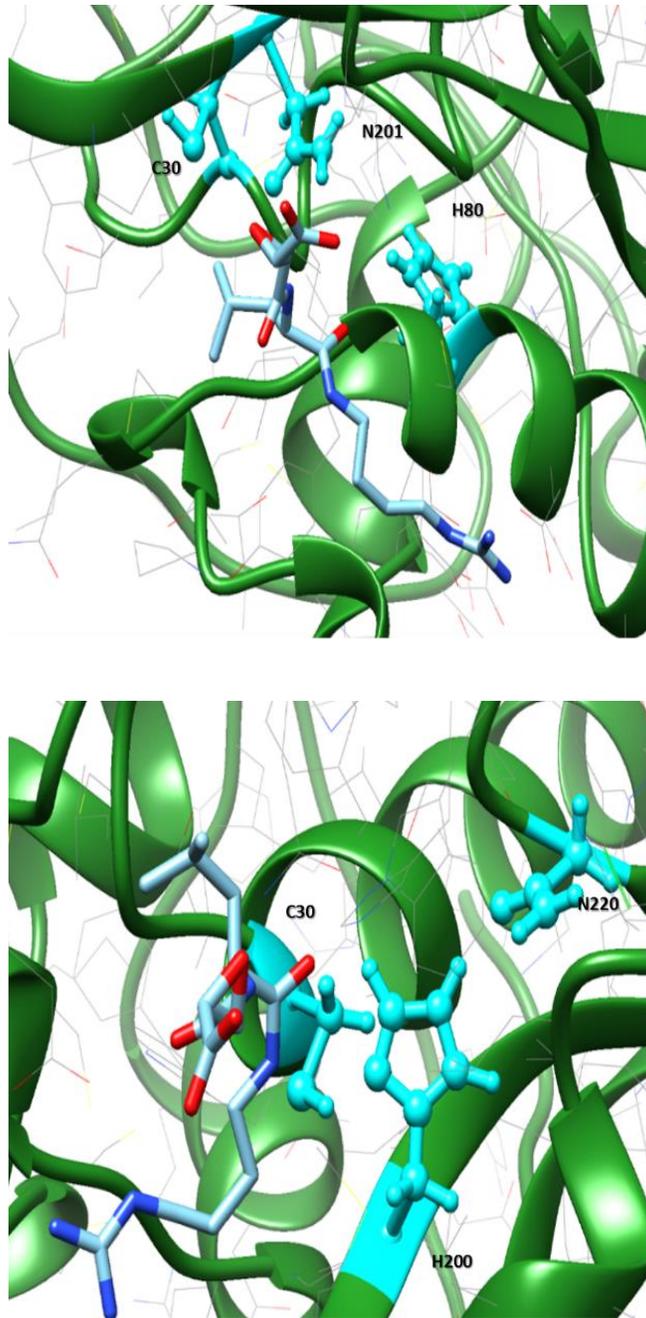
VSP9B10A se incubó con el inhibidor E-64 previamente a la co-incubación con las monocapas de células CaCo-2/TC7 no se observaron daños en éstas y el patrón normal de localización de ocludina no se alteró, aunque si se apreciaron cambios en F-actina, específicamente la aparición de focos de reactividad ausentes en las monocapas sin tratar o infectadas con las distintas poblaciones de trofozoítos usadas como control (**Figura 48**). Cuando se compararon *in silico* el sitio de unión del inhibidor E-64 en la Catepsina B de humanos con la secuencia de la proteína VSP9B10A se encontró que existe un sitio estructuralmente similar en la proteína VSP9B10A donde el inhibidor puede coordinarse (**Figura 49**). El inhibidor interactúa con los residuos C30, H80 y N201 en la Catepsina B mientras que en la VSP estos corresponden a los residuos C30, H200 Y N220. En estos modelos también puede apreciarse que los átomos de oxígeno del inhibidor tienden a polarizarse cerca del residuo C30 lo que sugiere que la coordinación de E-64 en la VSP9B10A es similar a la que ocurre con Catepsina B (**Figura 49**).

También se determinó el efecto de los trofozoítos que expresan a la proteína VSP9B10A sobre claudina-1; los resultados obtenidos no mostraron cambios en su localización, aunque por inmuno-detección se encontró una banda de menor peso molecular en todas las condiciones de co-incubación, lo que sugiere que no es un efecto atribuible a la proteína VSP9B10A (**Figura 50 y 51**).



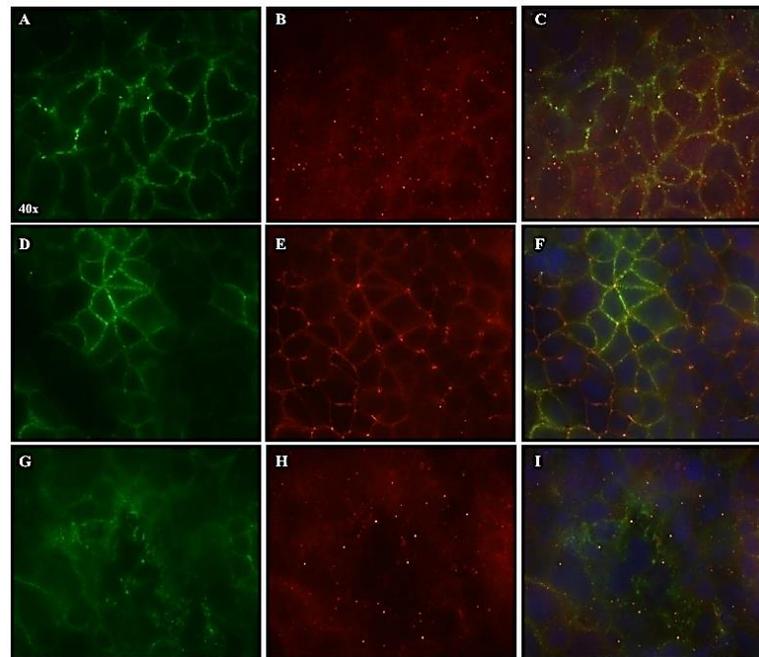
**Figura 48. Comparación del efecto de trofozoítos VSP9B10A.pAC y trofozoítos expresando otras proteasas sobre la distribución de F-actina y ocludina en monocapas de células Caco-2/TC7.**

Los trofozoítos WB no inducen cambios en la localización de F-actina y ocludina las cuales co-localizan en las uniones estrechas (A, B, C y D); mientras que se observó una redistribución de éstas cuando las monocapas de células Caco-2 se incubaron con trofozoítos transfectados con el plásmido VSP9B10A.pAC (E, F, G y H), específicamente sobre la proteína ocludina que se deslocaliza de los contactos célula-célula (H); estos cambios no se observaron cuando las monocapas se incubaron con los trofozoítos que expresan a la proteasa Catepsina B-like (I, J, K y L) ni por trofozoítos VSP9B10A.pAC que previamente fueron tratados con el inhibidor de cisteín proteasas E-64 como se aprecia en las micrografías M, N O y P.



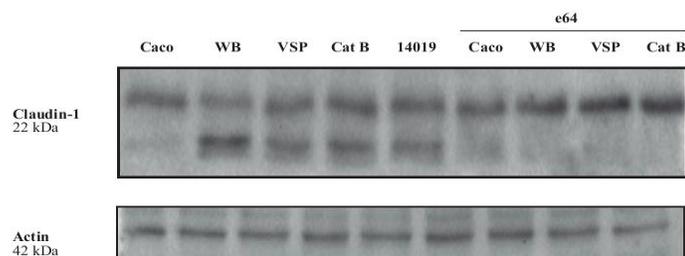
**Figura 49. Identificación del sitio de unión del inhibidor de cisteín proteasas E-64 en la proteína VSP9B10A.**

Los sitios predichos para el acoplamiento del inhibidor E-64 en la proteína VSP9B10A se identificaron utilizando el servidor SwissDock, en color cian se muestran los residuos (A). La similitud con el sitio de unión en la cisteín proteasa de Catepsina B humana se muestra en B.



**Figura 50. Efectos en la distribución de claudina-1 en las monocapas incubadas con trofozoítos VSP9B10A.pAC**

Micrografías que muestran la distribución de Claudina-1 y su co-localización con F-actina en las uniones estrechas en monocapas de células Caco-2/TC7 (A, B y C). El patrón de panal de abeja no se ve alterado cuando las monocapas se incubaron con trofozoítos WB, D, E y F; mientras que en aquellas incubadas con los trofozoítos VSP9B10A.pAC se observó la deslocalización de ambas proteínas de los contactos célula-célula G, H e I.



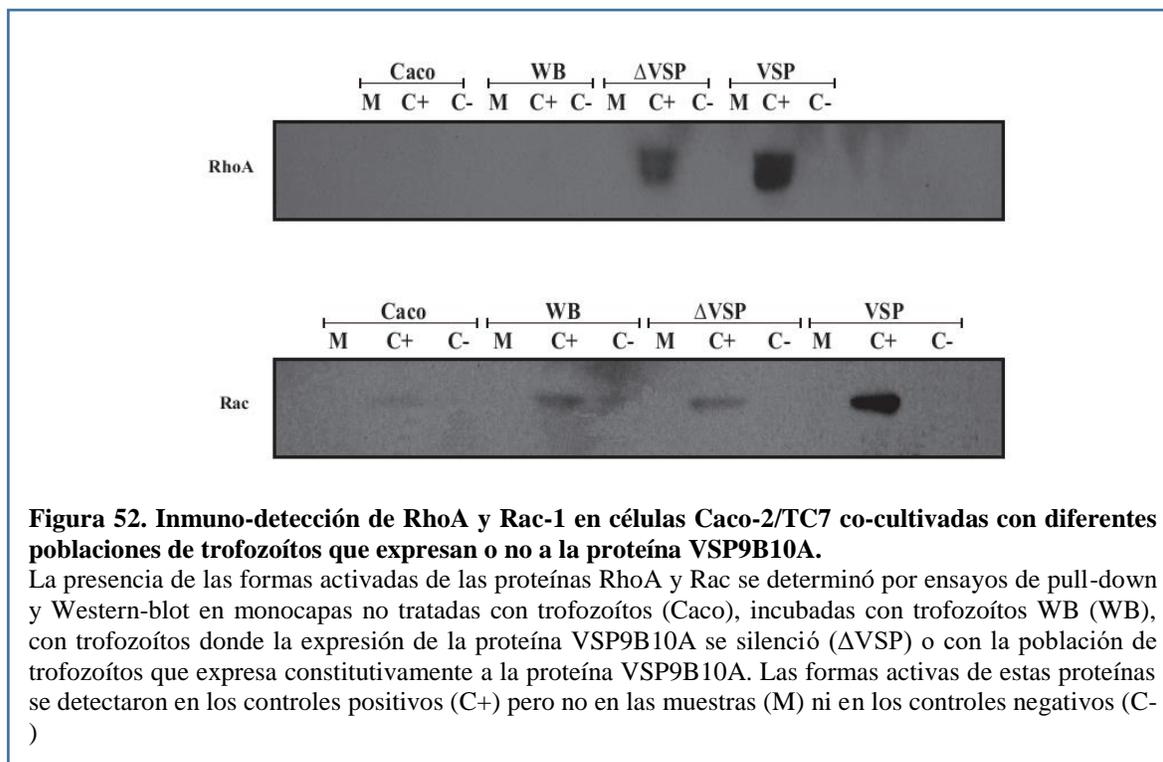
**Figura 51. Inmuno-detección de claudina-1 en monocapas de células Caco-2/TC7**

Se detectaron cambios en la proteína claudina 1 durante la incubación con distintas poblaciones de trofozoítos. En los extractos de la monocapa de células Caco2 /TC7 sin infectar se detectó una banda con anticuerpo monoclonal, mientras que se observó una banda de menor peso molecular al de claudina-1 en todos los extractos de las monocapas incubadas con las distintas poblaciones de trofozoítos. Cuando los trofozoítos se incubaron previamente al ensayo de interacción con el inhibidor E-64 no se detectó la banda de menor peso molecular en los extractos.

## **Determinación del efecto de los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A sobre la dinámica de polimerización de actina**

En este trabajo se propuso definir si la proteína VSP9B10A actúa mediante la activación de alguna vía de señalización o receptor que desencadene los cambios en la distribución de actina, el desensamblaje de las uniones estrechas y finalmente la pérdida de la integridad de la barrera epitelial. Las proteínas de las uniones estrechas se encuentran altamente reguladas por una serie de mecanismos y uno de los principales incluye a la familia de las GTPasas Rho. Estas remodelan al citoesqueleto de actina y desensamblan a las uniones intercelulares. Específicamente Rho altera la dinámica de actina, en particular la contractilidad del anillo cortical de actina redistribuye a ZO-1 así como a Ocludina alterando además el estado de fosforilación de esta última proteína. Estos efectos producto de la activación de las Rho GTPasas son similares a los observados en las monocapas de células Caco-2/TC7 expuestas a la proteína VSP9B10A de *Giardia*, por lo que fue importante determinar si las GTPasas Rho y Rac se encuentran activas en las monocapas infectadas con los trofozoítos VS9B10A.pAC. Esto se evaluó por medio de ensayos de pull down con perlas de agarosa unidas a Rhotekina RBD al que se une específicamente RhoA o PAK PBD matriz para Rac1 y Cdc42. Las formas activas de estas proteínas se purificaron a partir de los lisados de monocapas provenientes de cada condición de co-incubación y se inmuno-detectaron por Western-blot con los anticuerpos correspondientes.

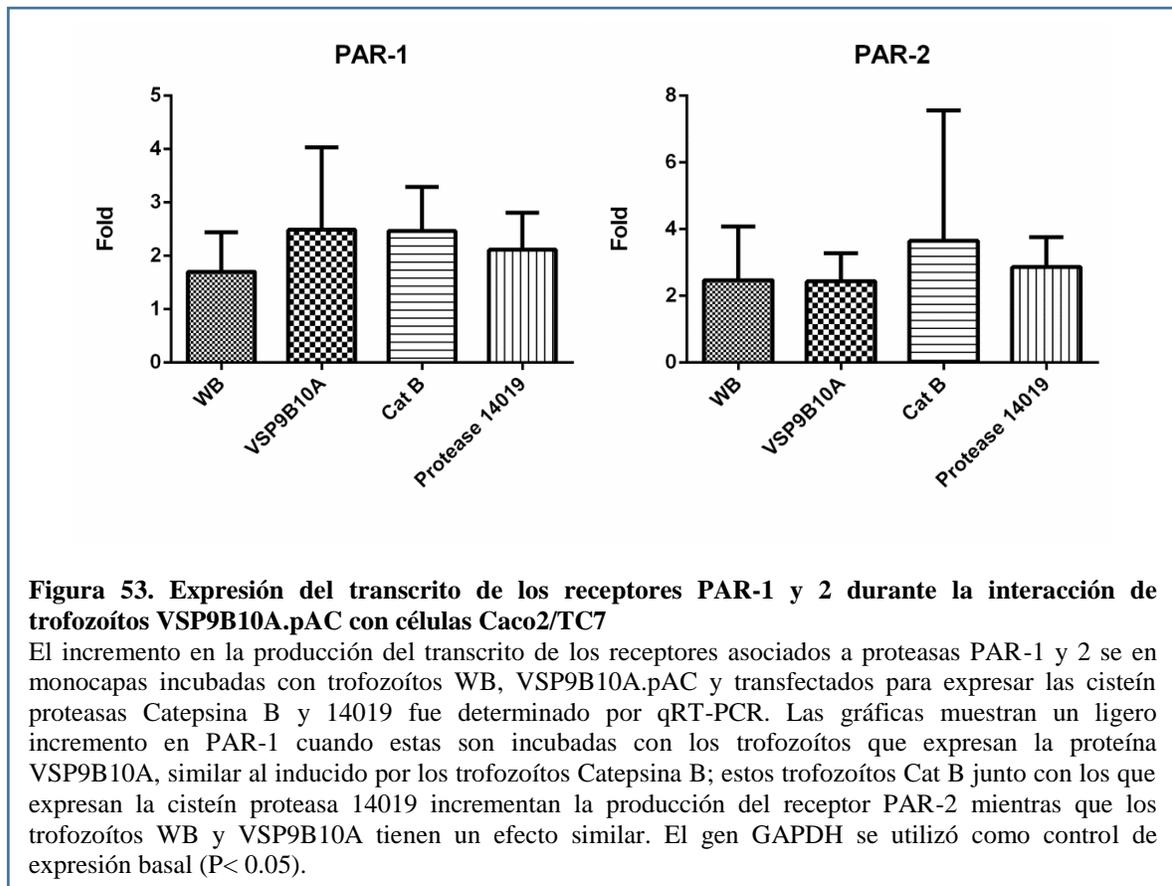
Ninguna de estas proteínas en su forma activa se detectó en las condiciones comparadas sugiriendo que no es la vía de señalización mediante la cual la que *Giardia* y específicamente la proteína VSP9B10A modifica el citoesqueleto de actina en las células epiteliales (**Figura 52**).



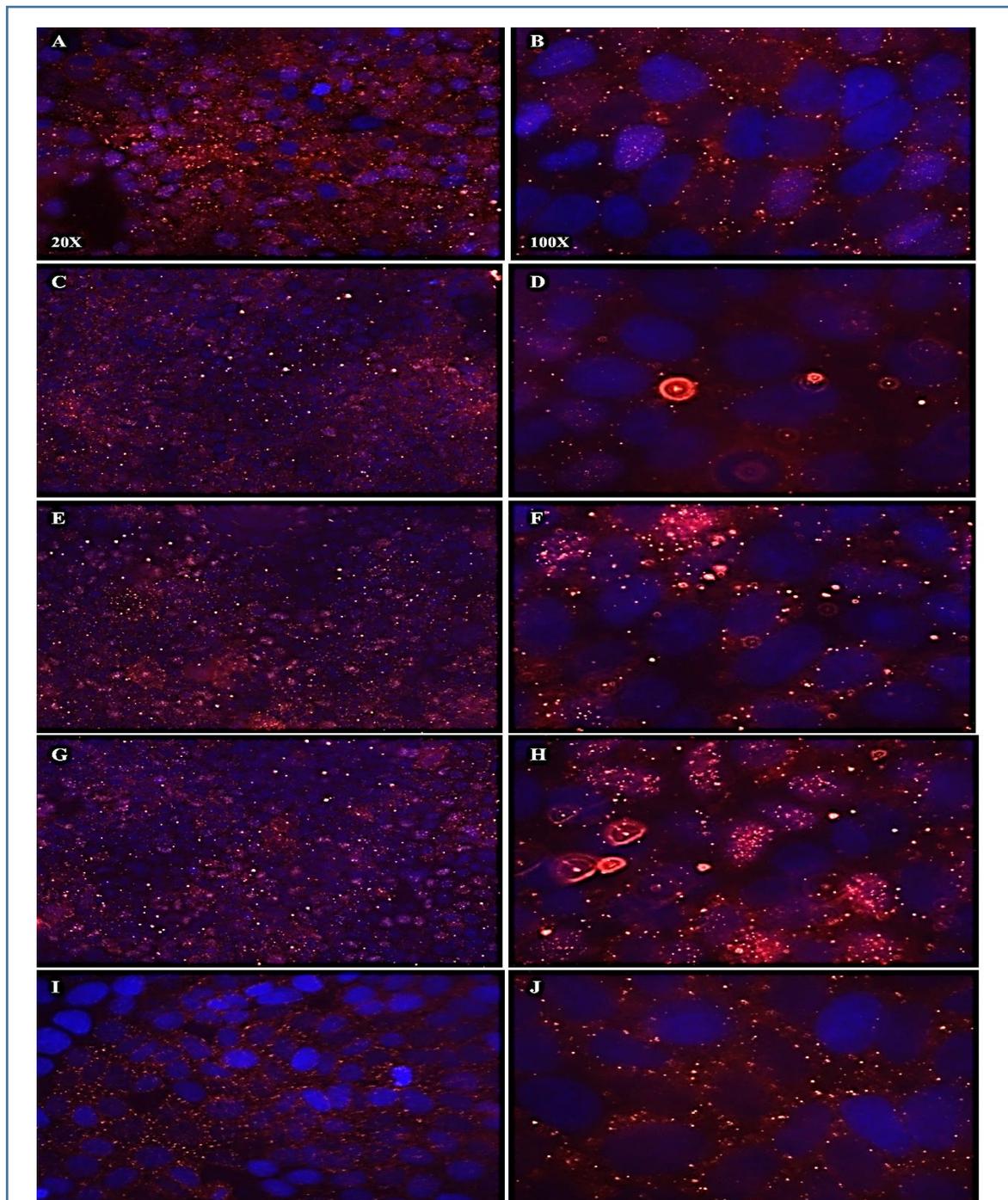
### Determinación del efecto de los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A sobre los receptores activados por proteasas PAR1-4

Varios reportes han mostrado que las proteasas liberadas por bacterias y parásitos pueden activar a los receptores PAR y que *Giardia* puede estar actuando a través de esta vía para generar apoptosis en los enterocitos (Buresi et al., 2002; Buresi et al., 2001; O'Hara and Buret, 2008). Por lo que considerando la actividad proteolítica putativa presentada por la proteína VSP9B10A se evaluó si estos se encuentran activos en las monocapas infectadas con los trofozoítos que expresan esta proteína. Estos experimentos mostraron que solamente los receptores PAR1 y 2 se incrementan en las monocapas incubadas con las distintas poblaciones de trofozoítos.

Los transcritos de PAR-1 se incrementan cerca de dos unidades en comparación con los trofozoítos WB, en aquellas incubadas con los trofozoítos VSP9B10A.pAC de similar manera a los trofozoítos que expresan la Catepsina B. El incremento de los transcritos de PAR-2 también se incrementa en las monocapas tratadas con los trofozoítos VSP9B10A.pAC, pero en menor proporción. El mayor incremento en este caso es inducido por los trofozoítos que expresan a la Catepsina B-like (**Figura 53**).

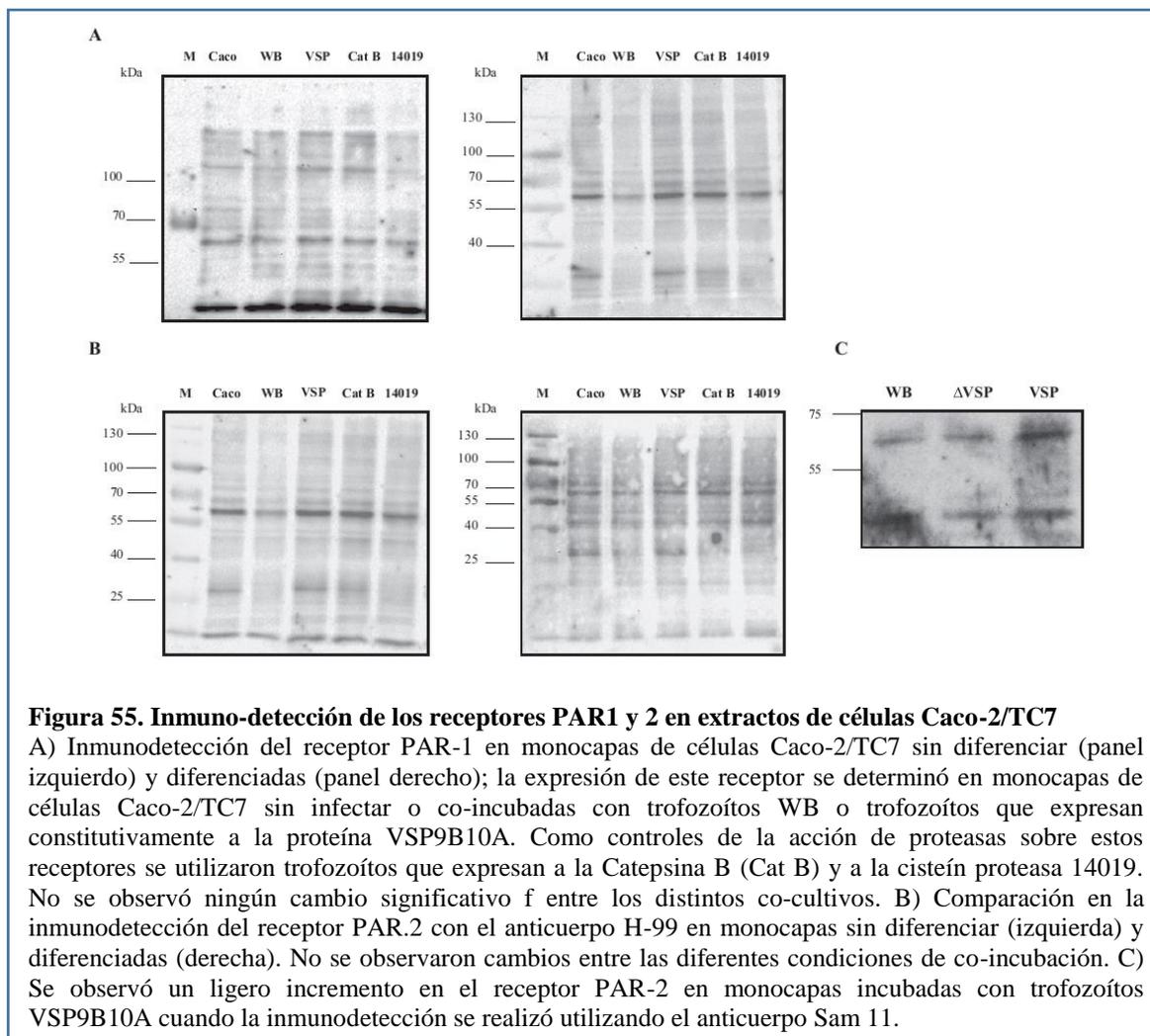


Mediante ensayos de inmunofluorescencia se analizó si el incremento en los transcritos correlaciona con cambios en la presencia de estos receptores en las células del epitelio intestinal. Como control positivo se utilizó a la proteasa tripsina que los activa por proteólisis. Los resultados solo mostraron cambios en el receptor PAR2, en las microfotografías se observaron puntos reactivos que se localizan en la membrana celular de las monocapas que se incubaron con los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A, de manera similar a los controles positivos (**Figura 54**). Estos resultados sugieren que estos trofozoítos podrían estar activando la movilización del receptor a la membrana celular e interactuar con éste de manera similar a otras proteasas. Además, mediante ensayos de inmunodetección se determinó el estado de este receptor en los extractos totales obtenidos de las monocapas. Los resultados mostraron que no se presentaron cambios entre cada condición, incluidas las proteasas utilizadas como referentes positivos. (**Figura 55**).



**Figura 54. Localización del receptor PAR 2 en monocapas de células Caco2 /TC7 durante la interacción con trofozoítos VSP9B10A.pAC**

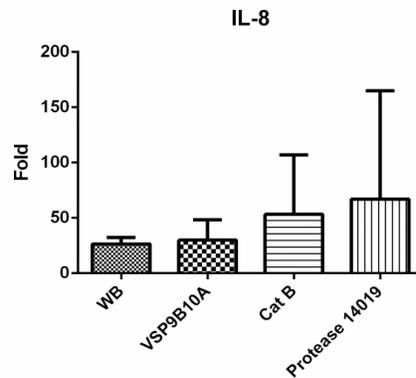
Las micrografías A y B muestran la localización de los receptores PAR-2 en células Caco2/TC7 sin tratamiento; C y D es la localización después de 24 horas de incubación con trofozoítos WB. La distribución en la membrana y en algunas células en el citoplasma es mayor en aquellas monocapas incubadas con los trofozoítos que expresan la proteína VSP9B10A como se observa en E y F; esta distribución es similar a la observada cuando la monocapa se incubó por 180 minutos con la proteína Catepsina B purificada G y H o con tripsina, el activador típico, por 15 minutos I y J. En estos ensayos se utilizó el anticuerpo H-99.



Finalmente para establecer si el receptor PAR-2 se encuentra activo se analizó la expresión de la Interleucina 8 debido a que la producción de esta interleucina es estimulada por la activación de PAR-2 (Kajikawa et al., 2007; Shan et al., 2012). Así mismo resulta interesante establecer si existen cambios en la producción de IL-8 durante la infección con los trofozoítos que expresan constitutivamente VSP9B10A ya que se ha reportado que durante la infección con *Giardia* los niveles de esta interleucina se encuentran disminuidos y que es por este mecanismo que no se produce una respuesta inmune exacerbada (Cotton et al., 2014).

La producción del transcrito de IL-8 se determinó en las monocapas de células CaCo-2 TC7 incubadas con trofozoítos WB y trofozoítos VSP9B10A (**Figura 56**). Los resultados mostraron que existe un ligero incremento en el transcrito de IL-8 en las monocapas incubadas con los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A en

comparación a las incubadas con los trofozoítos WB. Sin embargo, hay un incremento más significativo en las incubadas con los trofozoítos que expresan a la Catepsina B y la cisteín proteasa 14019. Esto corresponde con los niveles del transcrito del receptor PAR2 y sugiere que la activación de la vía PAR-2/IL-8 ocurre durante la co-incubación de los trofozoítos de *Giardia* con las células epiteliales pero que esta activación no es dependiente de la expresión de la proteína VSP9B10A. Lo anterior muestra que esta vía no es la responsable de los daños generados a las monocapas de células epiteliales por los trofozoítos VSP9B10A por lo que otros estudios deben realizarse para establecer el mecanismo por el cual los trofozoítos que expresan a la proteína VSP9B10A desestabilizan el complejo de unión apical, específicamente a las proteínas F-actina, ZO-1 y ocludina.



**Figura 56. Expresión del transcrito de IL-8 en monocapas de células Caco-2/TC7 co-incubadas con distintas poblaciones de trofozoítos**

Se determino la producción del transcrito de IL-8, uno de los efectores de la cascada de activación de PAR-2 en las monocapas incubadas con los trofozoítos WB, VSP9B10A, Catepsina B y la cisteín proteasas 14019. Estas dos últimas poblaciones de trofozoítos incrementan el número de transcritos de IL8 mientras que los trofozoítos WB y VSP9B10A.pAC muestran el mismo comportamiento ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

La Giardiasis es una de las infecciones parasitarias con mayor incidencia en el mundo y con alto impacto en la salud pública y la economía, (Bartelt and Sartor, 2015; Buret, 2008; Ekdahl and Andersson, 2005; Lanfredi-Rangel et al., 1999; Yoder et al., 2012). Sin embargo, es una de las parasitosis menos comprendidas. De hecho su estudio es complicado ya que ésta presenta un gran rango de manifestaciones clínicas (Beatty et al., 2017; Halliez and Buret, 2013; Halliez et al., 2016; Lanfredi-Rangel et al., 1999; Wensaas et al., 2012), un posible potencial zoonótico, el que aún se debate (Emery et al., 2014; Koh et al., 2013; Lalle et al., 2005; Lebbad et al., 2011b; Lee et al., 2017b; Palmer et al., 2008; Pallant et al., 2015; Piekarska et al., 2016; Ryan and Caccio, 2013) y una falta de consenso entre los efectos patofisiológicos producidos por las mismas cepas/ensamblajes (Cevallos et al., 1995; Chin et al., 2002; Foronda et al., 2008; Homan and Mank, 2001; Koh et al., 2013; Lebbad et al., 2008; Maia-Brigagao et al., 2012; Minvielle et al., 2008; Mohammed Mahdy et al., 2009; Nash et al., 1987; Sahagun et al., 2008; Torres-Romero et al., 2014). En este contexto las proteínas de la familia de las proteínas Variables de Superficie han mostrado ser un punto de controversia, ya que en estudios recientes se reportó que éstas pueden estar implicadas en la virulencia y la patogénesis de la Giardiasis. En estos estudios se observó que la diferencia entre los efectos de distintas cepas sobre sus células blanco puede estar relacionada con la expresión de un conjunto de proteínas VSP (Emery et al., 2016; Emery et al., 2015; Emery et al., 2014). Al respecto, nuestro equipo de trabajo recientemente mostró que la proteína VSP9B10A se libera al medio durante la interacción con células epiteliales *in vitro* y que es identificada en ensayos específicos para caracterizar proteasas de alto peso molecular (Cabrera-Licona, 2010; Cabrera-Licona et al., 2017). Así mismo otros estudios mostraron que las proteínas VSPs tienen diferencias estructurales y motifs que pueden conferirles actividades distintas a la evasión de la respuesta inmune (Adam et al., 2010; Emery et al., 2016; Emery et al., 2015; Emery et al., 2014) y en estos estudios se señala que las diferencias entre cepas/ensamblajes pueden estar relacionadas con la severidad de los síntomas que se presentan durante la infección (Cevallos et al., 1995; Emery et al., 2014; Koh et al., 2013; Nash et al., 1987; Williamson et al., 2000) así como por sus posibles implicaciones en la nutrición, defensa del parásito y en el diseño de vacunas contra estas proteínas (Adam et al., 2010; Bermudez-Cruz et al., 2004; Emery et al., 2016; Emery et al., 2014; Lujan et al., 1995; Nash and Mowatt,

1993; Papanastasiou et al., 1997a). En este contexto el análisis y caracterización de estas proteínas es una nueva línea de investigación en el estudio de *Giardia*.

En estudios previos de nuestro grupo de trabajo se demostró que en un modelo tridimensional del extremo amino terminal de la proteína VSP9B10A se encuentran residuos que forman el sitio de unión al sustrato y la tríada catalítica característica de las cisteín proteasas (Cabrera-Licona, 2010). Con base en estas características, en este trabajo se llevó a cabo el análisis comparativo del efecto de poblaciones de trofozoítos que expresan o no a la proteína VSP9B10A sobre monocapas como modelos celulares de tres líneas que incluyeron a IEC-6, MDCK y Caco-2/TC7. En estos estudios se utilizó una población de trofozoítos en la cual la expresión constitutiva de la proteína VSP9B10A se obtuvo mediante transfección, con plásmidos que tenían clonado el gen de dicha proteína, así como trofozoítos sin transfectar de la cepa WB, trofozoítos transfectados con el vector vacío y una población en la que la expresión de esta proteína se silenció mediante transfección [VSP(INV).pAC]. Se eligió como modelo de estudio la población de trofozoítos transfectados VSP9B10A.pAC debido a que permite analizar de una manera directa el comportamiento de esta proteína durante el proceso de interacción de los trofozoítos con las células epiteliales. Es decir, con el uso de este modelo podemos establecer que ocurre cuando una población de trofozoítos con expresión homogénea de la VSP9B10A interacciona con las células epiteliales.

En los ensayos de interacción *in vitro* se observó que las poblaciones de trofozoítos que expresan mayoritariamente a la proteína VSP9B10A en su superficie al inicio de la co-incubación afectan la integridad de monocapas IEC-6 después de dos horas de co-incubación, con un inoculo inferior al utilizado en los ensayos estándar previamente reportados (Rodríguez-Fuentes et al., 2006). Durante ese tiempo corto de co-incubación, que refleja el contacto inicial de los parásitos con su célula blanco, se observó que los contactos célula-célula se perdieron en las monocapas y las células cambiaron su morfología de normal romboide hacia una de tipo fibroblastoide. En comparación, se observó que en estas mismas condiciones de interacción los trofozoítos WB y los transfectados con el vector vacío no afectaron la integridad de la monocapa; esta última condición sugiere que la transfección no altera a los trofozoítos. Es importante señalar que no existen reportes que muestren estos cambios inducidos por trofozoítos de *Giardia* en tiempos tan cortos en esta línea celular.

Algunos estudios reportan el desprendimiento de las células de la monocapa en función del incremento en el número de trofozoítos con el que son incubadas (McCabe et al., 1991).

Las células IEC-6 son una línea de epitelio de intestino delgado de rata, que se origina de las criptas intestinales. Estas representan células sin madurar con alto potencial proliferativo y que mimetizan el recambio del intestino delgado que ocurre cada 2 a 3 días. Las monocapas de estas células se caracterizan por ser una población homogénea de células poligonales, estrechamente opuestas, con pseudópodos extendidos hacia los bordes celulares de las células vecinas, estableciendo contactos intercelulares. Las células tienen núcleos grandes y ovalados; microvellosidades delgadas localizadas en la región perinuclear, con uniones estrechas “débiles” reflejada en una resistencia transepitelial de  $54.2 \hat{\pm} 5.7 \text{ ohm}\cdot\text{cm}^2$  (Quaroni et al., 1979). En consideración a las uniones débiles entre las células de esta monocapa y para descartar que los cambios morfológicos y la pérdida de la integridad se debe a las características propias de la línea epitelial, se utilizó un modelo con uniones celulares más fuerte: las células MDCK. Estas células provienen de riñón de perro que forman monocapas de células poligonales y un epitelio cerrado con un valor de TEER de  $< 300 \Omega\cdot\text{cm}$  (Dukes et al.; Peixoto and Collares-Buzato, 2005). En los ensayos de co-incubación con las células MDCK se observaron los mismos efectos que en las monocapas IEC-6 incubadas con los trofozoítos que expresan a la proteína VSPB10A. Sin embargo, en estos ensayos se requirió utilizar una la dosis de trofozoítos mayor y un tiempo de incubación más largo para observar cambios similares a los encontrados en la monocapa de células IEC-6. Lo anterior es consistente con la estabilidad de las uniones que mantienen la integridad de este tipo de epitelio y que puede reflejar de una mejor manera lo que ocurre en el intestino humano durante la infección con *Giardia* (Lanfredi-Rangel et al., 1999). Cabe señalar que en el estudio de *Giardia* el modelo de células IEC-6 es ampliamente utilizado mientras que pocos trabajos reportan el uso de las células MDCK en ensayos de este tipo (Ma'ayeh and Brook-Carter, 2012; McCabe et al., 1991). Además en los trabajos con células MDCK se reportan tiempos de incubación de 24 a 48 horas (Chavez et al., 1995; Chavez et al., 1986), por lo que nuestros resultados muestran que los trofozoítos VSP9B10A pueden generar daños en tiempos más cortos (12hrs) que las reportadas por otros autores.

La presencia y liberación de la VSP9B10A se verificó durante estas interacciones, encontrándose que solo se detecta en aquellos sobrenadantes provenientes de la interacción

con trofozoítos transfectados VSP9B10A.PAC. Esta evidencia experimental permite sugerir que existe una relación directa entre la presencia/liberación de la VSP9B10A y que la pérdida de la continuidad de las monocapas se debe, al menos en parte, a la proteína VSP9B10A. Cabe aclarar que este trabajo se enfocó fundamentalmente al estudio de la expresión homogénea de la VSP9B10A en la superficie de los trofozoítos en el tiempo en que se llevaron a cabo los ensayos de interacción y no se caracterizó si otras proteasas o factores del parásito se ven afectados por esta expresión, por lo que los resultados obtenidos pueden estar participando otras proteínas propias del parásito. Es importante señalar, sin embargo, que cuando se analizaron las proteínas totales no se observaron cambios en el perfil de expresión de otras proteínas entre los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A y las otras poblaciones de trofozoítos utilizadas en los ensayos, además de la detección de la expresión de la proteína VSP9B10A recombinante. Mientras que en el perfil proteolítico de los sobrenadantes de cada interacción la presencia de la banda de 75 kDa de peso molecular, que es detectada por el anticuerpo mono específico anti-VSP9B10A. Esta banda solo se detectó en los sobrenadantes que provienen de la interacción con trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A y es detectable desde tiempos cortos de co-incubación, como mostró la cinética de liberación; en tanto que no se observaron incrementos en las demás proteasas visualizadas, ni se detectó esta banda en los sobrenadantes provenientes de la interacción con otras poblaciones de trofozoítos que no expresan a la proteína VSP.

Sin embargo, es importante realizar una caracterización más exhaustiva de la población de trofozoítos VSP9B10A.pAC para analizar si otras proteínas pueden también ocasionar los daños observados. En este contexto es importante señalar que el contacto de los trofozoítos con las células epiteliales induce la expresión y liberación de la proteína VSP9B10A aunado al hecho de que los daños no se presentan cuando los trofozoítos se incuban con el anticuerpo anti-9B10A previo a la interacción con las células epiteliales, lo cual sugiere que esta proteína está involucrada, en parte, con los daños observados. Al respecto se ha establecido que los transcritos de algunas VSPs se incrementan durante la interacción y también son liberadas al medio por un mecanismo no totalmente caracterizado (Ferella et al., 2014b; Ma'ayeh and Brook-Carter, 2012; Papanastasiou et al., 1996; Ringqvist et al., 2011). Algunos autores postulan que esto se debe a que la interacción con las células epiteliales induce el recambio

de VSPs o a que simplemente existen diferencias en la expresión de estas proteínas en las poblaciones utilizadas para infectar (Ferella et al., 2014b; Prucca and Lujan, 2009; Prucca et al., 2008). Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede establecer que las diferencias en la expresión de las proteínas VSPs en las poblaciones de trofozoítos que se emplean en los ensayos de interacción deben considerarse cuando se realizan estudios para determinar la virulencia de *Giardia* y que debe estudiarse con mayor cuidado la dinámica de recambio de estas proteínas durante el contacto inicial con los enterocitos.

En consideración a lo anterior se procedió a obtener una población de trofozoítos donde la expresión de la proteína VSP9B10A se silenció, para establecer si los daños observados pueden ser relacionados directamente con la expresión de esta proteína en los trofozoítos utilizados en los ensayos de co-incubación utilizando como modelo celular a la línea Caco2/TC7 de epitelio intestinal humano. Esta línea celular es el modelo más utilizado en el estudio de la patogénesis de la Giardiasis por lo que se optó por validar los resultados obtenidos en las dos líneas previamente descritas en esta monocapa (Ferella et al., 2014a; Humen et al., 2011; Magne et al., 1991; Maia-Brigagao et al., 2012; Muller et al., 2006; Ringqvist et al., 2011; Roxstrom-Lindquist et al., 2005; Stadelmann et al., 2012b; Teoh et al., 2000).

Las células Caco2/TC7 tienen una organización polarizada y forman dominios de uniones estrechas altamente regulados formando una monocapa que mimetiza física y funcionalmente a la barrera del epitelio intestinal. Debido a esto último se utilizan ampliamente en la investigación de los mecanismos celulares y moleculares por los cuales actúan patógenos intestinales sobre proteínas asociadas a la membrana, vías de señalización, tráfico intracelular así como para caracterizar la producción de lesiones estructurales y la respuesta celular del hospedero (Chantret et al., 1994; Fisher et al., 2013; Lievin-Le Moal, 2013; Peterson and Mooseker, 1992; Sambuy et al., 2005; Solaymani-Mohammadi and Singer, 2013; Tremblay et al., 2006; van der Flier and Clevers, 2009). En nuestro caso este modelo permitió evaluar los efectos de los trofozoítos de *Giardia* en estas células blanco y tener los dos tipos celulares del intestino: las células proliferativas de la cripta intestinal y los enterocitos maduros de las vellosidades.

Los ensayos de incubación con este modelo mostraron que los efectos previamente observados en las monocapas IE-6 y MDCK fueron muy semejantes a los observados en las

células Caco-2/TC7 siendo evidentes la pérdida de la continuidad de la monocapa, el cambio en su morfología normal y la pérdida de los contactos célula-célula. Esta pérdida de la integridad de la barrera epitelial se midió analizando la permeabilidad a la macromolécula FD-4. La integridad de las uniones célula-célula puede ser medida como la disminución de la resistencia transepitelial (TER) y como el incremento en el flujo paracelular. Así, se considera que la disminución de la TER es un marcador de la Giardiasis aguda (Humen et al., 2011). En este trabajo, dos horas después de la incubación de la monocapa de células Caco2/TC7 diferenciada con los trofozoítos VSP9B10A.pAC el flujo de esta molécula al compartimento basal fue mayor al que se observó en una monocapa sin tratar o tratada con los trofozoítos WB. Este fue incluso mayor al generado por trofozoítos que expresan las proteasas Catepsina B-like o 14019 que fueron usadas como control del positivo de daño a la integridad de las uniones célula-célula. El efecto producido por los trofozoítos VSP9B10A.pAC sobre la integridad de la monocapa es solo comparable con el generado por la proteína Catepsina B-like de *Giardia* purificada que a una concentración de 8 µg/ ml disminuye la TEER de monocapas MDCK (Gomez-Mondragon, 2011) y en este caso incrementa el flujo para celular de FD-4. Una revisión reciente señala que los reportes sobre cambios en la TER en monocapas incubadas con distintas cepas de trofozoítos de *Giardia* son altamente variables y que esto puede deberse a la clona de células Caco-2, al número de pasajes, a la proporción trofozoítos/célula, el tiempo de incubación e incluso a factores como el tipo de medio usado, y los lavados con PBS frío que se realizan para despegar a los trofozoítos de la monocapa (Kraft et al., 2017).

Sin embargo, en este trabajo se utilizaron tiempos cortos de incubación y un inóculo de trofozoítos pequeño en comparación con los usados en otros estudios como se puede consultar en la revisión de Kraft y colaboradores de 2017, quienes incluso no observan cambios en la TER utilizando una proporción de 20 trofozoítos WB por célula. Esto sugiere que es importante caracterizar a la población de trofozoítos usados durante los ensayos y reportar características específicas de los trofozoítos para que los cambios observados sean mejor analizados. En este trabajo se puede asociar directamente una característica de expresión de los trofozoítos con los cambios citopáticos y los cambios en la TER, aunque como ya se mencionó se debe hacer una caracterización más detallada de los trofozoítos VSP9B10A.pAC para establecer si estos son solamente atribuibles a la VSP.

Por otra parte, en los sobrenadantes de interacción la presencia de la proteína VSP9B10A confirmó que ésta se encuentra solo en aquellos provenientes de la co-incubación con trofozoítos VSP9B10A.pAC como previamente se observó en las células IEC-6. De manera interesante en estos ensayos, aunque los daños se producen tanto en las monocapas completamente diferenciadas como en las monocapas proliferativas estos son más exacerbados en las últimas. Estas diferencias sugieren que existe una respuesta diferencial en las células del intestino cuando son co-incubadas con *Giardia*. Debido a que las células de la cripta llevan a cabo funciones muy específicas como la renovación del epitelio y la secreción activa de electrolitos por el canal de cloro dependiente de AMPc que regula la secreción de agua, es de gran importancia corroborar si este efecto ocurre *in vivo* y si la proteína VSP9B10A daña directamente y de manera selectiva a las células de las criptas intestinales (Caro et al., 1995). Al respecto algunos estudios de infección *in vivo* han señalado que *Giardia* altera la relación entre las células proliferativas y las diferenciadas alterando con esto la capacidad regenerativa del intestino, que ocurre de manera normal cada 4 a 5 días, y por tanto exacerbando los síntomas de la Giardiasis como la malabsorción además de ser un factor de riesgo para el desarrollo de una infección crónica (Einarsson et al., 2016; Elmendorf et al., 2005; Fisher et al., 2013; Lievin-Le Moal, 2013; Solaymani-Mohammadi and Singer, 2013; Stadelmann et al., 2012b). Por lo anterior sería importante determinar si este efecto ocurre *in vivo*. Por otra parte, en este modelo también se observó que la producción del transcrito de la proteína VSP9B10A es dependiente del contacto con la célula epitelial, en tiempos cortos y que el número de células reactivas al anticuerpo anti-9B10A incrementa en función del tiempo de incubación. Así mismo, en la población que la expresa constitutivamente la distribución de la proteína en la superficie cambia a puntos dispersos, sugiriendo la liberación de la proteína VSP9B10A durante el contacto, lo que corresponde con su presencia en los sobrenadantes de interacción y en los zimogramas realizados con estos. Estos datos sugieren que la proteína VSP9B10A puede ser un factor de virulencia y participar en la patogenicidad de la giardiasis. Sin embargo, tendría que compararse con otras proteínas VSPs o antígenos de *Giardia* para determinar si tiene un mayor potencial infectivo.

Con respecto a la patogénesis de la giardiasis se ha demostrado que los trofozoítos de *Giardia* acortan las microvellosidades de los enterocitos disminuyendo la superficie de absorción de agua, glucosa y electrolitos y la actividad de enzimas propias del intestino (Buret, 2008;

Cotton et al., 2011; Humen et al., 2011). Así mismo estos disminuyen la expresión de genes relacionados con la proliferación e incrementa los involucrados en respuestas al estrés, alteran la permeabilidad de la barrera epitelial modificando el estado de proteínas de las uniones estrechas como F-actina y actinina de manera calcio-dependiente, ZO-1, Ocludina, Claudina-1 y cingulina; las adherentes y los desmosomas (Buret, 2007; Buret et al., 2002; Dawson and House, 2010; Humen et al., 2011; Maia-Brigagao et al., 2012; Teoh et al., 2000). También incrementa la apoptosis induciendo factores como Bax y las Caspasas-3, 8 y 9 e inhibiendo Bcl-2 y PARP (Chin et al., 2002; Roxstrom-Lindquist et al., 2005; Scott et al., 2002). La pérdida de la barrera epitelial permite la salida de agua y la secreción de cloro al lumen intestinal produciendo diarrea. En suma, varios mecanismos convergen para dar lugar a los síntomas de la Giardiasis, pero poco se sabe aún de los factores propios del parásito que pueden estar activando las vías de señalización relacionadas.

Con base en lo anterior en este trabajo buscamos determinar los mecanismos moleculares que llevan a la pérdida de los contactos célula-célula inducidos por los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A. El análisis se enfocó principalmente sobre las proteínas encargadas de mantener estas uniones y sobre algunas vías de señalización que podrían ser activadas por la proteasa en consideración a la actividad proteasa-like de la VSP9B10A y a los efectos observados sobre las monocapas de células epiteliales.

Un primer acercamiento se llevó a cabo empleado las células MDCK, en las que se analizó el estado de las uniones estrechas y adherentes después de la interacción con los trofozoítos VSP9B10A.pAC. Los resultados obtenidos con este modelo evidenciaron que las proteínas Ocludina de las uniones estrechas y E-cadherina de las uniones adherentes están disminuidas en los extractos de monocapas incubadas con los trofozoítos VSP9B10A.pAC.

Un estudio más detallado sobre si este antígeno altera a las proteínas que forman el complejo de unión apical se llevó a cabo empleando las monocapas de células Caco-2/TC7. Los resultados mostraron que esta población de trofozoítos induce cambios en la distribución de F-actina que pueden ser asociados a la presencia y liberación de la proteína VSP9B10A durante la interacción. Esto debido a que en aquellas monocapas incubadas con la población en que su expresión fue silenciada no mostraron este tipo de cambios, además otros estudios muestran que el redondeamiento de células eucariontes, como el observado por microscopía en nuestros resultados, es consecuencia de la degradación de los filamentos de actina y

niveles incrementados de actina soluble (Solaymani-Mohammadi and Singer, 2013). Aunque como se mencionó anteriormente, ya existían reportes previos de que el trofozoíto de *Giardia* afecta el patrón normal de localización de F-actina apical y basolateral y que el desensamble de la actina apical en células Caco-2 diferenciadas es dependiente de la adhesión de los trofozoítos y no de las moléculas secretadas (Humen et al., 2011; Maia-Brigagao et al., 2012), los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los trofozoítos que expresan a la VSP9B10A, afectan tanto los contactos focales como la distribución de F-actina en las uniones estrechas y no solo la actina apical que forma las microvellosidades. Esto último permite sugerir una asociación de la proteína VSP9B10A con la desestabilización del citoesqueleto de actina y postular que la adhesión es el primer paso en la desestabilización de esta estructura. Sin embargo, la liberación de la proteína VSP9B10A aún cuando puede exacerbar en parte este efecto, no se puede establecer si es a través de una acción directa sobre actina o si ésta actúa sobre otras proteínas que inducen la alteración del cinturón de actina e incluso si son otras proteínas del trofozoíto las que participan a la desorganización de esta estructura.

Cuando se analizó el estado del resto de las proteínas que mantienen la estructura de unión apical se encontró que en el caso específico de la proteína ZO-1, ésta se relocalizó del complejo hacia una forma soluble. En los ensayos de inmunofluorescencia ZO-1 se encuentra en el citoplasma y en cortes inferiores a la región apical sin llegar a formar la estructura característica de panal de abeja o la línea continua en el extremo apical en aquellas monocapas incubadas con los trofozoítos VSP9B10A.pAC.

Si bien otros grupos han reportado cambios en esta proteína, inducidos por *Giardia* como concentraciones puntuales a lo largo de las uniones pericelulares y una tendencia a migrar al citoplasma sin que existan cambios en el transcrito o en el estado de la proteína, en estos se han usado cepas de *Giardia* diferentes a la WB: *Giardia* aislado S2, las cepas GS/H7, WB/1267 y solo en uno se caracteriza el efecto de los trofozoítos WB pero en células Caco diferenciadas con 15 días post-confluencia (Buret et al., 2002; Chin et al., 2002; Humen et al., 2011; Maia-Brigagao et al., 2012). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que durante la interacción de trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A con las monocapas de células Caco-2/TC7 se altera la localización de esta proteína. Esta desorganización se explica considerando que ZO-1 se ensambla en el complejo de unión

apical actuando como una proteína de anclaje que une a los filamentos de F-actina con las proteínas de las uniones estrechas ocludina y claudina. Esto último le da la característica física de ser insoluble a detergentes pero cuando se encuentra en su forma soluble, es decir desensamblada del complejo, su distribución cambia; por tanto la insolubilidad a detergentes es una prueba que indica la integridad del complejo de las uniones intercelulares (Fujibe et al., 2004; Lambert et al., 2005). La importancia de ZO-1 radica en que además de ser el centro organizador o nucleador del complejo de unión apical actúa como una señal temprana de posición durante el ensamblaje de las uniones adherentes para posteriormente reclutar a las proteínas de las uniones estrechas (Fanning and Anderson, 2009). Considerando lo anterior y los resultados obtenidos se puede sugerir que los trofozoítos que expresan a la proteína VSP9B10A contribuyen a alterar el correcto ensamblaje de la proteína ZO-1 en el complejo de unión apical, con lo cual se afectan las uniones intercelulares, explicando de esta manera la pérdida de los contactos intercelulares en aquellas monocapas infectadas con la población de trofozoítos VSP9B10A.pAC. Sin embargo, con estos resultados no se pueden establecer los mecanismos moleculares que llevan a la redistribución de ZO-1 ni determinar si existe una interacción directa entre ambas proteínas o si el des-ensamblaje de ZO-1 es la consecuencia de la activación de receptores por parte la proteína VSP9B10A. Por otro lado, es importante establecer si los daños observados son consecuencia de los cambios en F-actina o viceversa, por lo que es necesario llevar a cabo estudios más detallados específicamente de interacciones proteína-proteína. Además debe considerarse que reportes previos señalan que tanto la deslocalización de F-actina como de ZO-1 en la Giardiasis parece estar mediada por la enzima MLCK (Scott et al., 2002) por lo que el determinar si existen cambios en el estado de esta enzima en las monocapas infectadas con los trofozoítos VSP9B10A podría aportar información sobre el mecanismo por el que estos alteran a F-actina y ZO-1. Así mismo una revisión reciente que discute las diferencias en los resultados reportados por distintos grupos de investigación señala que los cambios en F-actina podrían deberse a que las monocapas de células Caco2 se encuentran unidas a vidrio o plástico y que los cambios en ZO-1 son resultado de la apoptosis celular y no de la interacción del trofozoíto (Kraft et al., 2017). Sin embargo, en este trabajo se observa que los daños a las monocapas y los cambios en la distribución de F-actina se asocian con la presencia de la VSP9B10A en la población de trofozoítos utilizados para infectar a las monocapas, por lo que puede descartarse que estos

cambios se deban al soporte de las monocapas. En este contexto sería necesario determinar si ocurre apoptosis celular en las monocapas incubadas con esta VSP en mayor proporción que con trofozoítos WB y con los trofozoítos en los que se silenció la expresión de la VSP9B10A y si los cambios en ZO-1 son atribuibles a la apoptosis. Al respecto, Kraft y col., utilizan estaurosporina para inducir apoptosis en monocapas de células Caco y observan cambios en la localización de F-actina, ZO-1 y ocludina en comparación con monocapas incubadas con inóculos de trofozoítos bajos y altos; aunque ellos no reportan anomalías en las proteínas de las uniones estrechas como se observó en este trabajo, que en las monocapas infectadas con los trofozoítos, los efectos inducidos por la estaurosporina son similares a los que generados en las monocapas incubadas con los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A, por lo que sería necesario determinar los niveles de apoptosis en estos ensayos.

En el análisis de las proteínas de las uniones estrechas se encontró que también ocludina presenta una localización anormal citoplasmática y focalizada en las uniones pericelulares en aquellas monocapas incubadas con trofozoítos que expresan constitutivamente la proteína VSP9B10A. En el caso de esta proteína además de la deslocalización se detectaron dos bandas; una de 65 kDa que corresponde al peso normal de esta proteína y otra de mayor peso molecular que aparece a las dos horas de co-incubación con los trofozoítos VSP9B10A.pAC y hasta veinticuatro horas después en las infectadas con trofozoítos WB y con los trofozoítos que expresan las cisteín proteasas Catepsina B-like y 14019, que fueron usadas como control. Lo anterior sugiere que los trofozoítos que expresan la proteína VSP9B10A activan mecanismos que inducen cambios en ocludina a tiempos cortos. En las infecciones con otros parásitos se ha observado que aparece un doblete de ocludina y que éste corresponde a un estado de hiper-fosforilación de la proteína que se distribuye en el citoplasma y no se ensamblada en las uniones estrechas (da Costa et al., 2005; Farshori and Kachar, 1999; Fasano and Nataro, 2004; Feldman et al., 2005; Mitic et al., 2000). Estudios específicos sobre este doblete muestran que ésta se encuentra fosforilada primordialmente en serina con alguna incorporación de treonina, (Farshori and Kachar, 1999). Estos cambios en Ocludina son de vital importancia ya que en la dinámica de ensamblaje de las uniones estrechas esta proteína regula la permeabilidad de la barrera epitelial y su desensamblaje impide de manera permanente que la barrera se cierre (Farshori and Kachar, 1999; Feldman et al., 2005; Wong,

1997). En los análisis *in vitro* de la infección con *Giardia* los efectos sobre esta proteína son controvertidos; mientras que algunos estudios muestran reportes de fosforilación (Humen et al., 2011) otros no encuentran cambios en ésta (Maia-Brigagao et al., 2012) aunque coinciden en que no existen cambios en su transcrito ni en su expresión. Estas diferencias podrían atribuirse a cambios cepa-dependientes y podían ser semejantes con los resultados obtenidos en este trabajo y sugerir que los trofozoítos que expresan la proteína VSP9B10A alteran de manera específica a Ocludina y que la expresión de la proteína VSP9B10A en una población que infecta es un factor que induce su disociación de las uniones estrechas. Sin embargo, se debe determinar la asociación directa entre estas proteínas y descartar que los cambios sean consecuencia de la alteración de F-actina y ZO-1.

Finalmente, también se analizó la proteína Claudina-1 de las uniones estrechas. En estos ensayos se detectó una localización distinta del patrón normal de localización de esta proteína en las uniones pericelulares así como una posible degradación de esta proteína; sin embargo estos cambios se observaron en todas las monocapas co-incubadas con las distintas poblaciones de trofozoítos sugiriendo que la desestabilización de claudina-1 no es dependiente de la presencia de la proteína VSP9B1A. Otros grupos han mostrado que claudina-1 no se ve afectada por *Giardia* o que su localización anormal es independiente del re-arreglo del citoesqueleto de actina inducido por este parásito (Humen et al., 2011). Se ha reportado que claudina-1 es una de las proteínas cuya dinámica de ensamblaje no altera la permeabilidad o la TER del epitelio intestinal y que son las claudinas 4 y 7 las que tienen un papel más importante en el mantenimiento de la integridad de este epitelio, por lo que sería importante determinar el estado de éstas durante la liberación de la proteína VSP9B10A (Berkes et al., 2003; Buret, 2008; Medigeshi et al., 2009; Troeger et al., 2007).

Cuando los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A se incubaron con el inhibidor de cisteín proteasas E-64, previo a los ensayos de co-incubación, los daños a las monocapas, así como la deslocalización de F-actina y ocludina no se observaron, ni se detectó la banda de degradación de claudina-1. Estos resultados sugieren que el inhibidor podría estar bloqueando la actividad de cisteín proteasa-like determinada *en silico*. Lo anterior se corroboró con el modelaje tridimensional donde se estableció que el inhibidor E-64 puede acoplarse a la proteína VSP9B10A de manera similar que a la Catepsina B. De estos ensayos se puede inferir que el inhibidor E-64 bloquea la actividad proteolítica de algún componente

presente en la superficie del trofozoíto y que éste podría ser la proteína VSP9B10A. Así mismo se puede sugerir que esa actividad proteolítica altera al complejo de unión apical formado por F-actina, ocludina y claudina-1, a esta última de manera inespecífica, al parecer consecuencia de la desestabilización de las dos primeras. Sin embargo, la relación directa entre la proteína VSP9B10A, la actividad proteolítica y el inhibidor debe ser establecida; por ejemplo, a través de mutaciones sitio-específicas sobre los residuos que estarían formando la triada catalítica en la proteína VSP y mediante el empleo de otros inhibidores que descarten el bloqueo de proteasas distintas al tipo cisteín-proteasas que puedan ser causantes de los daños a las monocapas.

En resumen, el análisis del efecto de la población de trofozoítos que expresa constitutivamente la proteína VSP9B10A sobre el complejo de unión apical sugiere que la liberación de esta proteína puede alterar, en parte, la integridad de la barrera epitelial desestabilizando a las proteínas ocludina, ZO-1 y alterando el cinturón de actina. Sin embargo, mediante los análisis realizados no se puede definir la secuencia de eventos que llevan a los cambios detectados en estas proteínas. Varios mecanismos podrían participar uno sería que la proteína VSP9B10A pueda activar receptores y vías de señalización que desemboquen en la despolimerización de actina y esto a su vez en la imposibilidad de ensamblar el complejo de unión apical. Otra posibilidad es que ésta actúe directamente sobre la proteína ocludina evitando el cierre de las uniones estrechas y con ello desestabilizando a ZO-1 y actina o que active vías que induzcan cambios en la proteína ZO-1 impidiéndole llevar a cabo su función de proteína nucleadora. Otro escenario sería el que estos trofozoítos induzcan procesos en el enterocito que no identificamos en este trabajo y que el resultado final sea la desestabilización del complejo apical que observamos.

Para discernir el o los mecanismos patofisiológicos de los trofozoítos que expresan a la proteína VSP9B10A se requieren estudios más detallados que incluyan el uso de la proteína purificada, así como el uso de estabilizadores del citoesqueleto de actina como jasplakinolida (JAS) que permitiría discriminar un efecto directo sobre el citoesqueleto de actina. Otras estrategias experimentales que podrían ayudar a precisar el mecanismo de acción de la proteína VSP9B10A son ensayos que muestren las interacciones proteína-proteína. Estas incluirían técnicas como co-inmunoprecipitación, ensayos de pull down, crosslinking *in vivo*, crosslinking químico seguido de espectrometría de masas y ensayos de fago display. Estás

permitirían discernir las posibles proteínas blanco y vías de señalización activadas por esta proteína, incluso ensayos de microarreglos o proteómica de los enterocitos para determinar qué cambios ocurren en los transcritos o las proteínas de estos durante la infección con los trofozoítos VSP.

Con respecto a lo anterior el siguiente paso en este trabajo experimental se dirigió a explorar uno de los posibles mecanismos de acción de la proteína VSP9B10A; en particular la hipótesis de que es un efecto sobre el cinturón de actina el que desencadena los daños a la integridad del epitelio intestinal. Cabe señalar que también se planteó el uso de las técnicas de fago display y Far-western blot para establecer las interacciones proteína-proteína e identificar a los blancos de la VSP9B10A, pero sus usos fueron limitados ya que durante este trabajo no se pudo obtener la proteína VSP9B10A recombinante purificada y activa.

Con la finalidad de determinar si el factor desencadenante de la ruptura de la barrera epitelial es el desensamblaje de la actina apical se optó por analizar la dinámica de polimerización de actina y la vía de señalización de Rho GTPasas (Harhaj and Antonetti, 2004; Ivanov et al., 2004). Lo anterior considerando que cuando existe un desequilibrio en la dinámica de polimerización de actina la forma globular se encuentra en mayor proporción que los Filamentos y a que la vía de señalización de las Rho GTPasas es una de las principales reguladoras del ensamblaje del citoesqueleto de actina (Hopkins et al., 2000). El componente de esta vía Rho A es un mediador clave en el desarrollo de las fibras de actina y en el re-arreglo del citoesqueleto mientras que Rho tienen un papel importante en la regulación de la estructura del epitelio su funcionalidad y ensamblaje (Bruewer et al., 2004; Hopkins et al., 2000; Popoff and Geny, 2009; Wojciak-Stothard et al., 2001). Si se presenta un desbalance ya sea en la activación o inactivación de estas proteínas generado por virus, bacterias y parásitos, se activa la traducción señales que desembocan en el incremento de la permeabilidad celular, degradación de los filamentos de actina y en consecuencia a la pérdida de el anillo de unión perijunctional y a la redistribución de las proteínas ZO-1 y ocludina que a su vez inducen cambios en la morfología celular (Bruewer et al., 2004; Hopkins et al., 2000; Popoff and Geny, 2009); específicamente la inactivación de Rho A induce un incremento en la permeabilidad paracelular después de un corto tiempo (Bruewer et al., 2004; Popoff and Geny, 2009). En este caso a nivel experimental se buscó determinar si existían cambios en la polimerización de actina solo atribuibles a la presencia de la proteína VSP9B10A mediante el

uso de Desoxirribonucleasa 1 que se une de manera específica a la forma globular de actina (Varol et al., 2012)

Los resultados no mostraron ninguna diferencia entre las monocapas incubadas con las distintas poblaciones de trofozoítos, ni con las monocapas incubadas sin infectar lo que sugiere que *Giardia* no altera directamente la polimerización *de novo* de actina si no que perturba el correcto ensamblaje del cinturón apical. Por lo anterior se procedió a determinar el estado de la vía de las pequeñas GTPasas Rho/Rac/Cdc42 ya que la activación de esta cascada lleva a la constricción de las fibras de actina (Hopkins et al., 2000). El estado de activación de cada una de estas proteínas se determinó en las diferentes condiciones de incubación encontrándose que todas ellas estaban inactivas sugiriendo que los trofozoítos VSP9B10A no parece actuar a través de la vía de señalización Rho/Rac/Cdc42. Considerando lo anterior es posible que otras enzimas y vías de señalización involucradas en la formación y estabilidad del cinturón de actina podrían estar siendo moduladas durante la infección con trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A. Al respecto algunos estudios muestran que durante la Giardiasis se encuentra disminuida la actividad de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) cuya función es mantener cerrado el anillo de actina del complejo de unión apical (Hopkins et al., 2000; Wojciak-Stothard et al., 2001) así como modular el ensamblaje de los filamentos de la red terminal y del núcleo de las microvellosidades con el cinturón de actina (Mooseker, 1985; Peterson and Mooseker, 1992). En este contexto, sería importante establecer si existe una relación directa entre la proteína VSP9B10A y la alteración en la actividad de esta cinasa que podría en parte explicar los efectos observados en las monocapas. Otra vía de señalización que podría estar alterada por los trofozoítos VSP9B10A es la que involucra a cofilina 1/ADF y a Arp2/3 ya que ésta también participa en la regulación de la formación del anillo perijunctional de actina; aunque en el caso de la patofisiología de la Giardiasis no existen reportes de que esta vía se encuentre afectadas. Por otra parte en modelos murinos de Giardiasis se ha demostrado que ocurren cambios en dos proteínas también reguladoras del citoesqueleto: ezrina y villina (Solaymani-Mohammadi and Singer, 2013); otra posibilidad sería analizar las proteínas ROCK (p160ROCK/ROKb, ROCK /ROKa /ROCK II. ROCK) ya que éstas son la principal vía reguladora de la contractilidad del citoesqueleto a través de la activación de MLCK y la cadena ligera de miosina (MLC)

(Bruewer et al., 2004; Bustelo et al., 2007; Hopkins et al., 2003; Popoff and Geny, 2009; Walsh et al., 2001).

Asimismo durante este trabajo se analizó el estado de los Receptores Activados por Proteasa (PAR) considerando el papel regulador de estos sobre la barrera epitelial y en que su activación por parásitos y bacterias altera la localización de F-actina, ZO-1 y ocludina, así como la permeabilidad paracelular y la secreción de cloro del epitelio intestinal (Buresi et al., 2002; Chin et al., 2008; Enjoji et al., 2014; Flynn and Buret, 2004; Macfarlane et al., 2001; Ossovskaya and Bunnett, 2004; Schmidlin and Bunnett, 2001; Vergnolle, 2000). Además, se consideró que la proteína VSP9B10A por su localización en la superficie del trofozoíto y por la actividad proteolítica mostrada podría desenmascarar a estos receptores durante la interacción con el enterocito. Se han reportado varios estudios en los que se ha descrito que la activación de PAR 1 y 2 en el tracto intestinal induce apoptosis de manera Caspasa 3 y MLCK dependiente y que este mecanismo coincide con la ruptura de las uniones estrechas y con algunos factores patofisiológicos descritos para la Giardiasis (Chin et al., 2008).

En nuestro estudio la evaluación del estado de estos receptores durante la interacción de los trofozoítos WB y VSP9B10A.pAC con monocapas de células Caco2/TC7 se analizó a nivel producción del transcrito, así como en la localización y cambios en la proteína. Las qRT-PCR mostraron que existe un incremento de cerca de una unidad en la producción de PAR-1 y de cerca de 4 veces en los receptores PAR-2 en aquellas monocapas incubadas con los trofozoítos VSP9B10A en comparación los trofozoítos WB, lo que sugiere que la población de trofozoítos que expresan a la proteína VSP9B10A puede estar activando la expresión de estos receptores, específicamente los PAR-2; sin embargo es necesario determinar si su activación ocurre a tiempos más cortos, particularmente antes de que se observen los daños en la monocapa, para establecer si es la activación del transcrito y la proteína PAR-2 la responsable de los cambios en las uniones estrechas y descartar que el incremento en su expresión sean el resultado de los daños en las monocapas. Cabe señalar que la población de trofozoítos que expresan la proteína VSP9B10A mostró un incremento inferior al inducido por los trofozoítos que expresan las proteasas Catepsina B-like o 14019 de *Giardia*, poblaciones que se utilizaron como control del efecto positivo de proteasas bien caracterizadas sobre estos receptores. Los receptores PAR se activan por un mecanismo irreversible que comprende un corte en el extremo amino terminal, que al exponerse sirve

como un ligando que se une a una región conservada en el segundo loop extracelular del receptor en cuestión. Debido a esto, los PAR son producidos y reciclados constantemente en las células que los expresan (Macfarlane et al., 2001; Schmidlin and Bunnett, 2001) además particularmente en el intestino su regulación es un proceso fino ya que están expuestos a las proteasas intestinales y estos pueden ser activados promiscuamente por cisteína, serín y metaloproteasas, aunque con efectos diferenciales (Bohm et al., 1996; Hein et al., 1994; Macfarlane et al., 2001; Ossovskaya and Bunnett, 2004; Schmidlin and Bunnett, 2001; Vergnolle, 2000). Algunos autores postulan que parásitos intestinales a los que se les ha determinado una gran cantidad de proteasas como *E. histolytica*, *C. parvum* e incluso *Giardia duodenalis* pueden estar actuando al activar a los receptores PAR (Flynn and Buret, 2004). Sin embargo hasta el momento solo se han identificado a *H.pylori* como un inductor y a las proteasas gingipaina R de *Porphyromonas gingivalis*, las serín proteasas Der p3 y p9 de *Dermatophagoides pteronyssinus* y de *Blattella germanica* (Flynn and Buret, 2004; Sekiguchi et al., 2012).

En cuanto al análisis de la localización de estos receptores en las monocapas infectadas se observaron cambios solo en el receptor PAR-2, particularmente en aquellas incubadas con los trofozoítos VSP9B10A.pAC, similares a los generados por tripsina y catepsina B-like usadas como controles positivos. En estos casos se observó un claro patrón de distribución en la membrana citoplasmática y no en las monocapas incubadas con los trofozoítos WB o sin tratar. La caracterización de estos receptores y su activación indican que cuando son activos se movilizan desde las cisternas citoplasmáticas para relocalizarse en la membrana apical y basolateral (Chin et al., 2008). Se han reportado que los receptores PAR2 se localizan predominantemente en los enterocitos de las vellosidades y de las criptas (Vergnolle, 2000). Los resultados obtenidos sugieren que la población de trofozoítos VSP9B10A activan la transcripción de los receptores PAR-1 y 2 en los enterocitos pero que este incremento no es exacerbado debido a las reservas citoplasmáticas y por otra parte que este antígeno induce un cambio específico solo en el patrón de localización de PAR-2 que concuerda con el estado activado del receptor. Sin embargo, se requieren otros estudios para corroborar que ocurre la interacción directa entre la proteína VSP9B10A y los receptores PAR, así mismo debe establecerse si el cambio en su distribución se presenta a tiempos cortos y si es específica de la activación de los receptores PAR y no un cambio debido al daño celular. Esto considerando

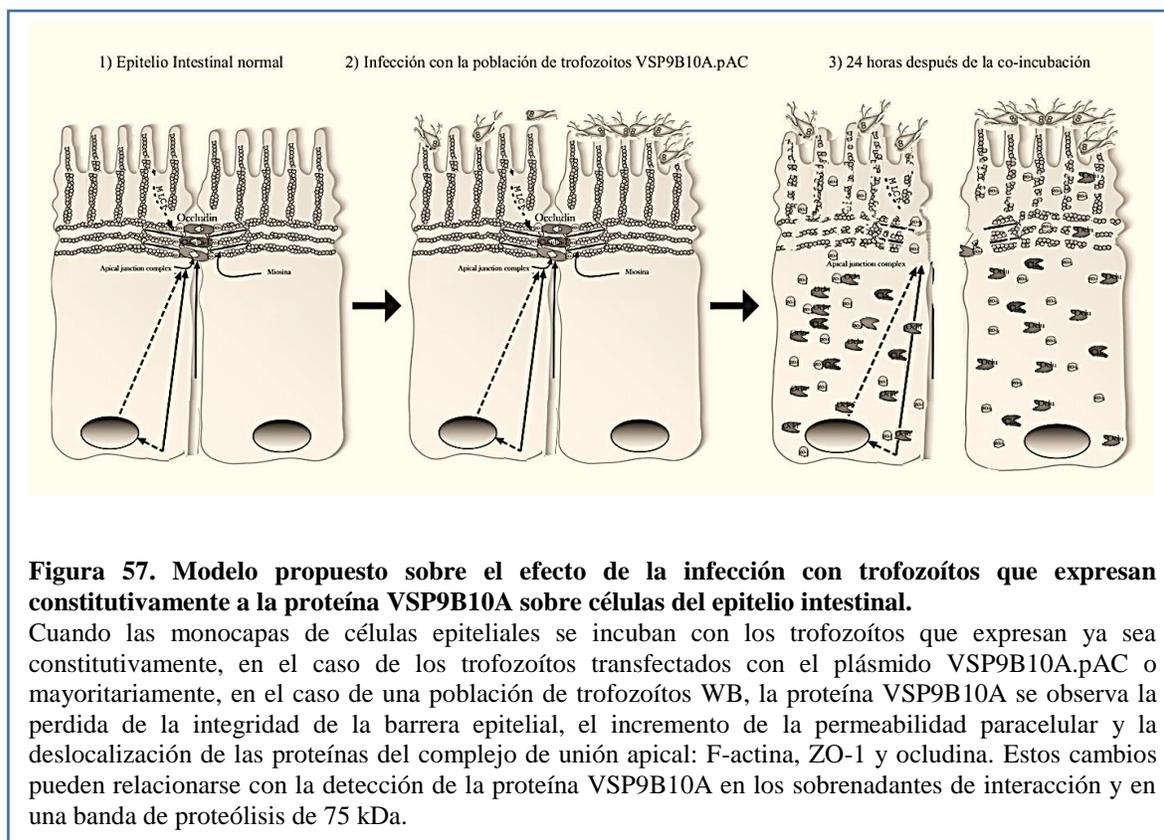
que cuando se llevó a cabo la inmuno-detección de estos receptores en los extractos totales provenientes de las monocapas en cada condición de incubación no se observaron diferencias atribuibles a las distintas poblaciones de trofozoítos utilizados en los co-cultivos de trofozoítos y células epiteliales. Para el estudio más específico de la activación de estos receptores durante la co-incubación con las diferentes poblaciones de trofozoítos debe considerarse el tipo de anticuerpos contra los receptores PAR a utilizar ya que existen anticuerpos que reconocen la forma activa o la inactiva; por lo que la utilización de ambos aportaría más información sobre el estado de estos receptores durante la interacción. En este trabajo se utilizó un anticuerpo que reconoce el fragmento que va del aminoácido 230 al 328 situado en el loop al que se une el fragmento liberado una vez activado el receptor (Adams et al., 2012). Esto último permite detectar todas las formas del receptor incluso aquellas no activas debido a que esta fracción siempre se encuentra expuesta; así mismo puede explicar la detección de bandas de mayor peso molecular que parecen corresponder a diferentes estados de glicosilación de los receptores. En cambio, cuando se utilizó en la inmunodetección un anticuerpo dirigido contra la fracción que va del aminoácido 37 al 50, el ligando “atado” que es liberado al ser activado el receptor por las proteasas, se observó solo un pequeño incremento en los extractos de monocapas incubadas con los trofozoítos VSP9B10A.pAC que podría ser la fracción de receptores que se encuentran en la forma activa. Al respecto existen referencias que comparan la efectividad, especificidad y selectividad de los anticuerpos disponibles en el mercado en distintas técnicas como Western-blot, Inmunofluorescencia, Citometría de Flujo e Inmunohistoquímica y que muestran que los resultados pueden ser contradictorios. En particular estos trabajos reportan que el anticuerpo SAM-11 pero no H-99 detecta al receptor activado y también señala que los anticuerpos N19 y C17 son más específicos en la técnica de Western-blot; mientras que H-99 detecta de manera específica al receptor PAR-2 activado en inmunohistoquímica (Adams et al., 2012). Si bien esta información podría respaldar los resultados obtenidos, se requiere llevar a cabo ensayos más detallados e incluir otros controles para asegurar que no existe una señal no específica y se pueda sugerir que la presencia de la proteína VSP9B10A expresada en la población de trofozoítos induce la producción y activación del receptor PAR-2.

El estudio de la posible activación de los receptores PAR-2 por la proteína VSP9B10A es importante ya que podría explicar los efectos observados sobre la integridad del complejo de

unión apical dentro del contexto de las vías de señalización que son encendidas cuando PAR-2 se activa. Como ejemplos la generación de InsP3 y la movilización de calcio intracelular son consecuencias de esa activación (Buresi et al., 2002; Buresi et al., 2001; Chin et al., 2008; Ishii et al., 1993; Schmidlin and Bunnett, 2001). Otro aspecto importante es que la activación de PAR-2 tiene efectos pro-inflamatorios, como la acumulación de eosinófilos y neutrófilos y la sobre regulación de los transcritos de IL-8 y la producción de TNF $\alpha$  (Vergnolle, 2000). Durante la infección con *Giardia* no hay una respuesta inflamatoria por lo que sería importante llevar a cabo el análisis de una posible relación entre la activación de PAR-2 y la producción del transcrito de IL-8 durante la infección con los trofozoítos VSP9B10A.pAC. En este contexto, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la producción del transcrito de IL-8 se incrementa cerca de 30 veces en las monocapas tratadas con los trofozoítos WB y en las tratadas con las proteasas mientras que en las infectadas con los trofozoítos que expresan la proteína VSP9B10A éste se incrementa solo cerca de 10 veces en comparación con el control de células sin infectar. Lo anterior discrepa del incremento de los transcritos donde los trofozoítos WB activan casi en la misma proporción la producción del transcrito del receptor PAR que los trofozoítos que expresan la proteína VSP9B10A. Estos resultados sugieren que son otros mecanismos los que activan la expresión de esta interleucina además del receptor PAR-2. Por lo tanto estos resultado deben ser analizados de manera independiente ya que se ha reportado que en la Giardiasis esta interleucina se encuentra disminuida; aunque la inducción de su producción también parece ser un fenómeno cepa dependiente además de que se ha mostrado que el trofozoíto puede controlar el nivel de esta interleucina a través de un mecanismo dependiente de Catepsina B (Cotton et al., 2014). Así es necesario realizar más estudios para establecer si la proteína VSP9B10A activa directamente la producción de IL-8 así mismo debe establecerse la respuesta inmune que esta proteína VSP activa en el hospedero.

En resumen, los resultados experimentales obtenidos durante este trabajo muestran que la producción de la proteína VSP910A es inducida por el contacto de los trofozoítos de *Giardia* con el enterocito y que durante esta interacción la proteína es liberada al medio generando en parte daños a la integridad del epitelio intestinal. En particular ésta podría tener un efecto sobre el complejo de unión apical deslocalizando a F-actina a las proteínas ZO-1 y Ocludina e incrementando la permeabilidad de la barrera epitelial, por lo que esta proteína podría ser

considerada como un factor de virulencia (**Figura 57**). Sin embargo, los mecanismos por los que estos cambios ocurren deben investigarse en detalle, para entender cómo se libera la proteína VSP910A, cuál sería el blanco inicial de esta proteína, y si la liberación de ésta la actividad proteolítica están ligadas directamente al efecto sobre las proteínas del complejo de unión apical. La purificación de esta proteína es un aspecto crucial para llevar a cabo la caracterización bioquímica y enzimática de ésta que permitiría comprender el mecanismo de esta proteína sobre las células epiteliales. Por otro lado, sería importante analizar la respuesta inmune que esta proteína genera en el hospedero, así como determinar los efectos que pueda tener esta en un modelo experimental de infección para Giardiasis.



En general en este trabajo se establece que la proteína VSP9B10A parece tener un papel en la patofisiología de la Giardiasis, siendo este estudio el primero que se enfoca en el análisis de la participación de una proteína Variable de superficie en las primeras fases de la interacción del trofozoíto con la célula epitelial y en la actividad atípica de una proteína de esta familia de antígenos. Finalmente, este trabajo aporta nueva información acerca de la biología de este

parásito y plantea una posible explicación para los fenómenos de patogenicidad y virulencia cepa/dependiente reportados para *Giardia* que puede ser empleados en el desarrollo de fármacos específicos contra este parásito.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó el efecto de poblaciones de trofozoítos de *Giardia duodenalis* que expresan homogéneamente a la proteína VSP9B10A durante su interacción con células epiteliales.

1. Se determinó que los trofozoítos que expresan constitutivamente a la proteína VSP9B10A en su superficie inducen daños en las monocapas de células IEC-6, MDCK y Caco-2/TC7 durante la interacción con éstas. Estos daños también se presentaron cuando la población de trofozoítos WB empleados en ensayos de co- incubación expresaron de manera mayoritaria a la proteína VSP9B10A y no cuando su expresión se bloqueó en los trofozoítos.
2. Los niveles de transcrito y de la proteína VSP9B10A se incrementan durante la interacción con las células epiteliales y el patrón de distribución de la proteína cambia en la superficie de los trofozoítos.
3. Los daños a las monocapas correspondieron con un incremento en la permeabilidad paracelular y con la deslocalización de las proteínas del complejo de unión apical F-actina, ZO-1 y Ocludina; así como con la detección de la proteína VSP9B10A en sobrenadantes de interacción en una banda de proteólisis de 75 kDa en aquellos provenientes de la interacción con trofozoítos VSP9B10A positivos.

## PERSPECTIVAS

Durante el presente trabajo se logró establecer que la proteína VSP9B10A parece actuar como un factor de virulencia en *Giardia*, pero es necesario llevar a cabo otros estudios para determinar el mecanismo de acción de esta proteína durante la interacción con su célula blanco. Considerando que el trabajo se llevó a cabo con las poblaciones de trofozoítos que mediante transfección expresaron constitutivamente a la proteína VSP9B10A, es necesario llevar a cabo estudios empleando a la proteína VSP9B10A purificada para establecer una relación directa entre la proteína y los daños observados.

1. Realizar los estudios en cultivos de enterocitos empleando la proteína VSP9B10A purificada
2. Confirmar el análisis bioinformático mediante una caracterización bioquímica o enzimática ya sea con la proteína purificada o en las poblaciones de trofozoítos que constitutivamente expresan a la proteína VSP9B10A, empleando ensayos de mutaciones sitio dirigidas o utilizando un inhibidor específico de cisteín proteasas.
3. Caracterizar con que proteínas o receptores interactúa la proteína VSP9B10A para generar el daño al epitelio intestinal y los cambios en las proteínas del complejo de unión apical mediante co-inmunoprecipitación ligada a Espectrometría de masas, crosslinking *in vivo*, o ensayos de fago display.
4. Determinar la respuesta inmunológica que se activa por esta proteína en el hospedero y así establecer si esta puede ser útil en la generación de respuestas protectoras en éste.

## REFERENCIAS

1. Abdul-Wahid, A., Faubert, G., 2007. Mucosal delivery of a transmission-blocking DNA vaccine encoding *Giardia lamblia* CWP2 by *Salmonella typhimurium* bacteriofection vehicle. *Vaccine* 25, 8372-8383.
2. Adam, R.D., 2000. The *Giardia lamblia* genome. *Int J Parasitol* 30, 475-484.
3. Adam, R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 14, 447-475.
4. Adam, R.D., Aggarwal, A., Lal, A.A., de La Cruz, V.F., McCutchan, T., Nash, T.E., 1988. Antigenic variation of a cysteine-rich protein in *Giardia lamblia*. *J Exp Med* 167, 109-118.
5. Adam, R.D., Nigam, A., Seshadri, V., Martens, C.A., Farneth, G.A., Morrison, H.G., Nash, T.E., Porcella, S.F., Patel, R., 2010. The *Giardia lamblia* vsp gene repertoire: characteristics, genomic organization, and evolution. *BMC Genomics* 11, 1471-2164.
6. Adams, M.N., Pagel, C.N., Mackie, E.J., Hooper, J.D., 2012. Evaluation of antibodies directed against human protease-activated receptor-2. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 385, 861-873.
7. Aggarwal, A., Nash, T.E., 1988. Antigenic variation of *Giardia lamblia* in vivo. *Infect Immun* 56, 1420-1423.
8. Ajjampur, S.S., Sankaran, P., Kannan, A., Sathyakumar, K., Sarkar, R., Gladstone, B.P., Kang, G., 2009. *Giardia duodenalis* assemblages associated with diarrhea in children in South India identified by PCR-RFLP. *Am J Trop Med Hyg* 80, 16-19.
9. Al-Mohammed, H.I., 2011. Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. *Parasitol Res* 108, 1375-1381.
10. Andersson, J.O., 2012. Double peaks reveal rare diplomonad sex. *Trends Parasitol* 28, 46-52.
11. Ankarklev, J., Hestvik, E., Lebbad, M., Lindh, J., Kaddu-Mulindwa, D.H., Andersson, J.O., Tylleskar, T., Tumwine, J.K., Svard, S.G., 2012. Common coinfections of *Giardia intestinalis* and *Helicobacter pylori* in non-symptomatic Ugandan children. *PLoS Negl Trop Dis* 6, 28.
12. Ankarklev, J., Jerlstrom-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., Svard, S.G., 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol* 8, 413-422.
13. Ansell, B.R., McConville, M.J., Ma'ayeh, S.Y., Dagley, M.J., Gasser, R.B., Svard, S.G., Jex, A.R., 2015. Drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Biotechnol Adv* 33, 888-901.
14. Arguello-Garcia, R., Bazan-Tejeda, M.L., Ortega-Pierres, G., 2009. Encystation commitment in *Giardia duodenalis*: a long and winding road. *Parasite* 16, 247-258.
15. Arguello-Garcia, R., Cruz-Soto, M., Romero-Montoya, L., Ortega-Pierres, G., 2004. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in vitro. *J Antimicrob Chemother* 54, 711-721.
16. Astiazaran-Garcia, H., Lopez-Teros, V., Valencia, M.E., Vazquez-Ortiz, F., Sotelo-Cruz, N., Quihui-Cota, L., 2010. *Giardia lamblia* infection and its implications for vitamin A liver stores in school children. *Ann Nutr Metab* 57, 228-233.
17. Baldursson, S., Karanis, P., 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res* 45, 6603-6614.

18. Bartelt, L.A., Sartor, R.B., 2015. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000prime reports* 7, 62.
19. Batra, R., Judd, E., Eling, J., Newsholme, W., Goldenberg, S.D., 2016. Molecular detection of common intestinal parasites: a performance evaluation of the BD Max Enteric Parasite Panel. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 35, 1753-1757.
20. Baveja, U.K., Bhatia, V.N., Warhurst, D.C., 1998. *Giardia lamblia*: in-vitro sensitivity to some chemotherapeutic agents. *J Commun Dis* 30, 79-84.
21. Beatty, J.K., Akierman, S.V., Motta, J.P., Muise, S., Workentine, M.L., Harrison, J.J., Bhargava, A., Beck, P.L., Rioux, K.P., McKnight, G.W., Wallace, J.L., Buret, A.G., 2017. *Giardia duodenalis* induces pathogenic dysbiosis of human intestinal microbiota biofilms. *Int J Parasitol* 47, 311-326.
22. Becker, S.L., Muller, I., Mertens, P., Herrmann, M., Zondie, L., Beyleveld, L., Gerber, M., du Randt, R., Puhse, U., Walter, C., Utzinger, J., 2017. PCR-based verification of positive rapid diagnostic tests for intestinal protozoa infections with variable test band intensity. *Acta Trop* 174, 49-55.
23. Begaydarova, R., Yukhnevich, Y., Babenko, D., Kaliyeva, S., Azizov, I., Muldaeva, G., Omarkulov, B., 2015. Determination of PFOR gene expression in strains of *G. intestinalis* with different inhibitory concentrations of metronidazole. *J Infect Dev Ctries* 9, 519-523.
24. Benchimol, M., 2004. *Giardia lamblia*: behavior of the nuclear envelope. *Parasitol Res* 94, 254-264.
25. Berkes, J., Viswanathan, V.K., Savkovic, S.D., Hecht, G., 2003. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 52, 439-451.
26. Bermudez-Cruz, R.M., Ortega-Pierres, G., Ceja, V., Coral-Vazquez, R., Fonseca, R., Cervantes, L., Sanchez, A., Depardon, F., Newport, G., Montanez, C., 2004. A 63 kDa VSP9B10A-like protein expressed in a C-8 *Giardia duodenalis* Mexican clone. *Arch Med Res* 35, 199-208.
27. Bertrand, I., Albertini, L., Schwartzbrod, J., 2005. Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 43, 5940-5944.
28. Bhargava, A., Cotton, J.A., Dixon, B.R., Gedamu, L., Yates, R.M., Buret, A.G., 2015. *Giardia duodenalis* Surface Cysteine Proteases Induce Cleavage of the Intestinal Epithelial Cytoskeletal Protein Villin via Myosin Light Chain Kinase. *PLoS One* 10.
29. Birkeland, S.R., Preheim, S.P., Davids, B.J., Cipriano, M.J., Palm, D., Reiner, D.S., Svard, S.G., Gillin, F.D., McArthur, A.G., 2010. Transcriptome analyses of the *Giardia lamblia* life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 174, 62-65.
30. Birky, C.W., Jr., 2010. *Giardia* sex? Yes, but how and how much? *Trends Parasitol* 26, 70-74.
31. Bohm, S.K., Khitin, L.M., Grady, E.F., Aponte, G., Payan, D.G., Bunnett, N.W., 1996. Mechanisms of desensitization and resensitization of proteinase-activated receptor-2. *J Biol Chem* 271, 22003-22016.
32. Brown, D.M., Upcroft, J.A., Edwards, M.R., Upcroft, P., 1998. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Int J Parasitol* 28, 149-164.
33. Bruewer, M., Hopkins, A.M., Hobert, M.E., Nusrat, A., Madara, J.L., 2004. RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and

- biochemical modulation of junctional proteins and F-actin. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, 24.
34. Buresi, M.C., Buret, A.G., Hollenberg, M.D., MacNaughton, W.K., 2002. Activation of proteinase-activated receptor 1 stimulates epithelial chloride secretion through a unique MAP kinase- and cyclo-oxygenase-dependent pathway. *Faseb J* 16, 1515-1525.
  35. Buresi, M.C., Schleihau, E., Vergnolle, N., Buret, A., Wallace, J.L., Hollenberg, M.D., MacNaughton, W.K., 2001. Protease-activated receptor-1 stimulates Ca(2+)-dependent Cl(-) secretion in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281, G323-332.
  36. Buret, A.G., 2007. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut* 56, 316-317.
  37. Buret, A.G., 2008. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. *Parasite* 15, 261-265.
  38. Buret, A.G., Mitchell, K., Muench, D.G., Scott, K.G., 2002. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology* 125, 11-19.
  39. Bustelo, X.R., Sauzeau, V., Berenjano, I.M., 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 29, 356-370.
  40. Cabrera-Licona, A., 2010. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA DE SUPERFICIE VSP9B10A DE *Giardia duodenalis* EN EL PROCESO DE ADHESIÓN A CELULAS EPITELIALES, Departamento de Genética y Biología Molecular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Mexico D.F., p. 66.
  41. Cabrera-Licona, A., Solano-Gonzalez, E., Fonseca-Linan, R., Bazan-Tejeda, M.L., Raul, A.-G., Bermudez-Cruz, R.M., Ortega-Pierres, G., 2017. Expression and secretion of the *Giardia duodenalis* variant surface protein 9B10A by transfected trophozoites causes damage to epithelial cell monolayers mediated by protease activity. *Exp Parasitol* 179, 49-64.
  42. Camerini, S., Bocedi, A., Cecchetti, S., Casella, M., Carbo, M., Morea, V., Pozio, E., Ricci, G., Lalle, M., 2017. Proteomic and functional analyses reveal pleiotropic action of the anti-tumoral compound NBDHEX in *Giardia duodenalis*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 7, 147-158.
  43. Caro, I., Boulenc, X., Rousset, M., Meunier, V., Bourrié, M., Julian, B., Joyeux, H., Roques, C., Berger, Y., Zweibaum, A., Fabre, G., 1995. Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 116, 147-158.
  44. Carpenter, M.L., Assaf, Z.J., Gourguechon, S., Cande, W.Z., 2012. Nuclear inheritance and genetic exchange without meiosis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *J Cell Sci* 125, 2523-2532.
  45. Carranza, P.G., Feltes, G., Ropolo, A., Quintana, S.M., Touz, M.C., Lujan, H.D., 2002. Simultaneous expression of different variant-specific surface proteins in single *Giardia lamblia* trophozoites during encystation. *Infect Immun* 70, 5265-5268.
  46. Carranza, P.G., Gargantini, P.R., Prucca, C.G., Torri, A., Saura, A., Svard, S., Lujan, H.D., 2016. Specific histone modifications play critical roles in the control of encystation and antigenic variation in the early-branching eukaryote *Giardia lamblia*. *Int J Biochem Cell Biol* 81, 32-43.

47. Carranza, P.G., Lujan, H.D., 2010. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes Infect* 12, 71-80.
48. Carrasco-Pozo, C., Morales, P., Gotteland, M., 2013. Polyphenols protect the epithelial barrier function of Caco-2 cells exposed to indomethacin through the modulation of occludin and zonula occludens-1 expression. *J Agric Food Chem* 61, 5291-5297.
49. Carter, E.R., Nabarro, L.E., Hedley, L., Chiodini, P.L., 2017. Nitroimidazole-refractory giardiasis; a growing problem requiring rational solutions. *Clin Microbiol Infect* 15, 30289-30286.
50. Cedillo-Rivera, R., Chavez, B., Gonzalez-Robles, A., Tapia, A., Yopez-Mulia, L., 2002. In vitro effect of nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *J Eukaryot Microbiol* 49, 201-208.
51. Cedillo-Rivera, R., Leal, Y.A., Yopez-Mulia, L., Gomez-Delgado, A., Ortega-Pierres, G., Tapia-Conyer, R., Munoz, O., 2009. Seroepidemiology of giardiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 80, 6-10.
52. Cevallos, A., Carnaby, S., James, M., Farthing, J.G., 1995. Small intestinal injury in a neonatal rat model of giardiasis is strain dependent. *Gastroenterology* 109, 766-773.
53. Colin-Lozano, B., Leon-Rivera, I., Chan-Bacab, M.J., Ortega-Morales, B.O., Moo-Puc, R., Lopez-Guerrero, V., Hernandez-Nunez, E., Arguello-Garcia, R., Scior, T., Barbosa-Cabrera, E., Navarrete-Vazquez, G., 2017. Synthesis, in vitro and in vivo giardicidal activity of nitrothiazole-NSAID chimeras displaying broad antiprotozoal spectrum. *Bioorg Med Chem Lett* 27, 3490-3494.
54. Cooper, M.A., Adam, R.D., Worobey, M., Sterling, C.R., 2007. Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. *Curr Biol* 17, 1984-1988.
55. Coradi, S.T., Guimaraes, S., 2006. *Giardia duodenalis*: protein substrates degradation by trophozoite proteases. *Parasitol Res* 99, 131-136.
56. Cotton, J.A., Amat, C.B., Buret, A.G., 2015. Disruptions of Host Immunity and Inflammation by *Giardia Duodenalis*: Potential Consequences for Co-Infections in the Gastro-Intestinal Tract. *Pathogens* 4, 764-792.
57. Cotton, J.A., Beatty, J.K., Buret, A.G., 2011. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int J Parasitol* 41, 925-933.
58. Cotton, J.A., Bhargava, A., Ferraz, J.G., Yates, R.M., Beck, P.L., Buret, A.G., 2014. *Giardia duodenalis* cathepsin B proteases degrade intestinal epithelial interleukin-8 and attenuate interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis. *Infect Immun* 82, 2772-2787.
59. Covacin, C., Aucoin, D.P., Elliot, A., Thompson, R.C., 2011. Genotypic characterisation of *Giardia* from domestic dogs in the USA. *Vet Parasitol* 177, 28-32.
60. Crossley, R., Marshall, J., Clark, J.T., Holberton, D.V., 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. *J Cell Sci* 80, 233-252.
61. Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A., Rousset, M., 1994. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J Cell Sci* 107 ( Pt 1), 213-225.

62. Chavez, B., Gonzalez-Mariscal, L., Cedillo-Rivera, R., Martinez-Palomo, A., 1995. *Giardia lamblia*: in vitro cytopathic effect of human isolates. *Exp Parasitol* 80, 133-138.
63. Chavez, B., Knaippe, F., Gonzalez-Mariscal, L., Martinez-Palomo, A., 1986. *Giardia lamblia*: electrophysiology and ultrastructure of cytopathology in cultured epithelial cells. *Exp Parasitol* 61, 379-389.
64. Chin, A.C., Lee, W.Y., Nusrat, A., Vergnolle, N., Parkos, C.A., 2008. Neutrophil-mediated activation of epithelial protease-activated receptors-1 and -2 regulates barrier function and transepithelial migration. *J Immunol* 181, 5702-5710.
65. Chin, A.C., Teoh, D.A., Scott, K.G., Meddings, J.B., Macnaughton, W.K., Buret, A.G., 2002. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun* 70, 3673-3680.
66. da Costa, R.F., de Souza, W., Benchimol, M., Alderete, J.F., Morgado-Diaz, J.A., 2005. *Trichomonas vaginalis* perturbs the junctional complex in epithelial cells. *Cell research* 15, 704-716.
67. Dann, S.M., Manthey, C.F., Le, C., Miyamoto, Y., Gima, L., Abraham, A., Cao, A.T., Hanson, E.M., Kolls, J.K., Raz, E., Cong, Y., Eckmann, L., 2015. IL-17A promotes protective IgA responses and expression of other potential effectors against the lumen-dwelling enteric parasite *Giardia*. *Exp Parasitol* 156, 68-78.
68. Davids, B.J., Mehta, K., Fesus, L., McCaffery, J.M., Gillin, F.D., 2004. Dependence of *Giardia lamblia* encystation on novel transglutaminase activity. *Mol Biochem Parasitol* 136, 173-180.
69. Davids, B.J., Reiner, D.S., Birkeland, S.R., Preheim, S.P., Cipriano, M.J., McArthur, A.G., Gillin, F.D., 2006. A new family of giardial cysteine-rich non-VSP protein genes and a novel cyst protein. *PLoS One* 20.
70. Davids, B.J., Williams, S., Lauwaet, T., Palanca, T., Gillin, F.D., 2008. *Giardia lamblia* aurora kinase: a regulator of mitosis in a binucleate parasite. *Int J Parasitol* 38, 353-369.
71. Dawson, S.C., 2010. An insider's guide to the microtubule cytoskeleton of *Giardia*. *Cell Microbiol* 12, 588-598.
72. Dawson, S.C., House, S.A., 2010. Life with eight flagella: flagellar assembly and division in *Giardia*. *Curr Opin Microbiol* 13, 480-490.
73. de Carvalho, T.B., David, E.B., Coradi, S.T., Guimaraes, S., 2008. Protease activity in extracellular products secreted in vitro by trophozoites of *Giardia duodenalis*. *Parasitol Res* 104, 185-190.
74. Di Matteo, A., Scandurra, F.M., Testa, F., Forte, E., Sarti, P., Brunori, M., Giuffre, A., 2008. The O<sub>2</sub>-scavenging flavodiiron protein in the human parasite *Giardia intestinalis*. *J Biol Chem* 283, 4061-4068.
75. Dobell, C., 1920. The Discovery of the Intestinal Protozoa of Man. *Proc R Soc Med* 13, 1-15.
76. Dolezal, P., Smid, O., Rada, P., Zubacova, Z., Bursac, D., Sutak, R., Nebesarova, J., Lithgow, T., Tachezy, J., 2005. *Giardia* mitochondria and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10924-10929.
77. Dreesen, L., De Bosscher, K., Grit, G., Staels, B., Lubberts, E., Bauge, E., Geldhof, P., 2014. *Giardia muris* infection in mice is associated with a protective interleukin 17A

- response and induction of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Infect Immun* 82, 3333-3340.
78. Dukes, J.D., Whitley, P., Chalmers, A.D., The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biol.* 2011 Oct 7;12:43. doi: 10.1186/1471-2121-12-43.
  79. Eckmann, L., Gillin, F.D., 2001. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G1-6.
  80. Efstratiou, A., Ongerth, J.E., Karanis, P., 2017. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011-2016. *Water Res* 114, 14-22.
  81. Einarsson, E., Ma'ayeh, S., Svard, S.G., 2016. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Curr Opin Microbiol* 34, 47-52.
  82. Ekdahl, K., Andersson, Y., 2005. Imported giardiasis: impact of international travel, immigration, and adoption. *Am J Trop Med Hyg* 72, 825-830.
  83. El Basha, N.R., Zaki, M.M., Hassanin, O.M., Rehan, M.K., Omran, D., 2016. *Giardia* Assemblages A and B in Diarrheic Patients: A Comparative Study in Egyptian Children and Adults. *J Parasitol* 102, 69-74.
  84. Elias E, G.N., et al. , 2008. Secretory granule biogénesis and the organization of membrane compartments via SNARE proteins in *Giardia lamblia*. . CABI International Publishers UK
  85. 409-417.
  86. Eligio-Garcia, L., Cortes-Campos, A., Cota-Guajardo, S., Gaxiola, S., Jimenez-Cardoso, E., 2008. Frequency of *Giardia intestinalis* assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, Mexico using beta-giardin restriction gene. *Vet Parasitol* 156, 205-209.
  87. Elmendorf, H.G., Rohrer, S.C., Khoury, R.S., Bouttenot, R.E., Nash, T.E., 2005. Examination of a novel head-stalk protein family in *Giardia lamblia* characterised by the pairing of ankyrin repeats and coiled-coil domains. *Int J Parasitol* 35, 1001-1011.
  88. Ellis, J.G.t., Davila, M., Chakrabarti, R., 2003. Potential involvement of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in encystation of a primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. Stage-specific activation and intracellular localization. *J Biol Chem* 278, 1936-1945.
  89. Emery, S.J., Mirzaei, M., Vuong, D., Pascovici, D., Chick, J.M., Lacey, E., Haynes, P.A., 2016. Induction of virulence factors in *Giardia duodenalis* independent of host attachment. *Sci Rep* 6.
  90. Emery, S.J., Pascovi, D., Lacey, E., Haynes, P.A., 2015. The generation gap: Proteome changes and strain variation during encystation in *Giardia duodenalis*. *Mol Biochem Parasitol* 201, 47-56.
  91. Emery, S.J., van Sluyter, S., Haynes, P.A., 2014. Proteomic analysis in *Giardia duodenalis* yields insights into strain virulence and antigenic variation. *Proteomics* 14, 2523-2534.
  92. Enjoji, S., Ohama, T., Sato, K., 2014. Regulation of epithelial cell tight junctions by protease-activated receptor 2. *J Vet Med Sci* 76, 1225-1229.
  93. Escobedo, A.A., Ballesteros, J., Gonzalez-Fraile, E., Almirall, P., 2016. A meta-analysis of the efficacy of albendazole compared with tinidazole as treatments for *Giardia* infections in children. *Acta Trop* 153, 120-127.

94. Evans-Osses, I., Ansa-Addo, E.A., Inal, J.M., Ramirez, M.I., 2010. Involvement of lectin pathway activation in the complement killing of *Giardia intestinalis*. *Biochem Biophys Res Commun* 395, 382-386.
95. Faghiri, Z., Widmer, G., 2011. A comparison of the *Giardia lamblia* trophozoite and cyst transcriptome using microarrays. *BMC Microbiol* 11, 1471-2180.
96. Fanning, A.S., Anderson, J.M., 2009. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165, 113-120.
97. Farbey, M.D., Reynoldson, J.A., Thompson, R.C., 1995. In vitro drug susceptibility of 29 isolates of *Giardia duodenalis* from humans as assessed by an adhesion assay. *Int J Parasitol* 25, 593-599.
98. Farshori, P., Kachar, B., 1999. Redistribution and phosphorylation of occludin during opening and resealing of tight junctions in cultured epithelial cells. *J Membr Biol* 170, 147-156.
99. Fasano, A., Nataro, J.P., 2004. Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins. *Advanced drug delivery reviews* 56, 795-807.
100. Faubert, G., 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev* 13, 35-54.
101. Feldman, G.J., Mullin, J.M., Ryan, M.P., 2005. Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 883-917.
102. Feng, X.M., Zheng, W.Y., Zhang, H.M., Shi, W.Y., Li, Y., Cui, B.J., Wang, H.Y., 2016. Vaccination with Bivalent DNA Vaccine of alpha1-Giardin and CWP2 Delivered by Attenuated *Salmonella typhimurium* Reduces Trophozoites and Cysts in the Feces of Mice Infected with *Giardia lamblia*. *PLoS One* 11.
103. Ferella, M., Davids, B.J., Cipriano, M.J., Birkeland, S.R., Palm, D., Gillin, F.D., McArthur, A.G., Svard, S., 2014a. Gene expression changes during *Giardia*-host cell interactions in serum-free medium. *Mol Biochem Parasitol* 197, 21-23.
104. Ferella, M., Davids, B.J., Cipriano, M.J., Birkeland, S.R., Palm, D., Gillin, F.D., McArthur, A.G., Svard, S., 2014b. Gene expression changes during *Giardia*-host cell interactions in serum-free medium. *Mol Biochem Parasitol* 5, 00137-00136.
105. Fisher, B.S., Estrano, C.E., Cole, J.A., 2013. Modeling long-term host cell-*Giardia lamblia* interactions in an in vitro co-culture system. *PLoS One* 8.
106. Flores-Carrillo, P., Velazquez-Lopez, J.M., Aguayo-Ortiz, R., Hernandez-Campos, A., Trejo-Soto, P.J., Yepez-Mulia, L., Castillo, R., 2017. Synthesis, antiprotozoal activity, and chemoinformatic analysis of 2-(methylthio)-1H-benzimidazole-5-carboxamide derivatives: Identification of new selective giardicidal and trichomonocidal compounds. *Eur J Med Chem* 137, 211-220.
107. Flynn, A.N., Buret, A.G., 2004. Proteinase-activated receptor 1 (PAR-1) and cell apoptosis. *Apoptosis* 9, 729-737.
108. Foronda, P., BARGUES, M.D., Abreu-Acosta, N., Periago, M.V., Valero, M.A., Valladares, B., Mas-Coma, S., 2008. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. *Parasitol Res* 103, 1177-1181.
109. Franzen, O., Jerlstrom-Hultqvist, J., Einarsson, E., Ankarklev, J., Ferella, M., Andersson, B., Svard, S.G., 2013. Transcriptome profiling of *Giardia intestinalis* using strand-specific RNA-seq. *PLoS Comput Biol* 9, 28.

110. Fujibe, M., Chiba, H., Kojima, T., Soma, T., Wada, T., Yamashita, T., Sawada, N., 2004. Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions. *Exp Cell Res* 295, 36-47.
111. Galeh, T.M., Kazemi, A., Mahami-Oskouei, M., Baradaran, B., Spotin, A., Sarafraz, S., Karamat, M., 2016. Introducing nitazoxanide as a promising alternative treatment for symptomatic to metronidazole-resistant giardiasis in clinical isolates. *Asian Pac J Trop Med* 9, 887-892.
112. Garcia-Cervantes, P.C., Baez-Flores, M.E., Delgado-Vargas, F., Ponce-Macotela, M., Nawa, Y., De-la-Cruz-Otero, M.D., Martinez-Gordillo, M.N., Diaz-Camacho, S.P., 2017. *Giardia duodenalis* genotypes among schoolchildren and their families and pets in urban and rural areas of Sinaloa, Mexico. *J Infect Dev Ctries* 11, 180-187.
113. Garcia-Torres, I., de la Mora-de la Mora, I., Marcial-Quino, J., Gomez-Manzo, S., Vanoye-Carlo, A., Navarrete-Vazquez, G., Colin-Lozano, B., Gutierrez-Castrellon, P., Sierra-Palacios, E., Lopez-Velazquez, G., Enriquez-Flores, S., 2016. Proton pump inhibitors drastically modify triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* at functional and structural levels, providing molecular leads in the design of new anti-giardiasis drugs. *Biochim Biophys Acta* 1, 97-107.
114. Gardner, T.B., Hill, D.R., 2001. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 14, 114-128.
115. Gargantini, P.R., Serradell, M.C., Torri, A., Lujan, H.D., 2012. Putative SF2 helicases of the early-branching eukaryote *Giardia lamblia* are involved in antigenic variation and parasite differentiation into cysts. *BMC Microbiol* 12, 1471-2180.
116. Gargantini, P.R., Serradell Mdel, C., Rios, D.N., Tenaglia, A.H., Lujan, H.D., 2016. Antigenic variation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Curr Opin Microbiol* 32, 52-58.
117. Gelanew, T., Lalle, M., Hailu, A., Pozio, E., Caccio, S.M., 2007. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop* 102, 92-99.
118. Gerbaba, T.K., Gupta, P., Rioux, K., Hansen, D., Buret, A.G., 2015. *Giardia duodenalis*-induced alterations of commensal bacteria kill *Caenorhabditis elegans*: a new model to study microbial-microbial interactions in the gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 308, 8.
119. Geurden, T., Levecke, B., Caccio, S.M., Visser, A., De Groote, G., Casaert, S., Vercruyse, J., Claerebout, E., 2009. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium. *Parasitology* 136, 1161-1168.
120. Ghosh, S., Frisardi, M., Rogers, R., Samuelson, J., 2001. How *Giardia* swim and divide. *Infect Immun* 69, 7866-7872.
121. Gillin, F.D., Boucher, S.E., Rossi, S.S., Reiner, D.S., 1989. *Giardia lamblia*: The roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle *in vitro*. *Experimental parasitology* 69, 164-174.
122. Golami, S., Rahimi-Esboei, B., Mousavi, P., Marhaba, Z., Youssefi, M.R., Rahimi, M.T., 2016. Survey on efficacy of chloroformic extract of *Artemisia annua* against *Giardia lamblia* trophozoite and cyst *in vitro*. *J Parasit Dis* 40, 88-92.
123. Gomez-Mondragon, M., 2011. ANALISIS DE LA INTERACCION DE LA CATEPSINA B-LIKE DE *GIARDIA DUODENALIS* CON PROTEINAS DE

- ADHESION DE CELULAS EPITELIALES, Departamento de Genetica y Biologia Molecular. Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del IPN, Mexico D.F.
124. Gorowara, S., Ganguly, N.K., Mahajan, R.C., Walia, B.N., 1992. Study on the mechanism of *Giardia lamblia* induced diarrhoea in mice. *Biochim Biophys Acta* 14, 122-126.
  125. Goyal, N., Shukla, G., 2013. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG modulates the mucosal immune response in *Giardia intestinalis*-infected BALB/c mice. *Dig Dis Sci* 58, 1218-1225.
  126. Guimaraes, S., Sogayar, M.I., Franco, M.F., 2003. Protease activity in *Giardia duodenalis* trophozoites of axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98, 77-81.
  127. Guo, J., Zheng, W., Wang, Y., Li, Y., Lu, S., Feng, X., 2014. Coexistence of sense and anti-sense mRNAs of variant surface protein in *Giardia lamblia* trophozoites. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 444, 439-444.
  128. Hagen, K.D., Hirakawa, M.P., House, S.A., Schwartz, C.L., Pham, J.K., Cipriano, M.J., De La Torre, M.J., Sek, A.C., Du, G., Forsythe, B.M., Dawson, S.C., 2011. Novel structural components of the ventral disc and lateral crest in *Giardia intestinalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 5, 20.
  129. Halliez, M.C., Buret, A.G., 2013. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J Gastroenterol* 19, 8974-8985.
  130. Halliez, M.C., Motta, J.P., Feener, T.D., Guerin, G., LeGoff, L., Francois, A., Colasse, E., Favennec, L., Gargala, G., Lapointe, T.K., Altier, C., Buret, A.G., 2016. *Giardia duodenalis* induces paracellular bacterial translocation and causes postinfectious visceral hypersensitivity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 310, 7.
  131. Hanevik, K., Kristoffersen, E., Morch, K., Rye, K.P., Sornes, S., Svard, S., Bruserud, O., Langeland, N., 2017. *Giardia*-specific cellular immune responses in post-giardiasis chronic fatigue syndrome. *BMC Immunol* 18, 017-0190.
  132. Haque, R., Roy, S., Kabir, M., Stroup, S.E., Mondal, D., Houpt, E.R., 2005. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis* 192, 2171-2173.
  133. Hardin, W.R., Li, R., Xu, J., Shelton, A.M., Alas, G.C.M., Minin, V.N., Paredez, A.R., 2017. Myosin-independent cytokinesis in *Giardia* utilizes flagella to coordinate force generation and direct membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 5, 1705096114.
  134. Harhaj, N.S., Antonetti, D.A., 2004. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1206-1237.
  135. Harris, J.C., Plummer, S., Lloyd, D., 2001. Antigiardial drugs. *Appl Microbiol Biotechnol* 57, 614-619.
  136. Hausen, M.A., Freitas, J.C., Jr., Monteiro-Leal, L.H., 2006. The effects of metronidazole and furazolidone during *Giardia* differentiation into cysts. *Exp Parasitol* 113, 135-141.
  137. Hein, L., Ishii, K., Coughlin, S.R., Kobilka, B.K., 1994. Intracellular targeting and trafficking of thrombin receptors. A novel mechanism for resensitization of a G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 269, 27719-27726.
  138. Helmy, M.M., Abdel-Fattah, H.S., Rashed, L., 2009. Real-time PCR/RFLP assay to detect *Giardia intestinalis* genotypes in human isolates with diarrhea in Egypt. *J Parasitol* 95, 1000-1004.

139. Hernandez-Sanchez, J., Linan, R.F., Salinas-Tobon Mdel, R., Ortega-Pierres, G., 2008. *Giardia duodenalis*: adhesion-deficient clones have reduced ability to establish infection in Mongolian gerbils. *Exp Parasitol* 119, 364-372.
140. Heyworth, M.F., 1992. Relative susceptibility of *Giardia muris* trophozoites to killing by mouse antibodies of different isotypes. *J Parasitol* 78, 73-76.
141. Hill, D.R., 1993. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. *Infect Dis Clin North Am* 7, 503-525.
142. Holberton, D.V., 1973. Mechanism of attachment of *Giardia* to the wall of the small intestine. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 67, 29-30.
143. Homan, W.L., Mank, T.G., 2001. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol* 31, 822-826.
144. Hopkins, A.M., Li, D., Mrsny, R.J., Walsh, S.V., Nusrat, A., 2000. Modulation of tight junction function by G protein-coupled events. *Adv Drug Deliv Rev* 41, 329-340.
145. Hopkins, A.M., Walsh, S.V., Verkade, P., Boquet, P., Nusrat, A., 2003. Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function. *J Cell Sci* 116, 725-742.
146. House, S.A., Richter, D.J., Pham, J.K., Dawson, S.C., 2011. *Giardia* flagellar motility is not directly required to maintain attachment to surfaces. *PLoS Pathog* 7, 4.
147. Humen, M.A., Perez, P.F., Lievin-Le Moal, V., 2011. Lipid raft-dependent adhesion of *Giardia intestinalis* trophozoites to a cultured human enterocyte-like Caco-2/TC7 cell monolayer leads to cytoskeleton-dependent functional injuries. *Cell Microbiol* 13, 1683-1702.
148. Ishii, K., Hein, L., Kobilka, B., Coughlin, S.R., 1993. Kinetics of thrombin receptor cleavage on intact cells. Relation to signaling. *J Biol Chem* 268, 9780-9786.
149. Ivanov, A.I., McCall, I.C., Parkos, C.A., Nusrat, A., 2004. Role for actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol Biol Cell* 15, 2639-2651.
150. Iyer, L.M., Anantharaman, V., Wolf, M.Y., Aravind, L., 2008. Comparative genomics of transcription factors and chromatin proteins in parasitic protists and other eukaryotes. *Int J Parasitol* 38, 1-31.
151. Jarroll, E.L., Muller, P.J., Meyer, E.A., Morse, S.A., 1981. Lipid and carbohydrate metabolism of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 2, 187-196.
152. Jedelsky, P.L., Dolezal, P., Rada, P., Pyrih, J., Smid, O., Hrdy, I., Sedinova, M., Marcincikova, M., Voleman, L., Perry, A.J., Beltran, N.C., Lithgow, T., Tachezy, J., 2011. The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PLoS One* 6, 0017285.
153. Jenikova, G., Hruz, P., Andersson, M.K., Tejman-Yarden, N., Ferreira, P.C., Andersen, Y.S., Davids, B.J., Gillin, F.D., Svard, S.G., Curtiss, R., 3rd, Eckmann, L., 2011. Alpha1-giardin based live heterologous vaccine protects against *Giardia lamblia* infection in a murine model. *Vaccine* 29, 9529-9537.
154. Jerlstrom-Hultqvist, J., 2012. Hidden Diversity Revealed: Genomic, Transcriptomic and Functional Studies of Diplomonads. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 990 PhD, 104.
155. Jerlstrom-Hultqvist, J., Stadelmann, B., Birkestet, S., Hellman, U., Svard, S.G., 2012. Plasmid vectors for proteomic analyses in *Giardia*: purification of virulence factors and analysis of the proteasome. *Eukaryot Cell* 11, 864-873.

156. Jimenez-Cardoso, E., Eligio-Garcia, L., Cortes-Campos, A., Flores-Luna, A., Valencia-Mayoral, P., Lozada-Chavez, I., 2009. Changes in beta-giardin sequence of *Giardia intestinalis* sensitive and resistant to albendazole strains. *Parasitol Res* 105, 25-33.
157. Jimenez-Garcia, L.F., Zavala, G., Chavez-Munguia, B., Ramos-Godinez Mdel, P., Lopez-Velazquez, G., Segura-Valdez Mde, L., Montanez, C., Hehl, A.B., Arguello-Garcia, R., Ortega-Pierres, G., 2008. Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. *Int J Parasitol* 38, 1297-1304.
158. Jimenez, J.C., Fontaine, J., Grzych, J.M., Capron, M., Dei-Cas, E., 2009. Antibody and cytokine responses in BALB/c mice immunized with the excreted/secreted proteins of *Giardia intestinalis*: the role of cysteine proteases. *Ann Trop Med Parasitol* 103, 693-703.
159. Jimenez, J.C., Uzcanga, G., Zambrano, A., Di Prisco, M.C., Lynch, N.R., 2000. Identification and partial characterization of excretory/secretory products with proteolytic activity in *Giardia intestinalis*. *J Parasitol* 86, 859-862.
160. Jirakova, K., Kulda, J., Nohynkova, E., 2012. How nuclei of *Giardia* pass through cell differentiation: semi-open mitosis followed by nuclear interconnection. *Protist* 163, 465-479.
161. Johnston, S.P., Ballard, M.M., Beach, M.J., Causer, L., Wilkins, P.P., 2003. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 41, 623-626.
162. Kajikawa, H., Yoshida, N., Katada, K., Hirayama, F., Handa, O., Kokura, S., Naito, Y., Yoshikawa, T., 2007. *Helicobacter pylori* activates gastric epithelial cells to produce interleukin-8 via protease-activated receptor 2. *Digestion* 76, 248-255.
163. Kamikawa, R., Inagaki, Y., Tokoro, M., Roger, A.J., Hashimoto, T., 2011. Split introns in the genome of *Giardia intestinalis* are excised by spliceosome-mediated trans-splicing. *Curr Biol* 21, 311-315.
164. Karanis, P., Ey, P.L., 1998. Characterization of axenic isolates of *Giardia intestinalis* established from humans and animals in Germany. *Parasitol Res* 84, 442-449.
165. Karanis, P., Kourenti, C., Smith, H., 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health* 5, 1-38.
166. Karr, C.D., Jarroll, E.L., 2004. Cyst wall synthase: N-acetylgalactosaminyltransferase activity is induced to form the novel N-acetylgalactosamine polysaccharide in the *Giardia* cyst wall. *Microbiology* 150, 1237-1243.
167. Keister, D.B., 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77, 487-488.
168. Keselman, A., Li, E., Maloney, J., Singer, S.M., 2016. The Microbiota Contributes to CD8+ T Cell Activation and Nutrient Malabsorption following Intestinal Infection with *Giardia duodenalis*. *Infect Immun* 84, 2853-2860.
169. Kim, W.J., Korthals, K.A., Li, S., Le, C., Kalisiak, J., Sharpless, K.B., Fokin, V.V., Miyamoto, Y., Eckmann, L., 2017. Click Chemistry-Facilitated Structural Diversification of Nitrothiazoles, Nitrofurans, and Nitropyrroles Enhances Antimicrobial Activity against *Giardia lamblia*. *Antimicrob Agents Chemother* 61, 02397-02316.
170. Koehler, A.V., Jex, A.R., Haydon, S.R., Stevens, M.A., Gasser, R.B., 2014. *Giardia/giardiasis* - a perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnol Adv* 32, 280-289.

171. Koh, W.H., Geurden, T., Paget, T., O'Handley, R., Steuart, R.F., Thompson, R.C., Buret, A.G., 2013. *Giardia duodenalis* assemblage-specific induction of apoptosis and tight junction disruption in human intestinal epithelial cells: effects of mixed infections. *J Parasitol* 99, 353-358.
172. Konrad, C., Spycher, C., Hehl, A.B., 2010. Selective condensation drives partitioning and sequential secretion of cyst wall proteins in differentiating *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog* 6, 1000835.
173. Kraft, M.R., Klotz, C., Bücker, R., Schulzke, J.-D., Aebischer, T., 2017. *Giardia's* Epithelial Cell Interaction In Vitro: Mimicking Asymptomatic Infection? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7.
174. Kreutner, A.K., Del Bene, V.E., Amstey, M.S., 1981. Giardiasis in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 140, 895-901.
175. Kulakova, L., Galkin, A., Chen, C.Z., Southall, N., Marugan, J.J., Zheng, W., Herzberg, O., 2014. Discovery of Novel Antigiardiasis Drug Candidates. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 7303-7311.
176. Kulakova, L., Singer, S.M., Conrad, J., Nash, T.E., 2006. Epigenetic mechanisms are involved in the control of *Giardia lamblia* antigenic variation. *Mol Microbiol* 61, 1533-1542.
177. Laishram, S., Kang, G., Ajjampur, S.S., 2012. Giardiasis: a review on assemblage distribution and epidemiology in India. *Indian J Gastroenterol* 31, 3-12.
178. Lalle, M., Jimenez-Cardosa, E., Caccio, S.M., Pozio, E., 2005. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. *J Parasitol* 91, 203-205.
179. Lambert, D., O'Neill, C.A., Padfield, P.J., 2005. Depletion of Caco-2 cell cholesterol disrupts barrier function by altering the detergent solubility and distribution of specific tight-junction proteins. *Biochem J* 387, 553-560.
180. Lanfredi-Rangel, A., Diniz, J.A., Jr., de Souza, W., 1999. Presence of a protrusion on the ventral disk of adhered trophozoites of *Giardia lamblia*. *Parasitol Res* 85, 951-955.
181. Langford, T.D., Housley, M.P., Boes, M., Chen, J., Kagnoff, M.F., Gillin, F.D., Eckmann, L., 2002. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect Immun* 70, 11-18.
182. Laoworawit, P., Lee, C.S., O'Sullivan, W.J., 1993. Deoxynucleoside kinases of *Giardia intestinalis*. *Mol Biochem Parasitol* 60, 37-44.
183. Lasek-Nesselquist, E., Welch, D.M., Thompson, R.C., Steuart, R.F., Sogin, M.L., 2009. Genetic exchange within and between assemblages of *Giardia duodenalis*. *J Eukaryot Microbiol* 56, 504-518.
184. Laude, A., Valot, S., Desoubieux, G., Argy, N., Nourrisson, C., Pomares, C., Machouart, M., Le Govic, Y., Dalle, F., Botterel, F., Bourgeois, N., Cateau, E., Leterrier, M., Le Pape, P., Morio, F., 2016. Is real-time PCR-based diagnosis similar in performance to routine parasitological examination for the identification of *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*/*Cryptosporidium hominis* and *Entamoeba histolytica* from stool samples? Evaluation of a new commercial multiplex PCR assay and literature review. *Clin Microbiol Infect* 22, 6.
185. Lauwaet, T., Davids, B.J., Reiner, D.S., Gillin, F.D., 2007. Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Curr Opin Microbiol* 10, 554-559.
186. Lebbad, M., Ankarklev, J., Tellez, A., Leiva, B., Andersson, J.O., Svard, S., 2008. Dominance of *Giardia* assemblage B in Leon, Nicaragua. *Acta Trop* 106, 44-53.

187. Lebbad, M., Mattsson, J.G., Christensson, B., Ljungstrom, B., Backhans, A., Andersson, J.O., Svard, S.G., 2010. From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Vet Parasitol* 168, 231-239.
188. Lebbad, M., Petersson, I., Karlsson, L., Botero-Kleiven, S., Andersson, J.O., Svenungsson, B., Svard, S.G., 2011a. Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. *PLoS Negl Trop Dis* 5, 2.
189. Lebbad, M., Petersson, I., Karlsson, L., Botero-Kleiven, S., Andersson, J.O., Svenungsson, B., Svard, S.G., 2011b. Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1262.
190. Lee, M.F., Auer, H., Lindo, J.F., Walochnik, J., 2017a. Multilocus sequence analysis of *Giardia* spp. isolated from patients with diarrhea in Austria. *Parasitol Res* 116, 477-481.
191. Lee, M.F., Cadogan, P., Eytel, S., Copeland, S., Walochnik, J., Lindo, J.F., 2017b. Molecular epidemiology and multilocus sequence analysis of potentially zoonotic *Giardia* spp. from humans and dogs in Jamaica. *Parasitol Res* 116, 409-414.
192. Lee, P., Abdul-Wahid, A., Faubert, G.M., 2009. Comparison of the local immune response against *Giardia lamblia* cyst wall protein 2 induced by recombinant *Lactococcus lactis* and *Streptococcus gordonii*. *Microbes Infect* 11, 20-28.
193. Leitsch, D., 2015. Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. *Curr Trop Med Rep* 2, 128-135.
194. Leitsch, D., Burgess, A.G., Dunn, L.A., Krauer, K.G., Tan, K., Duchene, M., Upcroft, P., Eckmann, L., Upcroft, J.A., 2011. Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thioredoxin reductase are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-nitroimidazole resistance in *Giardia lamblia*. *J Antimicrob Chemother* 66, 1756-1765.
195. Leitsch, D., Muller, J., Muller, N., 2016. Evaluation of *Giardia lamblia* thioredoxin reductase as drug activating enzyme and as drug target. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 6, 148-153.
196. Li, E., Zhao, A., Shea-Donohue, T., Singer, S.M., 2007. Mast cell-mediated changes in smooth muscle contractility during mouse giardiasis. *Infect Immun* 75, 4514-4518.
197. Li, L., Wang, C.C., 2005. Identification in the ancient protist *Giardia lamblia* of two eukaryotic translation initiation factor 4E homologues with distinctive functions. *Eukaryot Cell* 4, 948-959.
198. Li, W., Saraiya, A.A., Wang, C.C., 2013. Experimental verification of the identity of variant-specific surface proteins in *Giardia lamblia* trophozoites. *MBio* 4, 00321-00313.
199. Lievin-Le Moal, V., 2013. Dysfunctions at human intestinal barrier by water-borne protozoan parasites: lessons from cultured human fully differentiated colon cancer cell lines. *Cell Microbiol* 15, 860-869.
200. Lockwood, B.C., North, M.J., Scott, K.I., Bremner, A.F., Coombs, G.H., 1987. The use of a highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. *Mol Biochem Parasitol* 24, 89-95.
201. Lopez-Romero, G., Garzon, T., Rascon, R., Valdez, A., Quintero, J., Arvizu-Flores, A.A., Garibay-Escobar, A., Rascon, L., Astiazaran-Garcia, H., Velazquez, C., 2017.

- Characterization of BIP protein of *G. lamblia* as a potential immunogen in a mouse infection model. *Immunobiology* 222, 884-891.
202. Lujan, H.D., Mowatt, M.R., Wu, J.J., Lu, Y., Lees, A., Chance, M.R., Nash, T.E., 1995. Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. *J Biol Chem* 270, 13807-13813.
  203. Lujan, H.D., Svärd, S., 2011. *Giardia: A Model Organism*. Springer Vienna.
  204. Ma'ayeh, S.Y., Brook-Carter, P.T., 2012. Representational difference analysis identifies specific genes in the interaction of *Giardia duodenalis* with the murine intestinal epithelial cell line, IEC-6. *Int J Parasitol* 42, 501-509.
  205. Macfarlane, S.R., Seatter, M.J., Kanke, T., Hunter, G.D., Plevin, R., 2001. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53, 245-282.
  206. Magne, D., Favennec, L., Chochillon, C., Gorenflot, A., Meillet, D., Kapel, N., Raichvarg, D., Savel, J., Gobert, J.G., 1991. Role of cytoskeleton and surface lectins in *Giardia duodenalis* attachment to Caco2 cells. *Parasitol Res* 77, 659-662.
  207. Maia-Brigagao, C., Morgado-Diaz, J.A., De Souza, W., 2012. *Giardia* disrupts the arrangement of tight, adherens and desmosomal junction proteins of intestinal cells. *Parasitol Int* 61, 280-287.
  208. Manko, A., Motta, J.P., Cotton, J.A., Feener, T., Oyeyemi, A., Vallance, B.A., Wallace, J.L., Buret, A.G., 2017. *Giardia* co-infection promotes the secretion of antimicrobial peptides beta-defensin 2 and trefoil factor 3 and attenuates attaching and effacing bacteria-induced intestinal disease. *PLoS One* 12.
  209. Martinova, E., Voleman, L., Pyrih, J., Zarsky, V., Vondrackova, P., Kolisko, M., Tachezy, J., Dolezal, P., 2015. Probing the Biology of *Giardia intestinalis* Mitosomes Using In Vivo Enzymatic Tagging. *Mol Cell Biol* 35, 2864-2874.
  210. Mastronicola, D., Falabella, M., Forte, E., Testa, F., Sarti, P., Giuffre, A., 2016. Antioxidant defence systems in the protozoan pathogen *Giardia intestinalis*. *Mol Biochem Parasitol* 206, 56-66.
  211. Mastronicola, D., Giuffre, A., Testa, F., Mura, A., Forte, E., Bordi, E., Pucillo, L.P., Fiori, P.L., Sarti, P., 2011. *Giardia intestinalis* escapes oxidative stress by colonizing the small intestine: A molecular hypothesis. *IUBMB Life* 63, 21-25.
  212. Matadamas-Martinez, F., Castillo, R., Hernandez-Campos, A., Mendez-Cuesta, C., de Souza, W., Gadelha, A.P., Nogueira-Torres, B., Hernandez, J.M., Yopez-Mulia, L., 2016. Proteomic and ultrastructural analysis of the effect of a new nitazoxanide-N-methyl-1H-benzimidazole hybrid against *Giardia intestinalis*. *Res Vet Sci* 105, 171-179.
  213. McCabe, R.E., Yu, G.S., Contreas, C., Morrill, P.R., McMorro, B., 1991. In vitro model of attachment of *Giardia intestinalis* trophozoites to IEC-6 cells, an intestinal cell line. *Antimicrob Agents Chemother* 35, 29-35.
  214. McHardy, I.H., Wu, M., Shimizu-Cohen, R., Couturier, M.R., Humphries, R.M., 2014. Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 52, 712-720.
  215. Medigeshi, G.R., Hirsch, A.J., Brien, J.D., Uhrlaub, J.L., Mason, P.W., Wiley, C., Nikolich-Zugich, J., Nelson, J.A., 2009. West Nile virus capsid degradation of claudin proteins disrupts epithelial barrier function. *Journal of virology* 83, 6125-6134.
  216. Meltzer, E., Lachish, T., Schwartz, E., 2014. Treatment of giardiasis after nonresponse to nitroimidazole. *Emerg Infect Dis* 20, 1742-1744.

217. Midlej, V., Benchimol, M., 2009. *Giardia lamblia* behavior during encystment: how morphological changes in shape occur. *Parasitol Int* 58, 72-80.
218. Minvielle, M.C., Molina, N.B., Polverino, D., Basualdo, J.A., 2008. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103, 98-103.
219. Mitic, L.L., Van Itallie, C.M., Anderson, J.M., 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G250-254.
220. Miyamoto, Y., Kalisiak, J., Korthals, K., Lauwaet, T., Cheung, D.Y., Lozano, R., Cobo, E.R., Upcroft, P., Upcroft, J.A., Berg, D.E., Gillin, F.D., Fokin, V.V., Sharpless, K.B., Eckmann, L., 2013. Expanded therapeutic potential in activity space of next-generation 5-nitroimidazole antimicrobials with broad structural diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 17564-17569.
221. Mohammed Mahdy, A.K., Surin, J., Wan, K.L., Mohd-Adnan, A., Al-Mekhlafi, M.S., Lim, Y.A., 2009. *Giardia intestinalis* genotypes: Risk factors and correlation with clinical symptoms. *Acta Trop* 112, 67-70.
222. Molling, P., Nilsson, P., Ennefors, T., Ogren, J., Floren, K., Thulin Hedberg, S., Sundqvist, M., 2016. Evaluation of the BD Max Enteric Parasite Panel for Clinical Diagnostics. *J Clin Microbiol* 54, 443-444.
223. Monis, P.T., Caccio, S.M., Thompson, R.C., 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol* 25, 93-100.
224. Mooseker, M.S., 1985. Organization, chemistry, and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border. *Annu Rev Cell Biol* 1, 209-241.
225. Morf, L., Spycher, C., Rehrauer, H., Fournier, C.A., Morrison, H.G., Hehl, A.B., 2010. The transcriptional response to encystation stimuli in *Giardia lamblia* is restricted to a small set of genes. *Eukaryot Cell* 9, 1566-1576.
226. Morrison, H.G., McArthur, A.G., Gillin, F.D., Aley, S.B., Adam, R.D., Olsen, G.J., Best, A.A., Cande, W.Z., Chen, F., Cipriano, M.J., Davids, B.J., Dawson, S.C., Elmendorf, H.G., Hehl, A.B., Holder, M.E., Huse, S.M., Kim, U.U., Lasek-Nesselquist, E., Manning, G., Nigam, A., Nixon, J.E., Palm, D., Passamaneck, N.E., Prabhu, A., Reich, C.I., Reiner, D.S., Samuelson, J., Svard, S.G., Sogin, M.L., 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* 317, 1921-1926.
227. Mowatt, M.R., Aggarwal, A., Nash, T.E., 1991. Carboxy-terminal sequence conservation among variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 49, 215-227.
228. Muller, J., Ley, S., Felger, I., Hemphill, A., Muller, N., 2008. Identification of differentially expressed genes in a *Giardia lamblia* WB C6 clone resistant to nitazoxanide and metronidazole. *J Antimicrob Chemother* 62, 72-82.
229. Muller, J., Ruhle, G., Muller, N., Rossignol, J.F., Hemphill, A., 2006. In vitro effects of thiazolidines on *Giardia lamblia* WB clone C6 cultured axenically and in coculture with Caco2 cells. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 162-170.
230. Muller, J., Schildknecht, P., Muller, N., 2013. Metabolism of nitro drugs metronidazole and nitazoxanide in *Giardia lamblia*: characterization of a novel nitroreductase (GlnR2). *J Antimicrob Chemother* 68, 1781-1789.

231. Muller, J., Sterk, M., Hemphill, A., Muller, N., 2007. Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. *J Antimicrob Chemother* 60, 280-287.
232. Muller, N., von Allmen, N., 2005. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int J Parasitol* 35, 1339-1347.
233. Nash, T., 1992. Surface antigen variability and variation in *Giardia lamblia*. *Parasitol Today* 8, 229-234.
234. Nash, T.E., 1997. Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352, 1369-1375.
235. Nash, T.E., Aggarwal, A., Adam, R.D., Conrad, J.T., Merritt, J.W., Jr., 1988. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *J Immunol* 141, 636-641.
236. Nash, T.E., Gillin, F.D., Smith, P.D., 1983. Excretory-secretory products of *Giardia lamblia*. *J Immunol* 131, 2004-2010.
237. Nash, T.E., Herrington, D.A., Losonsky, G.A., Levine, M.M., 1987. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J Infect Dis* 156, 974-984.
238. Nash, T.E., Lujan, H.T., Mowatt, M.R., Conrad, J.T., 2001. Variant-specific surface protein switching in *Giardia lamblia*. *Infect Immun* 69, 1922-1923.
239. Nash, T.E., Mowatt, M.R., 1993. Variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia* are zinc-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5489-5493.
240. Navarrete-Vazquez, G., Yopez, L., Hernandez-Campos, A., Tapia, A., Hernandez-Luis, F., Cedillo, R., Gonzalez, J., Martinez-Fernandez, A., Martinez-Grueiro, M., Castillo, R., 2003. Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues. *Bioorg Med Chem* 11, 4615-4622.
241. Ng, C.T., Gilchrist, C.A., Lane, A., Roy, S., Haque, R., Houpt, E.R., 2005. Multiplex real-time PCR assay using Scorpion probes and DNA capture for genotype-specific detection of *Giardia lamblia* on fecal samples. *J Clin Microbiol* 43, 1256-1260.
242. Nillius, D., Muller, J., Muller, N., 2011. Nitroreductase (GINR1) increases susceptibility of *Giardia lamblia* and *Escherichia coli* to nitro drugs. *J Antimicrob Chemother* 66, 1029-1035.
243. Nohria, A., Alonso, R.A., Peattie, D.A., 1992. Identification and characterization of gamma-giardin and the gamma-giardin gene from *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 56, 27-37.
244. O'Hara, J.R., Buret, A.G., 2008. Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection. *Front Biosci* 13, 7008-7021.
245. Olson B, O.M.y.W.P., 2002. *Giardia* the cosmopolitan parasite. CABI Publishing, 3-13, 15-27, 109-120, 139-151, 159-170, 187-188, 194-197.
246. Olson, M.E., Morck, D.W., Ceri, H., 1996. The efficacy of a *Giardia lamblia* vaccine in kittens. *Can J Vet Res* 60, 249-256.
247. Ossovskaya, V.S., Bunnett, N.W., 2004. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 84, 579-621.
248. Pal, D., Banerjee, S., Cui, J., Schwartz, A., Ghosh, S.K., Samuelson, J., 2009. *Giardia*, *Entamoeba*, and *Trichomonas* enzymes activate metronidazole (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole reductases). *Antimicrob Agents Chemother* 53, 458-464.
249. Palm, D., Weiland, M., McArthur, A.G., Winiacka-Krusnell, J., Cipriano, M.J., Birkeland, S.R., Pacocha, S.E., Davids, B., Gillin, F., Linder, E., Svard, S., 2005.

- Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Mol Biochem Parasitol* 141, 199-207.
250. Palm, J.E., Weiland, M.E., Griffiths, W.J., Ljungstrom, I., Svard, S.G., 2003. Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. *J Infect Dis* 187, 1849-1859.
251. Palmer, C.S., Traub, R.J., Robertson, I.D., Devlin, G., Rees, R., Thompson, R.C., 2008. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Vet Parasitol* 154, 142-147.
252. Pallant, L., Barutzki, D., Schaper, R., Thompson, R.C., 2015. The epidemiology of infections with *Giardia* species and genotypes in well cared for dogs and cats in Germany. *Parasit Vectors* 8, 014-0615.
253. Panaro, M.A., Cianciulli, A., Mitolo, V., Mitolo, C.I., Acquafredda, A., Brandonisio, O., Cavallo, P., 2007. Caspase-dependent apoptosis of the HCT-8 epithelial cell line induced by the parasite *Giardia intestinalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51, 302-309.
254. Papanastasiou, P., Bruderer, T., Li, Y., Bommeli, C., Kohler, P., 1997a. Primary structure and biochemical properties of a variant-specific surface protein of *Giardia*. *Mol Biochem Parasitol* 86, 13-27.
255. Papanastasiou, P., Hiltbold, A., Bommeli, C., Kohler, P., 1996. The release of the variant surface protein of *Giardia* to its soluble isoform is mediated by the selective cleavage of the conserved carboxy-terminal domain. *Biochemistry* 35, 10143-10148.
256. Papanastasiou, P., McConville, M.J., Ralton, J., Kohler, P., 1997b. The variant-specific surface protein of *Giardia*, VSP4A1, is a glycosylated and palmitoylated protein. *Biochem J* 322, 49-56.
257. Pavanelli, W.R., Gutierrez, F.R., Silva, J.J., Costa, I.C., Menezes, M.C., Oliveira, F.J., Itano, E.N., Watanabe, M.A., 2010. The effects of nitric oxide on the immune response during giardiasis. *Braz J Infect Dis* 14, 606-612.
258. Paz-Maldonado, M.T., Arguello-Garcia, R., Cruz-Soto, M., Mendoza-Hernandez, G., Ortega-Pierres, G., 2013. Proteomic and transcriptional analyses of genes differentially expressed in *Giardia duodenalis* clones resistant to albendazole. *Infect Genet Evol* 15, 10-17.
259. Peixoto, E.B., Collares-Buzato, C.B., 2005. Protamine-induced epithelial barrier disruption involves rearrangement of cytoskeleton and decreased tight junction-associated protein expression in cultured MDCK strains. *Cell Struct Funct* 29, 165-178.
260. Peterson, M.D., Mooseker, M.S., 1992. Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2BBE clones of the human intestinal cell line, Caco-2. *J Cell Sci* 102, 581-600.
261. Piekarska, J., Bajzert, J., Gorczykowski, M., Kantyka, M., Podkowik, M., 2016. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from domestic dogs and cats in Wroclaw, Poland. *Ann Agric Environ Med* 23, 410-415.
262. Pimenta, P.F., da Silva, P.P., Nash, T., 1991. Variant surface antigens of *Giardia lamblia* are associated with the presence of a thick cell coat: thin section and label fracture immunocytochemistry survey. *Infect Immun* 59, 3989-3996.
263. Piva, B., Benchimol, M., 2004. The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biol Cell* 96, 735-746.

264. Plutzer, J., Ongerth, J., Karanis, P., 2010. Giardia taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *Int J Hyg Environ Health* 213, 321-333.
265. Ponce-Macotella, M., Martínez-Gordillo, M.N., Bermudez-Cruz, R.M., Salazar-Schettino, P.M., Ortega-Pierres, G., Ey, P.L., Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. *Int J Parasitol.* 2002 Aug;32(9):1201-2.
266. Popoff, M.R., Geny, B., 2009. Multifaceted role of Rho, Rac, Cdc42 and Ras in intercellular junctions, lessons from toxins. *Biochim Biophys Acta* 4, 797-812.
267. Poxleitner, M.K., Carpenter, M.L., Mancuso, J.J., Wang, C.J., Dawson, S.C., Cande, W.Z., 2008. Evidence for karyogamy and exchange of genetic material in the binucleate intestinal parasite *Giardia intestinalis*. *Science* 319, 1530-1533.
268. Prucca, C.G., Lujan, H.D., 2009. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cell Microbiol* 11, 1706-1715.
269. Prucca, C.G., Slavin, I., Quiroga, R., Elias, E.V., Rivero, F.D., Saura, A., Carranza, P.G., Lujan, H.D., 2008. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature* 456, 750-754.
270. Quaroni, A., Wands, J., Trelstad, R.L., Isselbacher, K.J., 1979. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol* 80, 248-265.
271. Quihui-Cota, L., Morales-Figueroa, G.G., 2012. Persistence of intestinal parasitic infections during the national de-worming campaign in schoolchildren of northwestern Mexico: a cross-sectional study. *Ann Gastroenterol* 25, 57-60.
272. Quintero, J., Valdez, A., Samaniego, B., Lopez-Romero, G., Astiazaran-Garcia, H., Rascon, L., Brecci, L., Garibay-Escobar, A., Robles-Zepeda, R., Velazquez, C., 2017. Isolation and partial characterization of an immunogenic antigen of *Giardia lamblia*. *Parasitol Int* 66, 324-330.
273. R., C., 2008. Advances in Diagnosis: is microscopy still the benchmark?
274. Radunovic, M., Klotz, C., Saghaug, C.S., Brattbakk, H.R., Aebischer, T., Langeland, N., Hanevik, K., 2017. Genetic variation in potential *Giardia* vaccine candidates cyst wall protein 2 and alpha1-giardin. *Parasitol Res* 3, 017-5516.
275. Rafferty, S., Luu, B., March, R.E., Yee, J., 2010. *Giardia lamblia* encodes a functional flavohemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun* 399, 347-351.
276. Ramesh, M.A., Malik, S.B., Logsdon, J.M., Jr., 2005. A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Curr Biol* 15, 185-191.
277. Ratner, D.M., Cui, J., Steffen, M., Moore, L.L., Robbins, P.W., Samuelson, J., 2008. Changes in the N-glycome, glycoproteins with Asn-linked glycans, of *Giardia lamblia* with differentiation from trophozoites to cysts. *Eukaryot Cell* 7, 1930-1940.
278. Read, C., Walters, J., Robertson, I.D., Thompson, R.C., Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol.* 2002 Feb;32(2):229-31.
279. Regoes, A., Zourmanou, D., Leon-Avila, G., van der Giezen, M., Tovar, J., Hehl, A.B., 2005. Protein import, replication, and inheritance of a vestigial mitochondrion. *J Biol Chem* 280, 30557-30563.
280. Reiner, D.S., Ankarklev, J., Troell, K., Palm, D., Bernander, R., Gillin, F.D., Andersson, J.O., Svard, S.G., 2008. Synchronisation of *Giardia lamblia*: identification of cell cycle stage-specific genes and a differentiation restriction point. *Int J Parasitol* 38, 935-944.

281. Reiner, D.S., McCaffery, J.M., Gillin, F.D., 2001. Reversible interruption of *Giardia lamblia* cyst wall protein transport in a novel regulated secretory pathway. *Cell Microbiol* 3, 459-472.
282. Rendtorff, R.C., Holt, C.J., 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. IV. Attempts to transmit *Endamoeba coli* and *Giardia lamblia* cysts by water. *Am J Hyg* 60, 327-338.
283. Requena-Mendez, A., Goni, P., Rubio, E., Pou, D., Fumado, V., Lobez, S., Aldasoro, E., Cabezos, J., Valls, M.E., Trevino, B., Martinez Montseny, A.F., Clavel, A., Gascon, J., Munoz, J., 2017. The Use of Quinacrine in Nitroimidazole-resistant *Giardia Duodenalis*: An Old Drug for an Emerging Problem. *J Infect Dis* 215, 946-953.
284. Reynoso-Robles, R., Ponce-Macotela, M., Rosas-López, L.E., Ramos-Morales, A., Martínez-Gordillo, M.N., González-Maciél, A., 2015. The invasive potential of *Giardia intestinalis* in an in vivo model. *Scientific Reports* 5, 15168.
285. Ringqvist, E., Avesson, L., Soderbom, F., Svard, S.G., 2011. Transcriptional changes in *Giardia* during host-parasite interactions. *Int J Parasitol* 41, 277-285.
286. Ringqvist, E., Palm, J.E., Skarin, H., Hehl, A.B., Weiland, M., Davids, B.J., Reiner, D.S., Griffiths, W.J., Eckmann, L., Gillin, F.D., Svard, S.G., 2008. Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Mol Biochem Parasitol* 159, 85-91.
287. Rivero, F.D., Saura, A., Prucca, C.G., Carranza, P.G., Torri, A., Lujan, H.D., 2010. Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine. *Nat Med* 16, 551-557.
288. Rodriguez-Fuentes, G.B., Cedillo-Rivera, R., Fonseca-Linan, R., Arguello-Garcia, R., Munoz, O., Ortega-Pierres, G., Yopez-Mulia, L., 2006. *Giardia duodenalis*: analysis of secreted proteases upon trophozoite-epithelial cell interaction in vitro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101, 693-696.
289. Ross, A.G., Olds, G.R., Cripps, A.W., Farrar, J.J., McManus, D.P., 2013. Enteropathogens and chronic illness in returning travelers. *N Engl J Med* 368, 1817-1825.
290. Roxstrom-Lindquist, K., Palm, D., Reiner, D., Ringqvist, E., Svard, S.G., 2006. *Giardia* immunity--an update. *Trends Parasitol* 22, 26-31.
291. Roxstrom-Lindquist, K., Ringqvist, E., Palm, D., Svard, S., 2005. *Giardia lamblia*-induced changes in gene expression in differentiated Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 73, 8204-8208.
292. Roy, S.W., Hudson, A.J., Joseph, J., Yee, J., Russell, A.G., 2012. Numerous fragmented spliceosomal introns, AT-AC splicing, and an unusual dynein gene expression pathway in *Giardia lamblia*. *Mol Biol Evol* 29, 43-49.
293. Ryan, U., Caccio, S.M., 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int J Parasitol* 43, 943-956.
294. Saghaug, C.S., Sornes, S., Peirasmaki, D., Svard, S., Langeland, N., Hanevik, K., 2015. Human Memory CD4+ T Cell Immune Responses against *Giardia lamblia*. *Clin Vaccine Immunol* 23, 11-18.
295. Sahagun, J., Clavel, A., Goni, P., Seral, C., Llorente, M.T., Castillo, F.J., Capilla, S., Arias, A., Gomez-Lus, R., 2008. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27, 81-83.

296. Said, D.E., Elsamad, L.M., Gohar, Y.M., 2012. Validity of silver, chitosan, and curcumin nanoparticles as anti-Giardia agents. *Parasitol Res* 111, 545-554.
297. Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stammati, A., Zucco, F., 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 21, 1-26.
298. Saraiya, A.A., Li, W., Wu, J., Chang, C.H., Wang, C.C., 2014a. The microRNAs in an Ancient Protist Repress the Variant-Specific Surface Protein Expression by Targeting the Entire Coding Sequence. *PLoS Pathogens* 10, e1003791.
299. Saraiya, A.A., Li, W., Wu, J., Chang, C.H., Wang, C.C., 2014b. The microRNAs in an ancient protist repress the variant-specific surface protein expression by targeting the entire coding sequence. *PLoS Pathog* 10.
300. Saraiya, A.A., Wang, C.C., 2008. snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog* 4, 28.
301. Scott, K.G., Meddings, J.B., Kirk, D.R., Lees-Miller, S.P., Buret, A.G., 2002. Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterology* 123, 1179-1190.
302. Scott, K.G., Yu, L.C., Buret, A.G., 2004. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect Immun* 72, 3536-3542.
303. Schmidlin, F., Bunnett, N.W., 2001. Protease-activated receptors: how proteases signal to cells. *Curr Opin Pharmacol* 1, 575-582.
304. Schofield, P.J., Costello, M., Edwards, M.R., O'Sullivan, W.J., 1990. The arginine dihydrolase pathway is present in *Giardia intestinalis*. *Int J Parasitol* 20, 697-699.
305. Schofield, P.J., Edwards, M.R., Kranz, P., 1991. Glucose metabolism in *Giardia intestinalis*. *Mol Biochem Parasitol* 45, 39-47.
306. Schofield, P.J., Edwards, M.R., Matthews, J., Wilson, J.R., 1992. The pathway of arginine catabolism in *Giardia intestinalis*. *Mol Biochem Parasitol* 51, 29-36.
307. Sekiguchi, F., Matsumoto, Y., Maeda, Y., Tsubota-Matsunami, M., Nishikawa, H., Kawabata, A., 2012. Biological activity of *Helicobacter pylori* components in mammalian cells: is it independent of proteinase-activated receptors? *J Physiol Pharmacol* 63, 571-576.
308. Shan, J., Oshima, T., Chen, X., Fukui, H., Watari, J., Miwa, H., 2012. Trypsin impaired epithelial barrier function and induced IL-8 secretion through basolateral PAR-2: a lesson from a stratified squamous epithelial model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303, 20.
309. Shant, J., Bhattacharyya, S., Ghosh, S., Ganguly, N.K., Majumdar, S., 2002. A potentially important excretory-secretory product of *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol* 102, 178-186.
310. Singer, S.M., Elmendorf, H.G., Conrad, J.T., Nash, T.E., 2001. Biological selection of variant-specific surface proteins in *Giardia lamblia*. *J Infect Dis* 183, 119-124.
311. Singer, S.M., Nash, T.E., 2000a. The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. *J Infect Dis* 181, 1510-1512.
312. Singer, S.M., Nash, T.E., 2000b. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun* 68, 170-175.
313. Siripattanapibong, S., Leelayoova, S., Mungthin, M., Thompson, R.C., Boontanom, P., Saksirisamphant, W., Tan-Ariya, P., 2011. Determination of discriminatory power of

- genetic markers used for genotyping *Giardia duodenalis*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 42, 764-771.
314. Slavin, I., Saura, A., Carranza, P.G., Touz, M.C., Nores, M.J., Lujan, H.D., 2002. Dephosphorylation of cyst wall proteins by a secreted lysosomal acid phosphatase is essential for excystation of *Giardia lamblia*. Mol Biochem Parasitol 122, 95-98.
  315. Soares, R., Tasca, T., 2016. Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. J Microbiol Methods 129, 98-102.
  316. Solaymani-Mohammadi, S., Singer, S.M., 2011. Host immunity and pathogen strain contribute to intestinal disaccharidase impairment following gut infection. J Immunol 187, 3769-3775.
  317. Solaymani-Mohammadi, S., Singer, S.M., 2013. Regulation of intestinal epithelial cell cytoskeletal remodeling by cellular immunity following gut infection. Mucosal Immunol 6, 369-378.
  318. Sonda, S., Morf, L., Bottova, I., Baetschmann, H., Rehrauer, H., Caflisch, A., Hakimi, M.A., Hehl, A.B., 2010. Epigenetic mechanisms regulate stage differentiation in the minimized protozoan *Giardia lamblia*. Mol Microbiol 76, 48-67.
  319. Sonda, S., Stefanic, S., Hehl, A.B., 2008. A sphingolipid inhibitor induces a cytokinesis arrest and blocks stage differentiation in *Giardia lamblia*. Antimicrob Agents Chemother 52, 563-569.
  320. Stadelmann, B., Merino, M.C., Persson, L., Svard, S.G., 2012a. Arginine consumption by the intestinal parasite *Giardia intestinalis* reduces proliferation of intestinal epithelial cells. PLoS One 7, e45325.
  321. Stadelmann, B., Merino, M.C., Persson, L., Svard, S.G., 2012b. Arginine consumption by the intestinal parasite *Giardia intestinalis* reduces proliferation of intestinal epithelial cells. PLoS One 7, 19.
  322. Stefanic, S., Morf, L., Kulangara, C., Regos, A., Sonda, S., Schraner, E., Spycher, C., Wild, P., Hehl, A.B., 2009. Neogenesis and maturation of transient Golgi-like cisternae in a simple eukaryote. J Cell Sci 122, 2846-2856.
  323. Sun, J., Jiang, H., Flores, R., Wen, J., 2010. Gene duplication in the genome of parasitic *Giardia lamblia*. BMC Evol Biol 10, 1471-2148.
  324. Tako, E.A., Hassimi, M.F., Li, E., Singer, S.M., 2013. Transcriptomic analysis of the host response to *Giardia duodenalis* infection reveals redundant mechanisms for parasite control. MBio 4, 00660-00613.
  325. Tellez, A., Palm, D., Weiland, M., Aleman, J., Winiecka-Krusnell, J., Linder, E., Svard, S., 2005. Secretory antibodies against *Giardia intestinalis* in lactating Nicaraguan women. Parasite Immunol 27, 163-169.
  326. Teodorovic, S., Braverman, J.M., Elmendorf, H.G., 2007. Unusually low levels of genetic variation among *Giardia lamblia* isolates. Eukaryot Cell 6, 1421-1430.
  327. Teoh, D.A., Kamieniecki, D., Pang, G., Buret, A.G., 2000. *Giardia lamblia* rearranges F-actin and alpha-actinin in human colonic and duodenal monolayers and reduces transepithelial electrical resistance. J Parasitol 86, 800-806.
  328. Thompson, R.C., Ash, A., 2016. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. Infect Genet Evol 40, 315-323.
  329. Tian, X.F., Yang, Z.H., Shen, H., Adam, R.D., Lu, S.Q., 2010. Identification of the nucleoli of *Giardia lamblia* with TEM and CFM. Parasitol Res 106, 789-793.
  330. Torres-Romero, J.C., Euan-Canto Ade, J., Benito-Gonzalez, N., Padilla-Montano, N., Huchin-Chan, C., Lara-Riegos, J., Cedillo-Rivera, R., 2014. Intestinal parasites and

- genotyping of *Giardia duodenalis* in children: first report of genotype B in isolates from human clinical samples in Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109, 388-390.
331. Torres, M.F., Uetanabaro, A.P., Costa, A.F., Alves, C.A., Farias, L.M., Bambirra, E.A., Penna, F.J., Vieira, E.C., Nicoli, J.R., 2000. Influence of bacteria from the duodenal microbiota of patients with symptomatic giardiasis on the pathogenicity of *Giardia duodenalis* in gnotoxenic mice. *J Med Microbiol* 49, 209-215.
  332. Touz, M.C., Ropolo, A.S., Rivero, M.R., Vranych, C.V., Conrad, J.T., Svard, S.G., Nash, T.E., 2008. Arginine deiminase has multiple regulatory roles in the biology of *Giardia lamblia*. *J Cell Sci* 121, 2930-2938.
  333. Tovar, J., Leon-Avila, G., Sanchez, L.B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernandez, M., Muller, M., Lucocq, J.M., 2003. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 426, 172-176.
  334. Tremblay, E., Auclair, J., Delvin, E., Levy, E., Menard, D., Pshezhetsky, A.V., Rivard, N., Seidman, E.G., Sinnett, D., Vachon, P.H., Beaulieu, J.F., 2006. Gene expression profiles of normal proliferating and differentiating human intestinal epithelial cells: a comparison with the Caco-2 cell model. *J Cell Biochem* 99, 1175-1186.
  335. Troeger, H., Epple, H.J., Schneider, T., Wahnschaffe, U., Ullrich, R., Burchard, G.D., Jelinek, T., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, J.D., 2007. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut* 56, 328-335.
  336. Tumova, P., Hofstetrova, K., Nohynkova, E., Hovorka, O., Kral, J., 2007. Cytogenetic evidence for diversity of two nuclei within a single diplomonad cell of *Giardia*. *Chromosoma* 116, 65-78.
  337. Upcroft, J., Mitchell, R., Chen, N., Upcroft, P., 1996. Albendazole resistance in *Giardia* is correlated with cytoskeletal changes but not with a mutation at amino acid 200 in beta-tubulin. *Microb Drug Resist* 2, 303-308.
  338. Upcroft, J.A., Krauer, K.G., Upcroft, P., 2010. Chromosome sequence maps of the *Giardia lamblia* assemblage A isolate WB. *Trends Parasitol* 26, 484-491.
  339. Upcroft, J.A., Upcroft, P., Boreham, P.F., 1990. Drug resistance in *Giardia intestinalis*. *Int J Parasitol* 20, 489-496.
  340. Upcroft, P., 1998. Drug resistance in *Giardia*: clinical versus laboratory isolates. *Drug Resist Updat* 1, 166-168.
  341. Uzlikova, M., Nohynkova, E., 2014. The effect of metronidazole on the cell cycle and DNA in metronidazole-susceptible and -resistant *Giardia* cell lines. *Mol Biochem Parasitol* 198, 75-81.
  342. Valdez-Padilla, D., Rodriguez-Morales, S., Hernandez-Campos, A., Hernandez-Luis, F., Yopez-Mulia, L., Tapia-Contreras, A., Castillo, R., 2009. Synthesis and antiprotozoal activity of novel 1-methylbenzimidazole derivatives. *Bioorg Med Chem* 17, 1724-1730.
  343. Valdez, C.A., Tripp, J.C., Miyamoto, Y., Kalisiak, J., Hruz, P., Andersen, Y.S., Brown, S.E., Kangas, K., Arzu, L.V., Davids, B.J., Gillin, F.D., Upcroft, J.A., Upcroft, P., Fokin, V.V., Smith, D.K., Sharpless, K.B., Eckmann, L., 2009. Synthesis and electrochemistry of 2-ethenyl and 2-ethanyl derivatives of 5-nitroimidazole and antimicrobial activity against *Giardia lamblia*. *J Med Chem* 52, 4038-4053.
  344. Valdez, J., Cedillo, R., Hernandez-Campos, A., Yopez, L., Hernandez-Luis, F., Navarrete-Vazquez, G., Tapia, A., Cortes, R., Hernandez, M., Castillo, R., 2002.

- Synthesis and antiparasitic activity of 1H-benzimidazole derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 12, 2221-2224.
345. van der Flier, L.G., Clevers, H., 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual review of physiology* 71, 241-260.
346. van Lieshout, L., Roestenberg, M., 2015. Clinical consequences of new diagnostic tools for intestinal parasites. *Clin Microbiol Infect* 21, 520-528.
347. Van Lith, L., Soba, B., Vizcaino, V.V., Svard, S., Sprong, H., Tosini, F., Pozio, E., Caccio, S.M., 2015. A real-time assemblage-specific PCR assay for the detection of *Giardia duodenalis* assemblages A, B and E in fecal samples. *Vet Parasitol* 211, 28-34.
348. Varol, B., Bektas, M., Nurten, R., Bermek, E., 2012. The cytotoxic effect of diphtheria toxin on the actin cytoskeleton. *Cellular & molecular biology letters* 17, 49-61.
349. Vergnolle, N., 2000. Review article: proteinase-activated receptors - novel signals for gastrointestinal pathophysiology. *Aliment Pharmacol Ther* 14, 257-266.
350. Vicente, J.B., Testa, F., Mastronicola, D., Forte, E., Sarti, P., Teixeira, M., Giuffre, A., 2009. Redox properties of the oxygen-detoxifying flavodiiron protein from the human parasite *Giardia intestinalis*. *Arch Biochem Biophys* 488, 9-13.
351. Voleman, L., Najdrova, V., Astvaldsson, A., Tumova, P., Einarsson, E., Svindrych, Z., Hagen, G.M., Tachezy, J., Svard, S.G., Dolezal, P., 2017. *Giardia intestinalis* mitochondria undergo synchronized fission but not fusion and are constitutively associated with the endoplasmic reticulum. *BMC Biol* 15, 017-0361.
352. Walsh, S.V., Hopkins, A.M., Chen, J., Narumiya, S., Parkos, C.A., Nusrat, A., 2001. Rho kinase regulates tight junction function and is necessary for tight junction assembly in polarized intestinal epithelia. *Gastroenterology* 121, 566-579.
353. Wang, Y., Becker, D., Vass, T., White, J., Marrack, P., Kappler, J.W., 2009. A conserved CXXC motif in CD3epsilon is critical for T cell development and TCR signaling. *PLoS Biol* 7, 1.
354. Watkins, R.R., Eckmann, L., 2014. Treatment of giardiasis: current status and future directions. *Curr Infect Dis Rep* 16, 014-0396.
355. Wensaas, K.A., Langeland, N., Hanevik, K., Morch, K., Eide, G.E., Rortveit, G., 2012. Irritable bowel syndrome and chronic fatigue 3 years after acute giardiasis: historic cohort study. *Gut* 61, 214-219.
356. Wielinga, C.M., Thompson, R.C., 2007. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology* 134, 1795-1821.
357. Wieseahn, G.P., Jarroll, E.L., Lindmark, D.G., Meyer, E.A., Hallick, L.M., 1984. *Giardia lamblia*: autoradiographic analysis of nuclear replication. *Exp Parasitol* 58, 94-100.
358. Williams, A.G., Coombs, G.H., 1995. Multiple protease activities in *Giardia intestinalis* trophozoites. *Int J Parasitol* 25, 771-778.
359. Williams, C.W., Elmendorf, H.G., 2011. Identification and analysis of the RNA degrading complexes and machinery of *Giardia lamblia* using an in silico approach. *BMC Genomics* 12, 1471-2164.
360. Williamson, A.L., O'Donoghue, P.J., Upcroft, J.A., Upcroft, P., 2000. Immune and pathophysiological responses to different strains of *Giardia duodenalis* in neonatal mice. *Int J Parasitol* 30, 129-136.
361. Woessner, D.J., Dawson, S.C., 2012. The *Giardia* median body protein is a ventral disc protein that is critical for maintaining a domed disc conformation during attachment. *Eukaryot Cell* 11, 292-301.

362. Wojciak-Stothard, B., Potempa, S., Eichholtz, T., Ridley, A.J., 2001. Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. *J Cell Sci* 114, 1343-1355.
363. Wong, V., 1997. Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction. *Am J Physiol* 273, C1859-1867.
364. Yang, Y., Adam, R.D., 1994. Allele-specific expression of a variant-specific surface protein (VSP) of *Giardia lamblia*. *Nucleic acids research* 22, 2102-2108.
365. Yarahmadi, M., Fakhar, M., Ebrahimzadeh, M.A., Chabra, A., Rahimi-Esboei, B., 2016. The anti-giardial effectiveness of fungal and commercial chitosan against *Giardia intestinalis* cysts in vitro. *J Parasit Dis* 40, 75-80.
366. Yee, J., Tang, A., Lau, W.L., Ritter, H., Delpont, D., Page, M., Adam, R.D., Muller, M., Wu, G., 2007. Core histone genes of *Giardia intestinalis*: genomic organization, promoter structure, and expression. *BMC Mol Biol* 8, 26.
367. Yichoy, M., Duarte, T.T., De Chatterjee, A., Mendez, T.L., Aguilera, K.Y., Roy, D., Roychowdhury, S., Aley, S.B., Das, S., 2011. Lipid metabolism in *Giardia*: a post-genomic perspective. *Parasitology* 138, 267-278.
368. Yoder, J.S., Gargano, J.W., Wallace, R.M., Beach, M.J., 2012. Giardiasis surveillance-United States, 2009-2010. *MMWR Surveill Summ* 61, 13-23.
369. Zhou, P., Li, E., Shea-Donohue, T., Singer, S.M., 2007. Tumour necrosis factor alpha contributes to protection against *Giardia lamblia* infection in mice. *Parasite Immunol* 29, 367-374.

## ANEXOS

Experimental Parasitology 179 (2017) 49–64



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexpr](http://www.elsevier.com/locate/yexpr)



### Expression and secretion of the *Giardia duodenalis* variant surface protein 9B10A by transfected trophozoites causes damage to epithelial cell monolayers mediated by protease activity



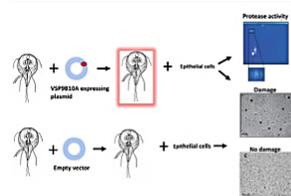
Ariana Cabrera-Licona, Eduardo Solano-González<sup>1</sup>, Rocío Fonseca-Liñán, Ma Luisa Bazán-Tejeda, Raúl Argüello-García, Rosa Ma Bermúdez-Cruz, Guadalupe Ortega-Pierres\*

Departamento de Genética y Biología Molecular. Centro de Investigación y Estudios Avanzados, IPN, México City, CA, 07360, Mexico

#### HIGHLIGHTS

- The VSP9B10A protein is present in the secretomes of *G. duodenalis* trophozoites/IEC-6.
- VSP9B10A displays proteolytic activity in the trophozoite/IEC6- monolayer interface.
- Bioinformatics analyses confirmed a cysteine protease motifs in VSP9B10A protein.
- Trophozoites expressing VSPB10A protein causes cytotoxic damage in epithelial cells.
- The VSP9B10A protein could be considered as a *Giardia* virulence factor.

#### GRAPHICAL ABSTRACT



#### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 1 February 2017  
Received in revised form 30 May 2017  
Accepted 26 June 2017  
Available online 28 June 2017

**Keywords:**  
*Giardia duodenalis*  
Variable surface proteins  
Proteinase  
Cytotoxicity  
Epithelial cells

#### ABSTRACT

*Giardia duodenalis* is the protozoan parasite responsible for most cases of parasitic diarrhea worldwide. The pathogenic mechanisms of giardiasis have not yet been fully characterized. In this context parasite's excretory/secretory products have been related to the damage induced by the parasite on enterocytes. Among these is the Variable Surface Proteins (VSPs) family involved in antigenic variation and in the induction of protective response. In proteomic analyses carried out to identify the proteases with high molecular weight secreted by *Giardia* trophozoites during the initial phase of interaction with IEC-6 cell monolayers we identified the VSP9B10A protein. *In silico* bioinformatics analyses predicted a central region in residues 324–684 displaying the catalytic triad and the substrate binding pocket of cysteine proteases. The analysis of the effect of the VSP9B10A protein on epithelial cell monolayers using trophozoites that were transfected with a plasmid carrying the *vsp9b10a* gene sequence under the control of a constitutive promoter showed that transfected trophozoites expressing the VSP9B10A protein caused cytotoxic damages on IEC-6 and MDCK cell monolayers. This was characterized by loss of cell-cell contacts and cell detachment from the substrate while no damage was observed with trophozoites that did not express the VSP9B10A protein. The same cytotoxic effect was detected when IEC-6 cell monolayers

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [arianacabrera267@gmail.com](mailto:arianacabrera267@gmail.com) (A. Cabrera-Licona), [eduid@hotmail.com](mailto:eduid@hotmail.com) (E. Solano-González), [rfonseca@cinvestav.mx](mailto:rfonseca@cinvestav.mx) (R. Fonseca-Liñán), [mbazan@cinvestav.mx](mailto:mbazan@cinvestav.mx) (M.L. Bazán-Tejeda), [rag@cinvestav.mx](mailto:rag@cinvestav.mx) (Raúl Argüello-García), [roberm@cinvestav.mx](mailto:roberm@cinvestav.mx) (R.M. Bermúdez-Cruz), [gortega@cinvestav.mx](mailto:gortega@cinvestav.mx) (G. Ortega-Pierres).

<sup>1</sup> Present Address: Eduardo Solano-González. Departamento Químico Farmacobiología. Universidad del Centro de Veracruz. Papaloapan S/N Esq. Independencia Col. Centro. CP 35900 TresValles Veracruz.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2017.06.006>  
0014-4894/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

were incubated only with supernatants from co-cultures of IEC-6 cell monolayers with VSP9B10A transfected trophozoites and this effect was not observed when transfected trophozoites were incubated with a monospecific polyclonal antibody anti-VSP9B10A previous to interaction with IEC-6 monolayers. These results demonstrate that the VSP9B10A protein secreted upon interaction with epithelial cells caused damage in these cells. Thus this protein might be considered as a conditional virulence factor candidate. To our knowledge this is the first report on the proteolytic activity from a *Giardia* VSP opening new research lines on these proteins.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Giardia* is the causative agent of giardiasis, an infection with cosmopolitan distribution. It has been reported that 200 million people are infected worldwide and an average of 500,000 new cases per year are recorded, with prevalence ranging from 20–30%–100% in some populations and in particularly among children under 5 years (Eckmann, 2003; Halliez and Buret, 2013; Lane and Lloyd, 2002; Yoder et al., 2012). Based on this, giardiasis was included in the World Health Organization's Neglected Diseases Initiative (Savioli et al., 2006).

The initial phase of the infection in humans occurs when *Giardia* trophozoites colonize the enterocytes of the small intestine, particularly at duodenum and jejunum without induction of an exacerbated inflammatory response. Trophozoites attach to the enterocyte through specialized structures such as the ventral disk and the ventrolateral ridge (Holberton, 1973; Sousa et al., 2001). Once the infection is established, several events occur including impaired intestinal barrier, apoptosis of enterocytes, activation of lymphocytes, shortening of brush border microvilli with or without villous atrophy, disaccharidases deficiencies, small intestinal malabsorption, anion hypersecretion and increased intestinal transit rates (Buret, 2007, 2008; Cotton et al., 2011; Chin et al., 2002; Eckmann and Gillin, 2001; Panaro et al., 2007; Soleymani-Mohammadi and Singer, 2011; Troeger et al., 2007).

Up to date, it has not been fully established which are the molecular and biochemical mechanisms that are involved in these events, or why in some cases the infection can turn into a chronic stage with recurrent symptoms or the development of an irritable bowel syndrome exposing the infected individuals to *failure to thrive* syndrome and developmental problems (Cotton et al., 2011; Halliez and Buret, 2013; Robertson et al., 2010; Wensaas et al., 2012). In this context trophozoite's virulence factors play a role, indeed several studies have suggested that adhesion of trophozoites and secretion of parasite products may increase the permeability of the epithelial barrier by altering apical tight junction complex which includes the F-actin ring belt, ZO-1, claudin-1 and  $\alpha$ -actinin proteins (Buret et al., 2002; Humen et al., 2011; Maia-Brigagao et al., 2012; Scott et al., 2002; Shant et al., 2004; Troeger et al., 2007). Transcriptomics and proteomics analyses of this parasite have reported that several metabolic enzymes, proteases, high cysteine-rich membrane proteins (HCMPs) and Variable Surface Proteins (VSPs) are secreted and modify their gene expression profiles in response to interaction with epithelial cells (de Carvalho et al., 2008; Jimenez et al., 2000; Nash et al., 1991; Palm et al., 2003; Ringqvist et al., 2008; Rodriguez-Fuentes et al., 2006). However, the active role of individual proteins in the pathophysiological mechanisms of giardiasis has been addressed only in few cases (Banik et al., 2013; Bhargava et al., 2015; Coradi and Guimaraes, 2006; Cotton et al., 2014; Gorowara et al., 1992; Shant et al., 2002; Stadelmann et al., 2012, 2013; Touz et al., 2008). Besides, it has been suggested that in humans infected with *Giardia* the

differences in the symptomatic spectrum may be related to different assemblages (A and B) and differences among strains or isolates from the same assembly as well (Bermudez-Cruz et al., 2004; Cevallos et al., 1995; Guimaraes et al., 1999, 2003; Hernandez-Sanchez et al., 2008; Lebbad et al., 2011; Mohammed Mahdy et al., 2009; Robertson et al., 2010; Soleymani-Mohammadi and Singer, 2011; Williamson et al., 2000). These observations suggest that there are differences among virulence factors expressed in trophozoites even within a single strain. Therefore, it is necessary to identify molecules displaying variable expression at mRNA and protein levels that may help to explain such variations (Prucca and Lujan, 2009).

Some members of the VSPs family are expressed upon *Giardia* interaction with epithelial cells (Emery et al., 2016; Nash et al., 1983, 1991; Nash and Keister, 1985). This parasite has around 230 *vsp*-related genes but only 77 proteins have the structural features of VSPs, namely the cytoplasmic tail CRGKA, a transmembrane domain of 30 aa, the Zinc finger motifs, a high content of cysteine ( $\approx 12\%$ ) in tandem repeats of CXXC and two novel motifs recently characterized (Adam et al., 2010; Gillin et al., 1990; Li et al., 2013; Nash and Mowatt, 1992). These proteins have been linked to the evasion of the host immune system due to the changes on surface proteins repertoire (Prucca and Lujan, 2009). However more recent *in vivo* studies have shown that VSPs are able to generate protection in experimental models of giardiasis (Rivero et al., 2010). Other studies have shown that VSPs play an important role in trophozoite's adherence to epithelial cells in a strain-specific manner (Bermudez-Cruz et al., 2004) and in the protection of trophozoites from proteases found in the intestinal milieu (Nash et al., 1991). Also, VSPs might be a relevant factor in the depletion of minerals and enzyme inactivation mechanisms during infection contributing to the process of malabsorption (Lujan et al., 1995; Nash et al., 1991; Robertson et al., 2010).

Another interesting feature is that VSPs vary in number and some are assembly-specific (Emery et al., 2014). In a recent study different motifs in the VSPs protein family were identified at the highly variable N-terminal region suggesting that some VSPs may have a different biological function than evasion of the host immune response (Adam et al., 2010; Emery et al., 2016). In particular, the role of VSPs during the interaction of trophozoites with the epithelial cells has not yet been fully characterized, due perhaps to the transient expression of VSPs. In the present study, we report the identification of VSP9B10A protein by proteomics as a high molecular weight proteolytic spot in supernatants obtained during the initial phase of interaction of WB trophozoites with IEC-6 monolayers. Bioinformatics analyses of VSP9B10A protein revealed that this protein has a central region (aa 324–684) with predicted folding and proteolytic activity similar to typical cysteine proteases. In order to obtain a continuous expression of this protein, trophozoites were transfected with a plasmid carrying the *vsp9b10a* gene sequence under the control of a constitutive promoter. The co-cultures of transfected trophozoites with IEC-6 or

MDCK epithelial cell monolayers showed that trophozoites constitutively expressing the VSP9B10A protein induced disruption of cell-cell contacts and detachment from substrate. These effects were not observed in co-cultures of IEC-6 monolayers with trophozoites that did not express VSP9B10A protein. The presence of the VSP9B10A protein in the supernatants of cell-parasite interaction experiments was confirmed and when these were tested on IEC-6 cell monolayers a similar damage was observed. Furthermore, when transfected trophozoites were incubated with a specific antibody anti-VSP9B10A previous to the interaction with IEC-6 epithelial cell monolayers no disruption of cell monolayers was observed. To our knowledge this is the first report of a specific VSP protein with putative proteolytic activity that may be related to trophozoites' virulence and may play a role in the pathogenesis of giardiasis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Parasite culture

For all the experiments, *Giardia duodenalis* trophozoites (WB strain, Assemblage A, ATCC # 30957) were grown at 37 °C in 15 mL conical tubes in Keister modified TYI-S-33 medium containing 10% bovine serum (Hyclone) with 1% antibiotic/antimycotic mixture (HyClone). Transfected trophozoites were grown in similar medium except that puromycin hydrochloride (Sigma-Aldrich) was added to cultures at 20 µg/mL concentration.

### 2.2. Epithelial cell cultures

The cell lines IEC-6 (Intestinal Epithelial cells from rat-ATCC) and MDCK (Madin-Darby canine kidney-ATCC) were maintained in flat-bottomed, 24-well cell culture plates of 25 cm<sup>2</sup> (Sigma) with minimum Dulbecco's-Modified Eagle medium (DMEM, GibcoBRL) supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone), 1% antibiotic/antimycotic mixture (HyClone), 0.1% glutamine and incubated at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The medium was replaced daily and cell monolayers were treated with trypsin (Sigma, 1: 250 from porcine pancreas) to maintain the cell cultures that were not used after 20 passages.

### 2.3. 2D SDS-PAGE zymograms

To perform 2D SDS-PAGE zymograms 30,000 IEC-6 cells were seeded in 24-well plates (Corning) and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> until confluence. For interaction assays, 2 × 10<sup>6</sup> *G. duodenalis* trophozoites previously washed three times with cold incomplete DMEM medium were suspended in 500 µL of serum-free DMEM per well. Co-cultures were maintained for 2 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Then supernatants were collected, centrifuged at 300 × g for 10 min to remove unattached trophozoites and concentrated at 20X using 10 kDa pore exclusion centricon membranes (Millipore) at 4 °C. For sample loading, 200 µg of proteins from supernatants were absorbed overnight on 10-cm immobilized™ DryStrip pH 3–10 strips (GE Healthcare). Isoelectric focusing was performed for 8 h on Ettan IPGphor II horizontal electrophoresis system (Amersham Pharmacia Biotech), according to the manufacturer's instructions. Afterwards, strips were equilibrated in 0.1% DTT solution for 15 min and in 0.2% iodoacetamide solution for another 15 min. The second dimension was performed by SDS-PAGE in a 10% polyacrylamide gel containing 0.2% copolymerized gelatin at 4 °C (Ropolo et al., 2005). At the end of electrophoresis, gels were washed in 2.5% Triton X-100 (30 min, 37 °C) to remove SDS and then for 32 h at 37 °C with 0.1 M phosphate buffer (pH 4.5) containing 1 mM dithiothreitol (DTT). The bands of proteolysis

were visualized by staining with 0.1% Coomassie blue in 30% methanol and 10% acetic acid. PDQuest 2-D analysis software was used to visualize, evaluate and compare the intensity of proteins in the secretome. As a control to monitor the contamination of secreted proteins with components from trophozoite lysates, duplicate gels per sample were analyzed. The spots were excised and resolved by 4000 Qtrap analysis and mass spectrum (triple quadrupole) high sensitivity MS (Paz-Maldonado et al., 2013). Peptide maps were searched against simulated trypsin digests in the NCBI-nr database using the MASCOT search engine at Matrix science (<http://www.matrixscience.com>). No missed cleavages were allowed and the peptide mass tolerance was set to <0.2 kDa. Significance of identification was evaluated using the Probability Based Mowse Score of the Mascot Program. A protein "hit" was accepted as a valid identification when at least two MS/MS spectra matched at the 95% level of confidence (p < 0.05).

### 2.4. Bioinformatics analysis and protein modeling

The VSP9B10A protein sequence was obtained from the NCBI database and *GiardiaDB* ([giardiadb.org/giardiadb/](http://giardiadb.org/giardiadb/)) (ORF GL50803\_101074) to confirm its sequence. Protein structure analysis was carried out using the tools of Bioinformatics (<http://www.bioinformatics.org>), YinOyang (Gupta and Brunak, 2002) and CSS-Palm (Ren et al., 2008) servers. The NCBI BLAST tools were used considering the following parameters: expectation value of 10 and low complexity. Motif analyses were performed using the DOUT-finder server. Comparative motif analysis was carried out by structure-based sequence alignment using the editing software ESPript 3.0 available online (Robert and Gouet, 2014). Prediction of the three-dimensional protein structure of VSP9B10A protein was done using the SWISS MODEL (Arnold et al., 2006; Biasini et al., 2014) and HHPRED (Soding et al., 2005) webserver. The model obtained was validated by the Ramachandran plot tool contained in Discovery Studio 4.1 Client software. Aminoacids residues of catalytic and substrate binding pocket sites were identified with ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) (de Castro et al., 2006) additional ligand binding sites were searched with the 3DLigand site webserver (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dligandsite/>). Visualization and editing of protein structures and molecular surfaces were done using the UCSF Chimera™ v 1.10.1 software.

### 2.5. VSP9B10A gene amplification

Genomic DNA was used as template and the *vsp9b10a* gene was amplified using the primers 5'-ATGTTTGGCAGTTTGTCT-3' (forward) and 5'-GTATCTAAGTCTACGCCTTGC-3' (reverse). PCR reaction was performed using Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen) and cycling program of an initial 3 min denaturation at 94 °C followed by 30 cycles of 94°C-30 s/62°C-30 s/72°C-2 min and a final 5 min extension step at 72°C-. A single amplicon of 2.2 Kb was detected by 1% agarose gel electrophoresis. The amplicon was cloned into the pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen) according to manufacturer's protocol. The insert was sequenced using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and no sequence change was detected when the DNA sequence was compared to that reported.

### 2.6. Recombinant VSP9B10A protein production

The *vsp9b10a* gene cloned into the pCR2.1-TOPO vector was released using *EcoRV* and *NotI* enzymes. The fragment was ligated into the pPROEX-1 vector and this was used to transform BL21 star *E. coli* strain. Expression of recombinant VSP910A protein with an

N-terminal His tag was induced with 0.5 mM IPTG for 16 h at 16 °C under stirring; a culture with no IPTG was used as control. After incubation, cells were collected by centrifugation at  $4000 \times g$  for 20 min at 4 °C, suspended in lysis buffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/10 mM Tris-HCl/8M Urea pH 8) and incubated for 1 h under shaking at room temperature. Lysate was clarified by centrifugation at  $10,000 \times g$  for 30 min at 4 °C and supernatant was concentrated 10x using centrifric membranes with 10 kDa exclusion cut (Millipore). The resulting extract was aliquoted and stored at -70 °C. For analysis, 15 µL of supernatants were loaded in SDS-10% polyacrylamide gels under reducing conditions and the gels were run at 120 V for 2 h. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane at 0.3 Amp for 18 h at 4 °C. Membranes were blocked for 2 h with 5% nonfat dried milk in PBS followed by 3 washes with 0.1% PBS-T for 5 min and then incubated with 1:4500 dilution of the anti-6xHis antibody (Sigma-Aldrich) in PBS for 2 h at room temperature. After 3 washes with TBS-T 0.1% for 5 min each, membranes were incubated for 1 h with anti-mouse IgG coupled to HRP as secondary antibody (GE-Healthcare) at 1:10,000 dilution in PBS. The reaction was developed with ECL Plus Lightning® Western kit (Perkin Elmer Inc.) and images were captured with a photo-document equipment UVP High Performance Ultraviolet Transilluminator fitted with the software Launch DoctLS.

#### 2.7. Production of mono-specific polyclonal antibodies against VSPB10A protein

VSPB10A recombinant protein was purified using Ni-NTA purification system (Invitrogen). The purified protein was analyzed by SDS-PAGE in a 10% gel; the band of 73 kDa was cut off the gel, extracted, diluted in sterile PBS and neutralized with sterile 0.1M NaOH solution. BALB/c mice were injected intraperitoneally with 6 µg of protein. Before immunization of animals, pre-immune serum was obtained from mice (day zero) then three immunizations were given at 7-day intervals followed by full bleeding of animals. Serum samples were obtained and adsorbed with a suspension of BL21 star *E. coli* in PBS and incubated for 90 min at room temperature. The adsorbed serum samples were recovered by centrifugation at  $10,000 \times g$  for 15 min, aliquoted and frozen at -20 °C. Antibody specificity was determined by Western blot analysis using total extracts of *Giardia* and VSP9B10A recombinant protein as control. Pre-immune serum was used at a 1:100 dilution in PBS and the immune serum was tested using 1:100, 1:500 and 1:1000 dilutions in PBS, incubations were carried out at 4 °C overnight. Then three washes with 0.1% TBS-T for 5 min were performed and membranes were incubated for 1 h with anti-mouse HRP secondary antibody (GE-Healthcare) 1:10,000 in PBS. The reaction was developed with ECL Plus Lightning® Western kit (Perkin Elmer Inc.) and images were captured as previously described.

#### 2.8. Transfection of giardia WB trophozoites

Genomic DNA of WB trophozoites was extracted to amplify the *vsp9b10a* gene (*Giardia* DB accession number GL50803\_101074) by PCR using the VSP9B10A primers forward 5'-GGGGGATATCATGTTTGGCAGTTTGTCTCG-3' and reverse 5'-GCCGCCCGCCTTGCCTCTGCACATAAACC-3' that contain restriction sites for *EcoRV* and *NotI* restriction enzymes for further ligation into the specific expression vector of *Giardia* pAC (Kindly donated by Dr. Staffan Svärd, Uppsala University, Sweden) (Jerlstrom-Hultqvist et al., 2012). The PCR reaction was performed as described above. An amplicon of 2200 bp was detected by electrophoresis in 1% agarose gel. The ligation reaction was performed at 3:1 ratio by incubating the purified amplicon for 16 h at

14 °C with 1 unit of the T4-DNA ligase kit (Invitrogen). The product of ligation reaction was used to transform *E. coli* DH5α strain which were plated in Petri dishes with selection medium (LB/ampicillin). Colonies that incorporated the plasmid were screened by colony PCR and restriction. Plasmids were sequenced using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) following the amplification protocol of an initial 5 min denaturation at 95 °C followed by 35 cycles of 95°C-1 min/58°C-1 min/72°C-2 min and a final 7 min extension step at 72 °C, confirming that there was no change in sequence. Then, transfection of WB trophozoites was performed using 50 µg of plasmid or the empty vector and  $10 \times 10^6$  trophozoites and the Gene Pulser XCell electroporator (Bio Rad) according to the protocol reported by Yee and Singer (Singer et al., 1998; Yee and Nash, 1995). Eighteen hours after transfection, puromycin hydrochloride (Sigma-Aldrich) was added to cultures at 20 µg/ml concentration. Also, WB trophozoites were transfected with mock control.

#### 2.9. Analysis of VSP9B10A expression by RT-PCR

RNA extraction from  $10 \times 10^6$  VSP9B10A.pAC transfected and non-transfected WB trophozoites was performed following TRIzol protocol (Life Technologies). RNA was quantified and its integrity was evaluated by electrophoresis in 1.2% agarose gel. The RNA samples were treated with DNaseI Amplification Grade (Life Technologies) for 30 min at 37 °C. RNA (5 µg) was used in cDNA synthesis with oligo (dT) oligonucleotides and SuperScript II RNase H- Kit Reverse Transcriptase (Invitrogen). cDNA was quantified and 1 µg was used in PCR reactions with the VSP9B10A primers: forward 5'-GGGGGATATCATGTTTGGCAGTTTGTCTCG-3' and reverse 5'-GCCGCCCGCCTTGCCTCTGCACATAAACC-3'. PCR reaction was performed as described above. The amplicon of 2200 bp was detected by electrophoresis in 1% agarose gel. Amplification of actin transcript from *Giardia* was used as housekeeping gene control. RNA from VSP9B10A transfected trophozoites without RT was used as negative control.

#### 2.10. Analysis of VSP9B10A expression by Western blot

Protein total extracts of  $10 \times 10^6$  either non transfected or VSP9B10A.pAC transfected trophozoites were obtained by sonication of the parasite pellet previously suspended in 500 µL of 1.5% Triton X-100 in PBS. Protein concentration was determined using Pierce®BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) and the absorbance was measured at 562 nm in a microplate reader (BioRad). Then 30 µg of protein samples were separated by SDS-PAGE in 12% polyacrylamide gels under denaturing conditions. Gels were transferred to PVDF membranes for 1.5 h at 300 mAmp in cold. The membranes were blocked with 5% nonfat dried milk for 1 h at room temperature under constant stirring. Then three washes with TBS-T 0.1% were performed and membranes were incubated with mouse monoclonal antibody α-FLAG®M2 (Sigma) at a 1:500 dilution in 5% nonfat dried milk/TBS-T 0.1% overnight at 4 °C. To remove antibody excess the membranes were washed three times and incubated for 1 h at room temperature and constant stirring with 1:10000 dilution of anti-mouse IgG coupled to HRP diluted in TBS-T as secondary antibody (GE-Healthcare). The reaction was developed with ECLplus Lightning® Western kit (Perkin Elmer Inc.) and images captured as mentioned before.

#### 2.11. Analysis of VSP9B10A expression by immunofluorescence

Trophozoites (WB strain or transfected with the VSP9B10A.pAC plasmid) were harvested and washed 3 times with cold PBS. Then  $10 \times 10^6$  trophozoites were fixed with 4% paraformaldehyde for

15 min, washed 3 times with PBS and centrifuged at  $6000 \times g$ ; then blocked with 1% BSA in PBS for 30 min at room temperature and washed 3 times. The cell pellet was further incubated overnight with mono-specific polyclonal anti-VSP9B10A antibody at 1:500 dilution in PBS, washed three times and incubated for 1 h in darkness with anti-mouse IgG coupled to FITC (GE-Healthcare) at 1:250 dilution in PBS.

### 2.12. Interaction assays with epithelial cell monolayers

In these assays 30,000 IEC-6 or MDCK cells were seeded into 24-well plates (Corning) and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere until confluence. The cell monolayers were co-cultured with  $1 \times 10^6$  WB trophozoites or with trophozoites transfected with either the VSP9B10A.pAC or the pAC empty vector (Jelstrom-Hultqvist et al., 2012) suspended in 500 µL of serum free DMEM per well. Previously to the assays IEC-6 monolayers and the parasites were washed 3 times with warm serum free DMEM medium. Interaction was carried out for 2 h at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere (Rodríguez-Fuentes et al., 2006). In the interaction assays with MDCK cells, the monolayers were incubated for 18 h with  $5 \times 10^6$  trophozoites each of the three parasite types. After the incubation period, supernatants of each interaction condition were centrifuged at  $250 \times g$  for 10 min to remove unattached trophozoites and these were concentrated using centricon filters with 10 kDa pore exclusion membranes (Millipore). Samples were aliquoted and stored at -70 °C for further SDS-PAGE analyses. The epithelial cell monolayers were washed three times with sterile PBS and fixed with 4% PFA for analysis by phase contrast with Axioskop 40 ZEISS microscope and micrographs were obtained with AxioVision Rel 4.8 software.

### 2.13. Adhesion inhibition assay

The effect of mono-specific polyclonal antibodies anti-VSP9B10A in the interaction between trophozoites constitutively expressing the VSP9B10A protein and IEC-6 monolayer was examined using an *in vitro* adhesion assay previously described (Bermudez-Cruz et al., 2004). In this,  $1 \times 10^6$  VSP9B10A.pAC transfected trophozoites were incubated with a 1:100 dilution of polyclonal anti-VSP9B10A antibodies in serum free DMEM medium at room temperature for 30 min or with medium without antibodies. Then, trophozoites were washed three times in serum free DMEM and added to confluent IEC-6 cell monolayers. Co-cultures were incubated for 2 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The epithelial cell monolayers were washed three times with sterile PBS and fixed with 4% PFA for analysis by phase contrast microscopy using the Axioskop 40 ZEISS microscope. Micrographs were obtained with AxioVision Rel 4.8 software.

### 2.14. Identification of VSP9B10A in supernatants of interaction by zymogram and Western blot analyses

SDS-PAGE was performed in 10% polyacrylamide gels copolymerized with 0.2% gelatin (Sigma), 30 µL of each concentrated supernatant under non-reducing native conditions were loaded per lane and proteins were separated at 100 V for 2 h. Equal protein loading was verified in replicate gels stained with Coomassie blue (BioRad). The gels were further incubated in a solution of Triton X-100 2.5% (v/v) in water for 1 h and washed three times with distilled water. To determine the presence of bands with proteolytic activity the gels were incubated in acetate buffer pH 5.5 with 1 mM DTT for 16 h at 37 °C under constant agitation and washed three times with distilled water to remove the activation buffer. Then gels were stained with Coomassie blue (BioRad) for

2 h at 37 °C with constant stirring. Finally, gels were washed with distilled water to remove excess dye and incubated with a solution of 5% acetic acid/40% methanol (v/v) (Ropolo et al., 2005). Gel images were documented with UVP High Performance Ultraviolet Transilluminator and software Launch DocItLS. The same samples were analyzed by SDS-PAGE in a 10% gel under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes, which were blocked with 5% nonfat dried milk and incubated with mouse monospecific polyclonal anti-VSP9B10A antibody a 1:500 dilution overnight at 4 °C. Then the analysis was carried out as previously described.

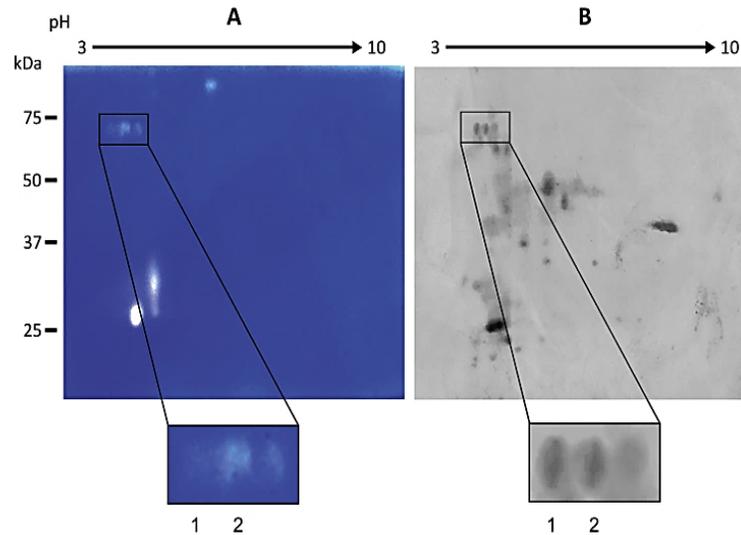
## 3. Results

### 3.1. The VSP9B10A protein present in the secretome of co-cultures of *G. duodenalis* with IEC-6 cell monolayers displays proteolytic activity

In order to detect and characterize proteases, specifically those at the high molecular weight range that may be released during *in vitro* interaction of *Giardia* with IEC-6 cell monolayers, as an initial approach these were co-cultured for 2 h with a normal WB strain trophozoites routinely used in the laboratory which does not present any different physical behavior from that reported by others or in the expression of this particular VSP. Then the supernatants (secretome) were recovered and proteolytic activity analysis was carried out by 2D SDS-PAGE zymograms. Three well-defined spots present only in the zymograms of supernatants from the interaction were selected for analysis by mass spectrometry -MALDI/TOF. The variable surface protein VSP9B10A (gb | AAG16629.1 |) from *G. duodenalis* trophozoites was identified on proteolysis spots 1 and 2 (Fig. 1). In the first spot, peptides had a coverage of 2% and an identity value of 39% whereas in the second spot there were 8 peptides covering 10% of the sequence and an identity value of 62% (Supplementary Fig. S1), on the third spot a hypothetical protein GPL\_291\_83292\_81589 was identified with a sequence covering of 13%. No other proteins were identified in these particular spots. Based on these results we initially focused our study on the characterization of the VSP9B10A protein since this is the first report of a *G. duodenalis* VSP displaying proteolytic activity during the adhesion of *Giardia* trophozoites to epithelial cells and also we analyzed the effect of this protein on epithelial cell monolayers.

### 3.2. The sequence of VSP9B10A has protease-like domains and the region spanning aminoacids 326–684 structurally matches those of typical cysteine proteases

*In silico* bioinformatics analyses were carried out to identify possible motifs in the VSP9B10A responsible for the proteolytic activity. An initial analysis showed that the 739 aa protein has a theoretical molecular weight of 76.77 kDa and an isoelectric point of 5.08 (<http://www.bioinformatics.org>). Interestingly, the experimental weight obtained of 82 kDa determined by the 2D SDS-PAGE analysis of secretomes suggest that this protein undergoes post-translational modifications which may also explain why it was found in two spots in the 2D analysis. The potential glycosylation sites in this protein as determined by using the YinOYang 1.2 server revealed 9 putative sites of O-glycosylation at positions 111, 171, 236, 264, 369, 380, 637, 661 and 663, and six putative palmitoylation sites, one of the typical posttranslational modifications that VSPs have, at positions 367, 471, 628, 680, 730 and 735 as predicted by server CSS-Palm v4.0. Of note, the predicted palmitoylation site at residue 735 corresponds to the cysteine in the typical cytoplasmic tail CRGKA. The sequence NKSGLS, a signal associated to cut and release of these proteins into the environment was found



**Fig. 1.** Identification of VSP9B10A protein with proteolytic activity in supernatants from interaction between *Giardia duodenalis* trophozoites and IEC-6 monolayers. Supernatants from 2 h interaction of WB *Giardia* trophozoites with IEC6 monolayers were collected and analyzed by 2D SDS-PAGE zymograms to identify secreted proteases with high molecular weight. Panel A: Coomassie Blue stained gel showing the pattern of proteolytic spots; bottom panel shows an amplification of the degradation spots (1 and 2) corresponding to VSP9B10A protein identified by MALDI-TOF and MASCOT. Panel B: Gel showing the pattern of all proteins detected in the supernatant from the interaction. Lower panel shows and amplification of the localizations of the spots 1 and 2 where VSP9B10A was identified. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

with the SigCleave server (Supplementary Fig. S2).

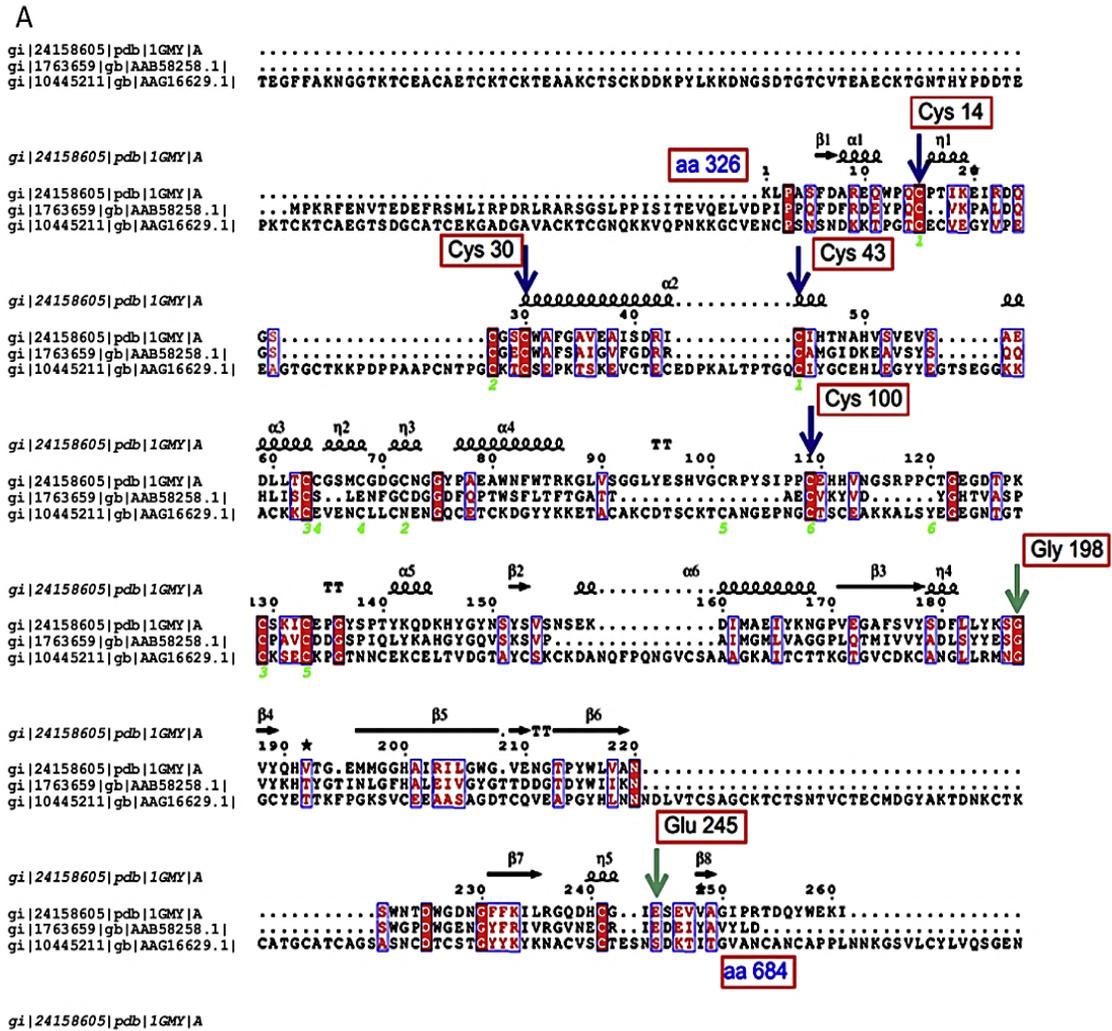
The primary sequence of this protein was analyzed using the search tool of NCBI BLASTp. Homology was found with proteases such as proprotein convertase subtilisin/kexin-type 5 (accession no. gb|EDM12978.1) with 45% identity, a putative cysteine-rich surface protein from *Entamoeba histolytica* (emb|CAC34072.1) with 41% identity and also with a leishmanolysin family protein from *Tetrahymena thermophila* (XP\_001012746.1) with 37% identity. However all of these searches shed low expectation (E) values (Supplementary Fig. S3). The analysis carried out using the DOUT-finder server showed that VSP9B10A protein displays a significant alignment with peptidase C1, a papain family of cysteine protease (gnl/CDD/25402 pfam00112) with 26% identity (data not shown). The HHpred server showed that this protein shared high similarity to the protein leishmanolysin-like peptidase (PTHR10942) with a E-value of 5.5E-40 and equally high identity (27%) and similarity (0.691) (Supplementary Fig. S4), also both servers showed that the VSP9B10A protein has significantly hitting domains including FU (Furin-like repeats), VWC (von Willebrand factor type C domain). Finally, an alignment of the VSP sequence with leishmanolysin and cysteine protease 1 of *Giardia* did not show active sites residues H264, E265, H268, H334, M345 or the characteristic HEXXH motif of these metalloproteinases (Elias et al., 2006) (Supplementary Fig. S5) despite the high similarity between VSP and leishmanolysin; while the alignment among VSP9B10A protein, the typical cysteine protease 1 of *Giardia* (CP1, gb | AAB58258.1) and the human cathepsin B (HsCatB, gi | 24158605, pdb ID: 1GMY) sequences using ESPript program revealed a region of high homology between the VSP9B10A protein and these proteases spanning residues 327 to 607 of VSP9B10A (Fig. 2). Also the ClustalW alignment program showed that the percentage of homology between HsCatB and VSP9B10A protein is 11% and 5% between CP1 and VSP9B10A. In contrast, the tertiary structure analysis showed a 280 aa region in the VSP9B10A with the conserved cysteines typically found in other giardial cysteine proteases namely at positions 15, 49 and 99, also

the glycine and glutamic acid residues at positions 77 and 249 respectively in addition to the glycine (Fig. 2). All these residues may complement the substrate binding pocket S2 in VSP9B10A sequence (DuBois et al., 2006). Regarding the catalytic triad of cysteine proteases, the following residues were found in VSP9B10A: cysteine at position 30, histidine at position 80 and asparagine at position 201. These positions are somewhat similar to those in the HsCatB catalytic triad: cysteine at 30, histidine at 200 and asparagine at 220 (Fig. 2).

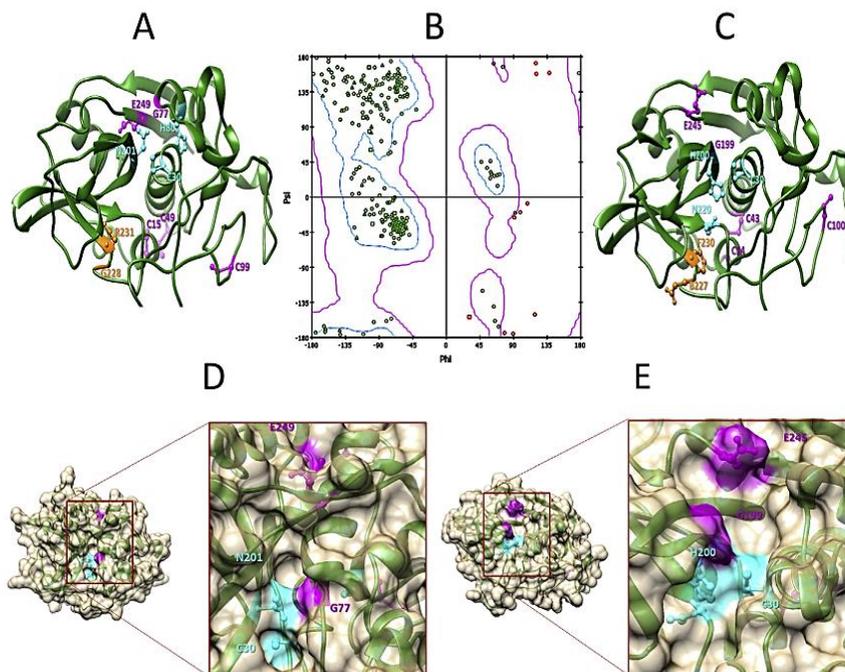
To determine whether other VSP proteins have the structural characteristics of the VP9B10A protein, an analysis revealed six proteins closely related to the VSP9B10A (Supplementary Fig. S6) and that all had the catalytic triad and binding pocket S2 residues. Nevertheless only the protein sequence referred as VSP8 in GiardiaDB retains almost all the features of a cysteine protease although an Asparagine residue from catalytic triad was identified instead of a Histidine residue (Supplementary Fig. S6).

Finally, a homology-based protein model was obtained using HsCatB (PDB: 1GMY) as template to obtain the tridimensional structure of the cysteine protease-like region in the region 326–684 aa of VSP9B10A. The model obtained (Fig. 3A) shared 99.2% of structural homology with HsCatB (Fig. 3C) and a Root Mean Square Deviation (RMSD) index of 0.38 Å over a span of 253 residues aligned. The VSP9B10A model was validated by Ramachandran plots that predicts secondary structures from dihedral angles ( $\phi$  and  $\psi$ ) of individual aminoacids and displays distributions of residues in “favored regions” (contoured in blue line), “additionally allowed regions” (contoured in pink line) and the external “generously allowed” and “not allowed” regions as stated by the ProCheck platform. In general, up to 96.45% of residues (245 out of 254) had a satisfactory conformation within the protein structure predicted, conforming a good quality of the model obtained (Fig. 3B) (Mort and Buttle, 1997).

When giardial and human counterparts were compared, the five S2 residues were spatially similar although the residues of the



**Fig. 2.** Alignment of the secondary structure of canonical cysteine proteases and VSP9B10A protein. (A) Bioinformatics analysis to determine homology regions among cysteine proteases was performed by structure-based sequence alignment analysis, comparing the secondary structures of human cathepsin B (gi|24158605|pdb|1GMY|A), the cysteine protease 1 of *Giardia* (gi|1763659|gb|AAB58258.1) and VSP9B10A protein (gi|10445211|gb|AAG16629.1) using the alignment program ESPript 2.2. In the alignment, conserved cysteines typical of cysteine proteases of *Giardia* at 14, 30, 43 and 100 positions are shown (blue arrows); also glycine residue in the catalytic site at position 198 (green arrow) and glutamic acid in the 245 position (green arrow) were determined but the histidine residue was not found in this analysis. Conserved residues are shown in red boxes while semi-conserved residues are in white boxes; green numbers indicate the disulfide bridges. (B) Scheme showing the area in the VSP9B10A spanning amino acids 326 and 684 at the N-terminal where homology with cysteine proteases was found. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 3.** Protein modeling of the predicted catalytic zone in VSP9B10A protein. The zone of homology of VSP9B10A (positions 326–684), with human cathepsin B (PDB ID: 1GMV) were modelled using the Swiss-model server and visualized with UCSF-Chimera. The proposed residues corresponding to the catalytic triad in VSP9B10A (A) and the canonical residues in human cathepsin B (C) are displayed in cyan. The model in (A) was validated by the Ramachandran plot (B) in which amino acids in favored and allowed regions are displayed as green dots and residues in not allowed regions are displayed as red dots. Residues for substrate binding pocket (S2) are exhibited in magenta and residues of calcium binding sites are displayed in orange. The corresponding molecular surfaces are shown in (D) and (E) in which the surface-exposing residues from catalytic triad and substrate binding pocket (S2) zones are shown in cyan and magenta, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

catalytic triad are differentially oriented due to the displaced position of H80 in VSP9B10A (H200 in HsCatB), with respect to the C30 present in both models. Interestingly two calcium-binding sites were identified at similar positions in VSP9B10A (G228 and R231) and HsCatB (B227 and F230). When a topological comparison was performed between the surfaces exposed by the S2 pocket and catalytic cleft residues, a striking similarity between the surface pattern of the triad C30-N201-G77 in VSP9B10A (Fig. 3D) and its counterpart triad C30-H200-G199 in HsCatB (Fig. 3E) was observed. In both proteins the residues E249 (VSP9B10A) and E245 (HsCatB) are protruding at the near vicinity of corresponding glycines residues (G77 in VSP9B10A and G199 in HsCatB). All together, these observations predict the presence of a cysteine protease-like activity in the central region from aminoacids 326 to 684 in the VSP9B10A.

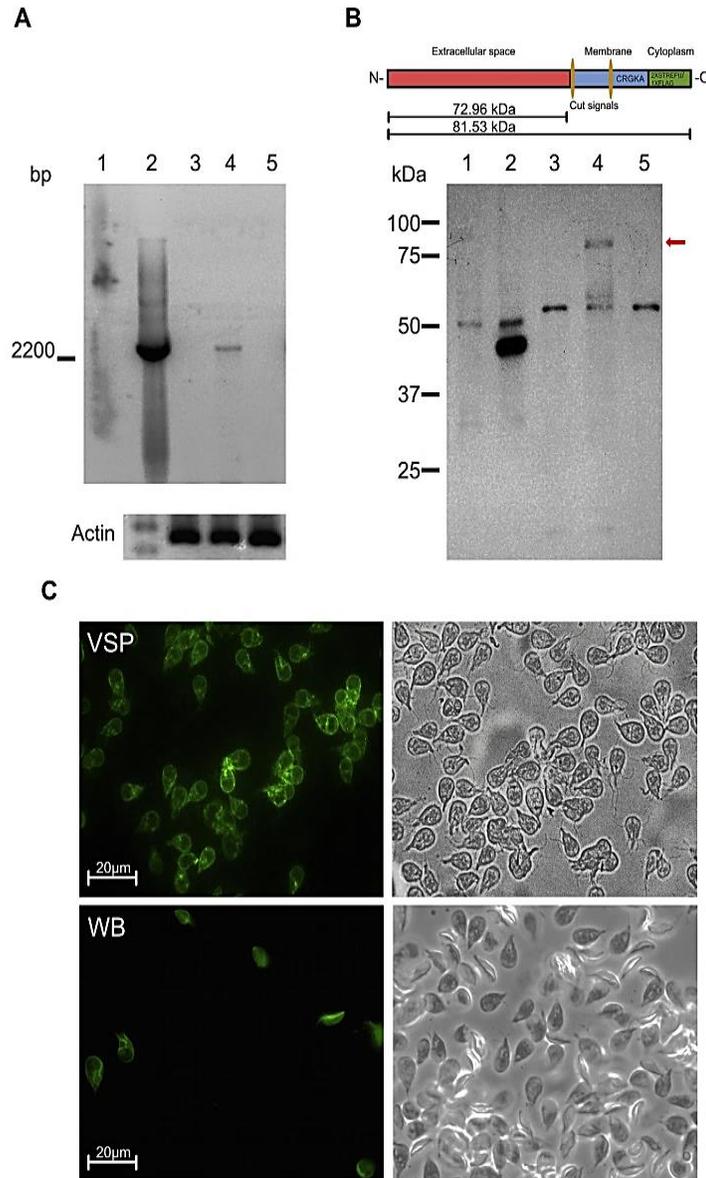
### 3.3. Constitutive expression of VSP9B10A in *G. duodenalis* trophozoites by transfection

As a first strategy to analyze the role of VSP9B10A protein in the interaction of *Giardia* with epithelial cell monolayers, we obtained the recombinant protein and antibodies against it. For this the *vsp9b10a* gene was cloned into the bacterial expression vector pPROEX to obtain the recombinant protein with a 6xHis tag. Once the recombinant protein was obtained, BALB/c mice were immunized with the protein to obtain specific polyclonal antibodies that were used later to analyze its expression in trophozoites during

interaction with epithelial cell. Western blot assay confirmed that the antibodies specifically recognized the recombinant VSP9B10A protein in total extracts of trophozoites and supernatants of interaction (Supplementary Fig. S7). However, in zymograms we note that the bacterial recombinant protein did not exhibit proteolytic activity (data not shown) perhaps because the bacterial system cannot perform the post-transcriptional modifications or folding necessary to be functional, for example the disulfide bridges that could confer to the protein the folding needed to form the catalytic site detected *in silico* in the central part of this N-terminal (Guo et al., 2015; Rosano and Ceccarelli, 2014).

On the basis of these structural facts and the mechanism of antigenic variation under which the expression of this VSP is regulated, we carried out the transfection of *G. duodenalis* trophozoites, with the *vsp9b10a* gene sequence (GL50803\_101074) that was cloned in a specific expression vector for this parasite (pAC) which is under the control of the constitutive ornithine carbamoyl transferase (OCT) gene promoter (Jerlstrom-Hultqvist et al., 2012; Singer et al., 1998; Yee and Nash, 1995) to obtain populations of trophozoites that constitutively expressed the VSP9B10A protein tagged with a FLAG (DYKDDDDK) on the cytoplasmic tail at the C-terminus. Transfected trophozoites were selected with puromycin hydrochloride and characterized by RT-PCR. Western blot assays were carried out with monoclonal antibody anti-FLAG to corroborate the expression of the recombinant protein (Fig. 4).

While RT-PCR assays showed that the population transfected with VSP9B10A.pAC plasmid did express the *vsp9ba10* transcript



**Fig. 4.** Characterization of *Giardia duodenalis* trophozoites transfected with VSP9B10A.pAC plasmid. (A) Analysis of transcript expression of VSP9B10A gene by RT-PCR; lane 1: negative control RNA from VSP9B10A transfected trophozoites without RT, and lane 2: positive control VSP9B10A.pAC plasmid; lane 3: RT-PCR reaction with RNA from WB trophozoites, lane 4: RNA from VSP9B10A.pAC transfected trophozoites and lane 5: reaction with RNA from trophozoites transfected with the empty vector pAC. A single amplicon of 2200 bp was detected only in trophozoites transfected with VSP9B10A.pAC and in the positive control. In the lower panel actin was used as loading control. (B) Analysis of the VSP9B10A protein expression in transfected trophozoites. Top panel shows a schematic representation of VSP9B10A recombinant protein where the location of the Flag tag is shown in the carboxy terminus (green) as well as the cleavage signal and the cytoplasmic tail characteristic of the VSPs. Also, the theoretical molecular weight of 81.53 kDa and the weight of the N-terminal region that is released (72.96 kDa) are indicated. Bottom panel shows Western blot results using the monoclonal antibody  $\alpha$ -FLAG<sup>®</sup> for recombinant protein detection; lane 1: negative control (COS), lane 2: positive control (COS.PFB), lane 3: total protein extracts of WB trophozoites, lane 4: total protein extracts from VSP9B10A.pAC transfected trophozoites and line 5: total protein extracts from trophozoites transfected with the empty vector. A band with a molecular weight of 83 kDa was only identified in total extracts of VSP9B10A.pAC transfected trophozoites, indicated by an arrow. (C) Immunofluorescence micrographs of assay using the monospecific anti-VSP9B10A antibody to determine the expression of the recombinant protein in the trophozoites surface; upper panels show the reactivity in VSP9B10A.pAC transfected trophozoites (left) and the bright field (right). Bottom panels shows the reactivity in non-transfected trophozoites WB (left) and the bright field (right). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(2200 nt), it was not detected in non-transfected control trophozoites (Fig. 4A). An immunoreactive band of 83 kDa (corresponding to recombinant protein weight) was detected by Western blot using

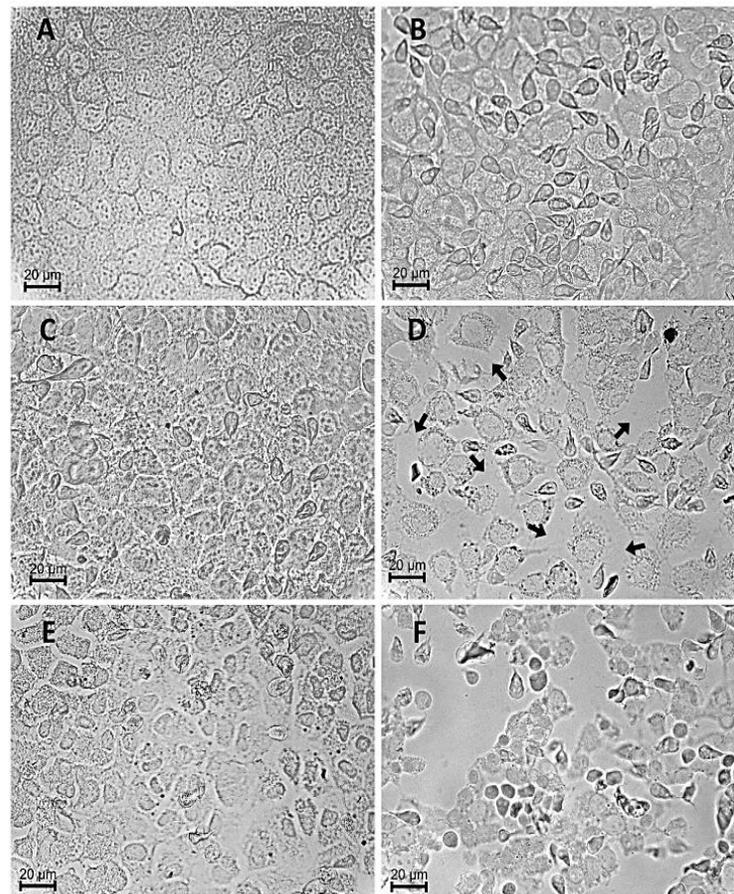
the anti-Flag antibody in total proteins extracts of transfected trophozoites and not in those from not-transfected trophozoites (Fig. 4B) Further the cytolocalization of this protein in the

trophozoites was determined by indirect immunofluorescence using the monospecific polyclonal antibody anti-VSP that recognized the N-terminus. The population of transfected trophozoites showed the characteristic expression pattern covering the whole surface and flagella of trophozoites and a higher number of reactive cells as compared to the non-transfected trophozoites (Fig. 4C), since this antibody recognizes native and recombinant proteins. It should be noted that the anti-Flag antibody was not used in immunofluorescence assay because it required permeabilization of trophozoites and we observed that this step compromised their normal morphology; in addition we did not label the protein at the N-terminus because this could interfere in the correct protein folding.

These assays were carried out routinely to verify the constitutive protein expression in VSP9B10A.pAC transfected trophozoites and specifically before starting interaction assays to confirm that the population was FLAG (+)/VSP9B10A (+). Of note, the VSP9B10A-transfected trophozoites retained their normal morphology although their growth was slower than the one observed in WB trophozoites (data not shown).

#### 3.4. Effect of trophozoites constitutively expressing the VSP9B10A protein on IEC-6 and MDCK monolayers

Trophozoites constitutively expressing the protein VSP9B10A were co-cultured with IEC-6 monolayers to determine if they induce any change that might suggest a pathogenicity factor activity associated particularly to the putative proteolytic activity identified in the VSP9B10A protein. As control, IEC-6 monolayers were cultured alone or with WB trophozoites or with trophozoites transfected with the empty vector (control of transfection). All cultures were analyzed by optical microscopy. As shown in the micrographs of these assays normal hexagonally-shaped morphology of the cells in the monolayer incubated with serum free medium can be seen (Fig. 5A). When IEC-6 cells were incubated with WB trophozoites or trophozoites that were transfected with the empty vector pAC no effects on the cell morphology were observed during the time in which the assays were performed (Fig. 5B and C). In contrast, monolayers incubated with trophozoites constitutively expressing the protein VSP9B10A displayed a loss of



**Fig. 5.** Effect of trophozoites expressing the VSP9B10A protein on IEC-6 monolayers. IEC6 monolayers were co-cultured with different trophozoites populations to determine the effect of the population of trophozoites constitutively expressing VSP9B10A protein on their integrity. (A) Micrograph of IEC-6 cell monolayer with no trophozoites added, continuity on the cell monolayer and cell-cell contact are observed. (B) A similar pattern was seen in the cell monolayers co-incubated with WB trophozoites or trophozoites transfected with the empty vector (C). In micrographs of monolayers incubated with trophozoites expressing the VSP9B10A protein, a loss of cell monolayer continuity and cell-cell contacts can be observed (D); arrows indicate the empty areas on the monolayers. When transfected trophozoites were incubated with the polyclonal anti-VSP9B10A antibody previous to the interaction with the IEC-6 cell monolayers no damage was observed (E) while monolayers incubated with non-treated trophozoites constitutively expressing VSP9B10A protein showed a loss of cell monolayer continuity and cell-cell contacts (F).

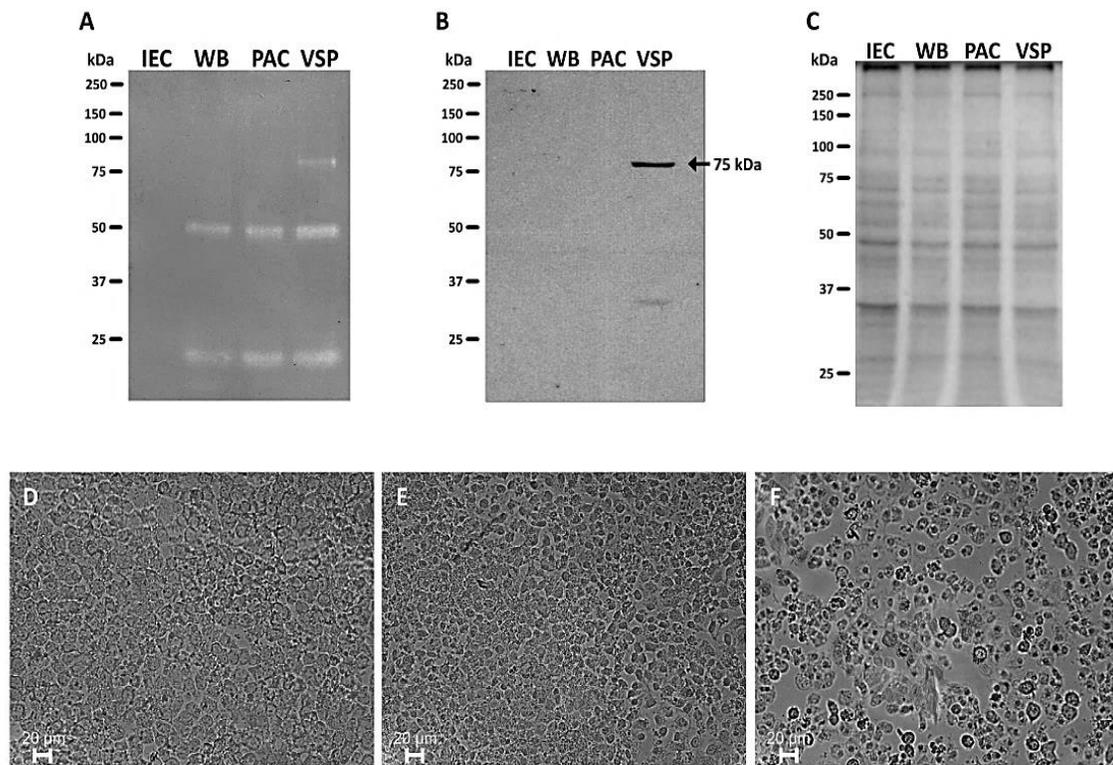
monolayer continuity with cells detached from each other and from the substrate, besides changes on the normal morphology were evident as these exhibited an elongated morphology in contrast with its typical pear-shaped morphology (Fig. 5D). Also when the VSP9B10A.pAC transfected trophozoites were incubated with the polyclonal antibody anti VSP9B10A previous to the co-culture assays, these damages were not observed (Fig. 5E) while the co-cultures with trophozoites with not antibody treatment showed, as expected, damage in the epithelial cells (Fig. 5F).

To determine if the VSP9B10A protein was released during the interaction the supernatants of the different co-cultures were collected and their proteolytic profiles were analyzed by zymograms. The results showed that a band of 76 kDa was observed only in supernatants from the interaction between trophozoites constitutively expressing the VSP9B10A protein and IEC-6 monolayers (Fig. 6A) and that this band was recognized by the polyclonal antibody raised against recombinant VSP9B10A (Fig. 7B, Supplementary Fig. S7A), control for protein loading in these assays (total proteins separated by SDS/PAGE and stained with Coomassie) was also included (Fig. 6C).

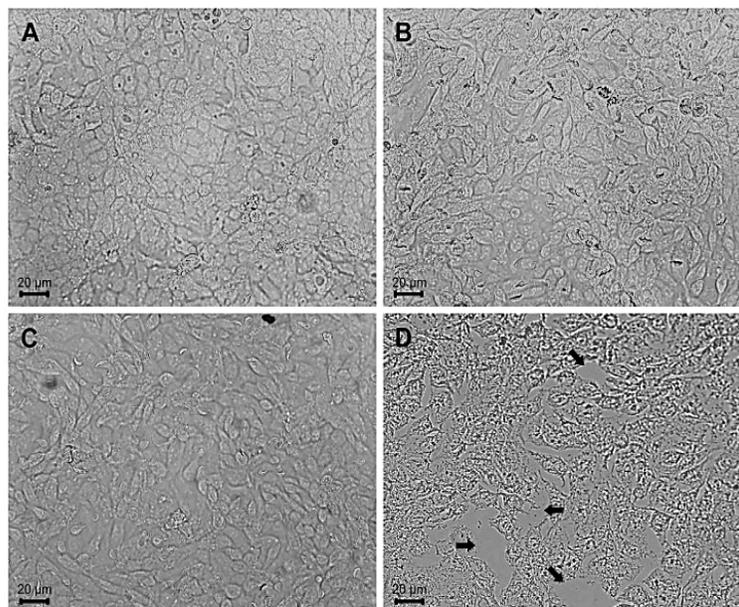
Further when IEC-6 monolayers were incubated with supernatants from co-cultures of these cells with WB trophozoites (Fig. 6D) or with trophozoites transfected with the empty vector pAC (Fig. 6E) damage was not observed. Indeed, the cytotoxic effects of

this secreted VSP9B10A protein were only seen in monolayers exposed to the supernatants from the interaction of trophozoites expressing the VSP9B10A protein (Fig. 6F). These data clearly showed that the VSP9B10A protein is released during the early contact of trophozoites with epithelial cells, as shown in the kinetics analysis (Supplementary Fig. S7B) and that this protein plays a major role in the loss of monolayer integrity.

To establish that the observed effect was produced by VSP9B10A transfected trophozoites and that it does not depend of the epithelial cell type, specifically their characteristic cell-cell junctions we analyzed the effects of transfected trophozoites on MDCK monolayers (Fig. 7). This epithelial cell line has a higher trans-epithelial resistance (TEER) and stronger cell-cell junctions than IEC-6 monolayers (Dukes et al., 2011). Hence these interaction assays were performed at longer incubation times and with a higher number of trophozoites than the ones used in co-cultures with the IEC-6 monolayers. The results obtained were similar to the ones observed with the IEC-6. In these, MDCK cell monolayers cultured alone did not show changes in cell morphology (Fig. 7A) neither did monolayers incubated with wild type trophozoites or trophozoites carrying the empty pCA vector (Fig. 7B and C). However, monolayers incubated with trophozoites expressing the VSP9B10A protein on their surface displayed loss of monolayer continuity and cell-cell contacts and cell morphological changes (Fig. 7D). These



**Fig. 6.** Identification of the VSP9B10A protein in the secretome of *Giardia* trophozoites and IEC-6 monolayers. Supernatants of 2 h co-cultures of IEC-6 cells and transfected trophozoites were analyzed by zymograms to determine the release of VSP9B10A protein. (A) Proteases profile in supernatants of IEC-6 monolayers with no parasites added (lane IEC); IEC-6 monolayer co-incubated with WB trophozoites (lane WB); IEC-6 monolayers co-incubated with trophozoites transfected with empty vector (lane pAC); IEC-6 monolayers co-incubated with trophozoites expressing the VSP9B10A protein (lane VSP). A specific proteolytic activity band with experimental molecular weight of 73 kDa was observed only in the secretomes from IEC-6/VSP9B10A.pAC trophozoites (lane VSP). (B); Western blot analysis of the same samples described above using polyclonal anti-VSP9B10A antibody. A specific proteolytic band with molecular weight of 73 kDa was detected only in the supernatant of IEC-6 incubated with trophozoites constitutively expressing VSP9B10A protein (lane VSP). The SDS-PAGE pattern of total protein loading from the supernatants of interaction for each condition is included (C). Bottom, micrographs show IEC-6 monolayers incubated with supernatants of the interaction with WB trophozoites (D), with trophozoites transfected with the empty vector pAC (E) or trophozoites constitutively expressing the VP9B10A protein (F). The separation of the cells in the monolayer was observed only with supernatants from VSP9B10A transfected trophozoites.



**Fig. 7.** Effect of trophozoites expressing the VSP9B10A protein on MDCK monolayers. (A) Micrographs of MDCK monolayers alone; (B) monolayers co-incubated with WB trophozoites and (C) with trophozoites transfected with the empty vector did not show any damage or change in its morphology. However, in MDCK monolayers incubated with trophozoites expressing VSP9B10A (D) a disruption of the monolayer integrity and separation of the cell from each other are observed as it was detected in co-cultures of IEC-6 monolayers and trophozoites expressing VSP9B10A protein.

observations confirmed that trophozoites population expressing the VSP9B1A protein induced similar time-dependent effects in epithelial cells with different junctional resistances.

#### 4. Discussion

The study of *Giardia* host-parasite interaction has shown that a number of parasite proteins are released during the trophozoites attachment to enterocytes both *in vitro* and *in vivo* models as well as in biopsies (Belosevic et al., 1989; Buret et al., 1990, 1992, 1991; Cevallos et al., 1995; Chavez et al., 1995; Daniels and Belosevic, 1992, 1995; Favennec et al., 1991; Gorowara et al., 1992; Humen et al., 2011; Scott et al., 2002; Sousa et al., 2001; Teoh et al., 2000). This group of parasite released factors is known as excretory/secretory products. These include mainly proteases, metabolic enzymes and cysteine-rich protein of the families of HCMPs and VSPs (de Carvalho et al., 2008; Emery et al., 2016; Jimenez et al., 2009, 2004, 2000; Kaur et al., 2001; Nash et al., 1991; Ringqvist et al., 2008; Rodriguez-Fuentes et al., 2006; Shant et al., 2002). However the function of most of these proteins in the pathogenesis of giardiasis remains to be determined. Therefore their study may provide basic information for understanding the molecular mechanisms of this parasitic infection that may have applications in diagnosis and specific drug development.

In the case of the VSPs, it has been reported that some of these proteins are released during the early stages of interaction of *Giardia* trophozoites with the intestinal epithelial cells *in vitro* and has been reported that several transcripts of VSP proteins increased during the interaction with epithelial cells (Emery et al., 2014, 2016; Ferella et al., 2014; Nash et al., 1991; Palm et al., 2003), although a specific function for these proteins during this process has not been assigned. It has been proposed that the VSPs may have a role in the biology of the parasite different of the evasion of host immune response and induction of protection (Huynh et al., 2006; Rivero

et al., 2010). For example, it has been suggested that populations of trophozoites expressing different VSPs have different resistance to enzymes present in the intestine or confers differences in their interaction with trophozoites (Bermudez-Cruz et al., 2004; Nash et al., 1991). In particular this proteins family is composed of highly variable proteins and recent reports emphasize that they have structural properties that may confer activities different from antigen variation. In this context *in silico* analyses have shown that these have several motifs like BmKX domains, a short bioactive peptide present in the venom of scorpions, laminin\_EGF domain, EGF\_CA domain, TIL and Furin-like domains that might imply diversity of VSPs function (Adam et al., 2010). Also, recently Emery et al. (2016), found that some VSPs that are up regulated during their interaction study have metallopeptidase domain homologous to the virulence factor leishmanolysin and the Bm KX domains and postulate that changes in VSP expression likely represent selection of favorable variants for the host pathogenesis or virulence.

Interestingly in our initial study carried out to identify high molecular weight proteases that are released during the interaction with IEC-6 monolayers the VSP9B10A protein (also known as VSP88 or VSP101074) was identified by MALDI-TOF with a high percentage of identity in a proteolytic spot (Fig. 1, Supplementary Fig. S1). Due to this potential activity of the VSP9B10A protein our study was focused on its structural characterization *in silico* and in defining its role during the host-parasite interaction *in vitro*. Concerning its function, one report shows that while initially the surface of *G. duodenalis* trophozoites displayed VSP1267 antigen it was subsequently replaced by VSP9B10A (Carranza et al., 2002), and other report showed the identification of a VSP9B10A-like gene in a C-8 Mexican clone and present evidence that this VSP is involved in the adhesion of parasite to host cells (Bermudez-Cruz et al., 2004) providing evidence that led us to believe that this protein may be a giardial pathogenicity factor.

As a first approach, a bioinformatics analysis was carried out to

characterize *in silico* the VSP9B10A. This analysis showed differences between theoretical and native molecular weight of the protein as observed in the 2D-SDS zymograms which suggested that the protein undergoes posttranslational modifications that increase its molecular mass. Indeed, *in silico* glycosylation and palmitoylation analyzes showed that this protein has several possible sites for both modifications, although only two are more likely to occur, a glycosylation at Thr 171 and palmitoylation at Cys 735 (Supplementary Fig. S2). In fact these post-translational modifications have been reported in the VSPs and previous reports have indicated that palmitoylation is necessary in the turnover of these antigens, traffic and in their localization in lipid rafts (Hiltbold et al., 2000; Humen et al., 2011; Papanastasiou et al., 1996, 1997) however, more detailed studies are required to establish whether these modifications actually occur in the VSP9B10A protein, its stoichiometry and whether they are necessary for its function.

Subsequent bioinformatics analyses showed that VSP9B10 has a significant alignment with the peptidase C1 (papain family) of the cysteine proteinase family was found although with a moderate identity of 26%. In addition, the VSP9B10A protein has similarity to the proprotein convertase subtilisin/kexin-type 5, a putative cysteine surface protein from *Entamoeba histolytica* and with a metalloproteinase as the leishmanolysin family protein from *Tetrahymena thermophile*, however these comparisons shed low E values (Supplementary Figs. S3–S4). In addition, Furin-Like repeats were found in VSP9B10A sequence. (Supplementary Fig. S4). There are reports showing that these repeats act by processing receptor precursors, growth factors, hormones, zymogens, adhesion molecules and cell surface proteins and also contribute to infectious processes by participating in the maturation of proteins related to viral or bacterial infections (Becker et al., 2012; Bork, 1993; El Najjar et al., 2015; Tian and Jianhua, 2010). These notions suggest that VSP9B10A likely maybe has a role in receptor unmasking on target cells or in protein maturation in *Giardia*. Thus, the characterization of its function is relevant to understand the role of this protein during host-parasite interaction. Also VSP9B190A sequence has VWC (Von Willebrand factor type C) motifs. that have been reported to be involved in binding to soluble and matrix macromolecules that are present in highly glycosylated mucin and the N-terminal propeptides of fibrillar collagens (Bork, 1993), suggesting that this VSP may have a role in the adhesion of the trophozoites to their target cells possibly stabilizing and/or increasing trophozoite adhesion forces since as previously mentioned, there are reports that a VSP9B10A-like protein is involved in the adhesion of trophozoites to epithelial cells (Bermudez-Cruz et al., 2004); thus, an important task will be to unravel its role in parasite-cell relationship.

Finally in the *in silico* characterization, an analysis was carried out to identify possible residues that form a typical catalytic site of proteases as well as a substrate binding site. For this purpose the VSP sequence was aligned with the sequence of leishmanolysin and cysteine protease 1 of *Giardia*, since homology to these the two proteolytic types was detected. *In silico* analysis shows that the high structural similarity between VSP and leishmanolysin might be due to the zinc finger motif present in the VSP9B10A since this protein does not have the active sites residues H264, E265, H268, H334, M345 and the characteristic binding HEXXH motif of metalloproteinases (Elias et al., 2006) (Supplementary Figs. S4–S5). In contrast, the alignment of the VSP9B10A sequences with *Giardia* cysteine protease 1 and human cathepsin B, which have similar S2 binding pocket and the typical catalytic triad (DuBois et al., 2006), showed that VSP9B10A contains an area of homology to these cysteine proteinase. This includes the three conserved cysteine residues, the glycine and glutamic acid residues which help stabilize the binding of substrate to the catalytic site and importantly the

catalytic triad residues: cysteine, histidine and asparagine (Figs. 2 and 3). The search for these residues in the close relatives of VSP9B10A protein showed that this protein is structurally unique because in comparison with the other proteins it has all the residues required to be functional like a cysteine protease (Supplementary Fig. 6), supporting the proteolytic activity observed.

*Giardia* has numerous cysteine proteinases which are at the first branches of divergence in the cathepsin B family (DuBois et al., 2006; Sajid and McKerrow, 2002) and have conserved cysteine residues in positions 14, 49 and 101 and also the binding pocket S2 along to the catalytic triad cysteine-histidine-asparagine (DuBois et al., 2006). The main difference between *Giardia* cysteine proteinases and cathepsin B from higher eukaryotes is the loss of dipeptidyl dipeptidase activity due to an occluding loop that stabilizes the carboxyl terminal end of the peptide substrate and which is responsible for the exopeptidase activity (DuBois et al., 2006). The absence of this loop in cysteine proteinases of *Giardia* confers only endopeptidase activity with specificity for basic residues in the substrate or phenylalanine, glycine is another residue that has an important role in the catalysis and precedes the histidine that helps the catalytic asparagine residue to direct the imidazole ring of histidine (DuBois et al., 2006; Sajid and McKerrow, 2002). In addition to the catalytic triad and the binding pocket residues in the VSP9B10A, we found the three conserved cysteines as well as the glycine and histidine characteristic of cysteine proteases of *Giardia* mentioned before. Also, the spatial arrangement of all these residues is relatively similar in *giardia* and human counterparts as shown in the three-dimensional models (Fig. 3A and C). This allowed us to speculate that the residues at “S2 pocket” and “catalytic cleft” are possible functional sites of proteolysis in the VSP9B10A protein. In addition, the exposure of the catalytic C30 residue juxtaposed to the histidine-adjacent S2 glycine that allows adequate substrate orientation and binding is similar between giardial and prototypical cathepsin B. Based on these observations, we propose that VSP9B10A protein has an intrinsic cysteine endo-proteinase activity that would be its primary role as a cytotoxic factor. More studies are needed to confirm these activities, particularly the evaluation of the activity of this protein in which the postulated residues of the catalytic triad be modified as well as its protease characterization using specific cysteine proteinase inhibitors and substrates.

Based on the above we tested whether a recombinant VP9B10A protein obtained in a bacterial system could display proteolytic activity and interestingly we did not detected proteolysis bands in zymograms. This might be explained by the fact that in bacterial systems the post-transcriptional modifications previously mentioned are not likely performed and these are necessary for the correct protein folding and function of proteolytic enzymes. Nevertheless more studies are necessary to confirm this issue.

In order to establish if VSP9B10A protein could be considered a pathogenicity factor we decided analyze the effect of a population mainly and constitutively expressing this protein during interaction with target cells *in vitro*. For this purpose, WB trophozoites were transfected to avoid the selection mechanism of antigenic variation since the plasmid does not include any endogenous *vsp* promoter or the sequences involved in VSP selection (Adam et al., 2010; Saraiya et al., 2014). In these assays we obtained a trophozoite population that constitutively expressed the VSP9B10A for a long period time (Fig. 4) which allowed us to follow up and to characterize the effect of a population that expresses unequivocally only one VSP protein at a time. To our knowledge, this is the first work in which the use of this technique is reported to determine the effect of a VSP in particular during the interaction of *Giardia* with epithelial cells.

In the two epithelial cells models used, with weak and strong

cell-cell junctions, it was observed that the VSP9B10A transfected trophozoites induced separation of cells from the monolayer leading to cell detachment and consequently to the loss of their normal morphology; in contrast with WB trophozoites that did not induce significant changes in the monolayer, (Figs. 5 and 7), so its effect does not seem to be cell-type dependent. Further analysis showed that similar damages were observed when supernatants of 2 h co-cultures of VSP9B10A transfected trophozoites with IEC-6 cell monolayers were used. Indeed, analysis of the protease profile in the supernatants recovered from each interaction a proteolytic band with experimental weight of 73 kDa that was recognized by the polyclonal mono-specific antibody anti-VSP9B10A (Fig. 6). Further when trophozoites constitutively expressing the VSP9B10A protein were incubated with the anti-VSP9B10A antibody prior to the interaction with the IEC-6 cell monolayer no damage was observed (Fig. 5E). These results along to the fact that the recombinant protein did not show proteolytic activity suggest that the active form of VSP9B10A is the one that is released during the parasite and epithelial cell interaction in a cell-dependent contact manner. The effect of proteases on the surface of the parasite and its activity during the parasite-host interaction have been reported. An example is the EhCPADH112 complex of *Entamoeba histolytica* (Betanzos et al., 2014). It is likely that in *Giardia* VSP9B10A may be acting in a similar way to this antigen that disrupts tight junctions. Further studies including the purification of released VSP9B10A and its proteolytic experimental characterization will validate this hypothesis.

Several studies have reported that *Giardia* trophozoites alter epithelial barrier permeability decreasing transepithelial resistance, inducing modifications on tight junction proteins F-actin, actinin, ZO-1, occludin, claudin-1 and cingulin as well as in proteins of adherent junctions and desmosomes although the severity of these effects seems to be highly variable and apparently strain dependent (Ankarklev et al., 2010; Bhargava et al., 2015; Buret, 2007; Buret et al., 2002; Cevallos et al., 1995; Chin et al., 2002; Humen et al., 2011; Koh et al., 2013; Maia-Brigagao et al., 2012; Mohammed Mahdy et al., 2009; Scott et al., 2002; Shant et al., 2004; Teoh et al., 2000; Troeger et al., 2007). Our results suggest that the damage observed in the epithelial cells is due, at least in part, to the VSP9B10A protein expressed (and released) by transfected trophozoites. The determination of the transepithelial resistance in epithelial cells and quantification of the damage to the integrity of the epithelial barrier induced by these trophozoites that constitutively express the VSP9B10A protein, as well as the determination of the effect on this protein on the tight junction (TJ) proteins are needed to characterize completely the effect of the VSP9B10A.

In this context, some reports have linked pathogenicity and virulence to differences in proteases expressed by each *Giardia* strain/assembly and the secretion of these factors during infection (de Carvalho et al., 2008; Guimaraes et al., 1999, 2003) while other groups propose that these variations may be given by the VSPs that might be involved in a biological selection and immune evasion (Emery et al., 2014; Prucca and Lujan, 2009). As mentioned, it has recently been postulated that changes in VSPs expression likely represent a selection of favorable variants for the host pathogenesis or parasite virulence (Emery et al., 2016). This together with the fact that some *Giardia* cysteine proteinases are involved in the adhesion to target cells (Hernandez-Sanchez et al., 2008) and that cathepsin B induces cleavage of villin a cytoskeletal protein and modulate the inflammatory host response indicate a crucial role for proteases in host-parasite interactions. In addition, a key role for cysteine proteases in *Giardia* encystation and excystation has been reported (Bhargava et al., 2015; Cotton et al., 2014; Ward et al., 1997). In this context the VSP9B10A protein would be the first VSP protein of

*Giardia* identified as a pathogenicity factor causing damage to the integrity of epithelial cell monolayers, hence it is important to determine the molecular mechanisms involved in the damage observed in the epithelial cells.

Regarding the role of the VSP9B10A protein in the host-parasite interaction, it has been observed that cysteine proteinases in many parasites are critical in the parasite's life cycle and pathogenic processes like adhesion, cyto-adherence, immune evasion, enzyme activation, virulence, tissue invasion, encystation, excystation, hatching and molting (McKerrow, 1989; McKerrow et al., 2006; Piña-Vazquez et al., 2012; Rosenthal, 1999). In parasites like *Plasmodium falciparum*, or bacteria *Neisseria gonorrhoea* and *Borrelia hermsii* exist a family of genes similar to *vsp* that encode proteins that are involved in adherence to host cells, the onset of several symptoms of Malaria and the variation in the expression from one *var* gene to another can change the adhesion characteristics of these parasites (Lanzer et al., 1995; Nielsen et al., 2002). Thus the *Giardia* VSP9B10A may play a role as virulence factor during the host-parasite relationship and can also be considered as a possible drug target.

The present work has limitations because the direct proteolytic activity of VSP9B10A protein over an epithelial cell-derived substrate was not confirmed. However we show that interaction of trophozoites that constitutively express the VSP9B10A protein generates cytotoxic damage in IEC-6 and MDCK monolayers apparently due to the release of this protein with a putative cysteine protease activity. As far as we know, there is not precedent in which the effect of a homogenous VSP trophozoites population has been analyzed during the host-parasite interaction. Based in this we consider that this work opens lines of research to further analyze the role of VSPs during the infection. Also this is the first report of a non-canonical activity of a *Giardia* VSP and its participation in the pathophysiology of giardiasis. We are currently working in the molecular identification of proteolytic activity of this VSP and analyzing its effects, particularly on tight and adherent junction proteins of epithelial cells. Also the pathogenicity of VSP9B10A transfected trophozoites is currently under analysis using experimental models for giardiasis.

#### Note

"Supplementary data associated with this article.

#### Funding information

This work was supported in part by Fondo SEP – CONACYT Grant number No. 128426. Ariana Cabrera Licona was a recipient of a CONACYT fellowship 225440.

#### Acknowledgements

We would like to thank Guillermo Mendoza for his support in the proteomic analyses, Blanca Herrera Ramirez for technical assistance and Arturo Pérez Taylor Reyes for the art work. We are grateful to Emma Saavedra Lira for critically reading this manuscript and for her help in the English language.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2017.06.006>.

#### References

Adam, R.D., Nigam, A., Seshadri, V., Martens, C.A., Farneth, G.A., Morrison, H.G.,

- Nash, T.E., Porcella, S.F., Patel, R., 2010. The *Giardia lamblia* vsp gene repertoire: characteristics, genomic organization, and evolution. *BMC Genomics* 11, 1471–2164.
- Ankarklev, J., Jerlstrom-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., Svard, S.G., 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 413–422.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T., 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 22, 195–201.
- Banik, S., Renner Viveros, P., Seeber, F., Klotz, C., Ignatius, R., Aebischer, T., 2013. *Giardia duodenalis* arginine deiminase modulates the phenotype and cytokine secretion of human dendritic cells by depletion of arginine and formation of ammonia. *Infect. Immunol.* 81, 2309–2317.
- Becker, G.L., Lu, Y., Harges, K., Strehlow, B., Levesque, C., Lindberg, I., Sandvig, K., Bakowsky, U., Day, R., Garten, W., Steinmetzer, T., 2012. Highly potent inhibitors of proprotein convertase furin as potential drugs for treatment of infectious diseases. *J. Biol. Chem.* 287, 21992–22003.
- Belosevic, M., Faubert, G.M., MacLean, J.D., 1989. Disaccharidase activity in the small intestine of gerbils (*Meriones unguiculatus*) during primary and challenge infections with *Giardia lamblia*. *Gut* 30, 1213–1219.
- Bermudez-Cruz, R.M., Ortega-Pierres, G., Ceja, V., Coral-Vazquez, R., Fonseca, R., Cervantes, L., Sanchez, A., Depardon, F., Newport, G., Montanez, C., 2004. A 63 kDa VSP9B10A-like protein expressed in a C-8 *Giardia duodenalis* Mexican clone. *Arch. Med. Res.* 35, 199–208.
- Betzanos, A., Schnoor, M., Javier-Reyna, R., Garcia-Rivera, G., Banuelos, C., Páiz-Morales, J., Orozco, E., 2014. Analysis of the epithelial damage produced by *Entamoeba histolytica* infection. *J. Vis. Exp.* 12, 51668.
- Bhargava, A., Cotton, J.A., Dixon, B.R., Gedamu, L., Yates, R.M., Buret, A.G., 2015. *Giardia duodenalis* surface cysteine proteases induce cleavage of the intestinal epithelial cytoskeletal protein villin via myosin light chain kinase. *PLoS One* 10, e0157336.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T.G., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T., 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids Res.* 42, W252–W258.
- Bork, P., 1993. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett.* 327, 125–130.
- Buret, A., Gall, D.G., Olson, M.E., 1990. Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology, and disaccharidase activity. *J. Parasitol.* 76, 403–409.
- Buret, A., Gall, D.G., Olson, M.E., 1991. Growth, activities of enzymes in the small intestine, and ultrastructure of microvillous border in gerbils infected with *Giardia duodenalis*. *Parasitol. Res.* 77, 109–114.
- Buret, A., Hardin, J.A., Olson, M.E., Gall, D.G., 1992. Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. *Gastroenterology* 103, 506–513.
- Buret, A.G., 2007. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut* 56, 316–317.
- Buret, A.G., 2008. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. *Parasite* 15, 261–265.
- Buret, A.G., Mitchell, K., Muench, D.G., Scott, K.G., 2002. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology* 125, 11–19.
- Carranza, P.G., Feltes, G., Ropolo, A., Quintana, S.M., Touz, M.C., Lujan, H.D., 2002. Simultaneous expression of different variant-specific surface proteins in single *Giardia lamblia* trophozoites during encystation. *Infect. Immunol.* 70, 5265–5268.
- Cevallos, A., Carnaby, S., James, M., Farthing, J.G., 1995. Small intestinal injury in a neonatal rat model of giardiasis is strain dependent. *Gastroenterology* 109, 766–773.
- Coradi, S.T., Guimaraes, S., 2006. *Giardia duodenalis*: protein substrates degradation by trophozoite proteases. *Parasitol. Res.* 99, 131–136.
- Cotton, J.A., Beatty, J.K., Buret, A.G., 2011. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int. J. Parasitol.* 41, 925–933.
- Cotton, J.A., Bhargava, A., Ferraz, J.G., Yates, R.M., Beck, P.L., Buret, A.G., 2014. *Giardia duodenalis* cathepsin B proteases degrade intestinal epithelial interleukin-8 and attenuate interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis. *Infect. Immunol.* 82, 2772–2787.
- Chavez, B., Gonzalez-Mariscal, L., Cedillo-Rivera, R., Martinez-Palomo, A., 1995. *Giardia lamblia*: in vitro cytopathic effect of human isolates. *Exp. Parasitol.* 80, 133–138.
- Chin, A.C., Teoh, D.A., Scott, K.G., Meddings, J.B., Macnaughton, W.K., Buret, A.G., 2002. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect. Immunol.* 70, 3673–3680.
- Daniels, C.W., Belosevic, M., 1992. Disaccharidase activity in the small intestine of susceptible and resistant mice after primary and challenge infections with *Giardia muris*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 382–390.
- Daniels, C.W., Belosevic, M., 1995. Comparison of the course of infection with *Giardia muris* in male and female mice. *Int. J. Parasitol.* 25, 131–135.
- de Carvalho, T.B., David, E.B., Coradi, S.T., Guimaraes, S., 2008. Protease activity in extracellular products secreted in vitro by trophozoites of *Giardia duodenalis*. *Parasitol. Res.* 104, 185–190.
- de Castro, E., Sigris, C.J., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P.S., Gasteiger, E., Bairoch, A., Hulo, N., 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic acids Res.* 34, W362–W365.
- DuBois, K.N., Abodeely, M., Sajid, M., Engel, J.C., McKerrow, J.H., 2006. *Giardia lamblia* cysteine proteases. *Parasitol. Res.* 99, 313–316.
- Dukes, J.D., Whitley, P., Chalmers, A.D., 2011. The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biol.* 12, 43. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2121-12-43>.
- Eckmann, L., 2003. Mucosal defences against *giardia*. *Parasite Immunol.* 25, 259–270.
- Eckmann, L., Gillin, F.D., 2001. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280, G1–G6.
- El Najjar, F., Lampe, L., Baker, M.L., Wang, L.F., Dutch, R.E., 2015. Analysis of cathepsin and furin proteolytic enzymes involved in viral fusion protein activation in cells of the bat reservoir host. *PLoS one* 10, e0115736.
- Elias, C.G., Pereira, F.M., Silva, B.A., Alviano, C.S., Soares, R.M., Santos, A.L., 2006. Leishmanolysin (gp63 metallopeptidase)-like activity extracellularly released by *Herpetomonas samuelpessoai*. *Parasitology* 132, 37–47.
- Emery, S.J., Mirzaei, M., Vuong, D., Pascovici, D., Chick, J.M., Lacey, E., Haynes, P.A., 2016. Induction of virulence factors in *Giardia duodenalis* independent of host attachment. *Sci Rep* 6.
- Emery, S.J., van Sluyter, S., Haynes, P.A., 2014. Proteomic analysis in *Giardia duodenalis* yields insights into strain virulence and antigenic variation. *Proteomics* 14, 2523–2534.
- Favennec, L., Magne, D., Gobert, J.G., 1991. Cytopathogenic effect of *Giardia intestinalis*, in vitro. *Parasitol Today* 7 (6), 141, 1991 Jun.
- Ferella, M., Davids, B.J., Cipriano, M.J., Birkeland, S.R., Palm, D., Gillin, F.D., McArthur, A.G., Svard, S., 2014. Gene expression changes during *Giardia*-host cell interactions in serum-free medium. *Mol. Biochem. Parasitol.* 197, 21–23.
- Gillin, F.D., Hagblom, P., Harwood, J., Aley, S.B., Reiner, D.S., McCaffery, M., So, M., Guiney, D.G., 1990. Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4463–4467.
- Gorowara, S., Ganguly, N.K., Mahajan, R.C., Walia, B.N., 1992. Study on the mechanism of *Giardia lamblia* induced diarrhoea in mice. *Biochim. Biophys. Acta* 14, 122–126.
- Guimaraes, S., Sogayar, M.I., de Franco, M.F., 1999. *Giardia duodenalis*: inter-strain variability of proteins, antigens, proteases, isoenzymes and nucleic acids. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 41, 45–58.
- Guimaraes, S., Sogayar, M.I., Franco, M.F., 2003. Protease activity in *Giardia duodenalis* trophozoites of axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 77–81.
- Guo, F., Ortega-Pierres, G., Arguello-Garcia, R., Zhang, H., Zhu, G., 2015. *Giardia* fatty acyl-CoA synthetases as potential drug targets. *Front Microbiol* 6.
- Gupta, R., Brunak, S., 2002. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. In: Pacific Symposium on Bio-computing. Pacific Symposium on Bio-computing, pp. 310–322.
- Halliez, M.C., Buret, A.G., 2013. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J. Gastroenterol.* 19, 8974–8985.
- Hernandez-Sanchez, J., Linan, R.F., Salinas-Tobon Mdel, R., Ortega-Pierres, G., 2008. *Giardia duodenalis*: adhesion-deficient clones have reduced ability to establish infection in Mongolian gerbils. *Exp. Parasitol.* 119, 364–372.
- Hiltbold, A., Frey, M., Hulsmeier, A., Kohler, P., 2000. Glycosylation and palmitoylation are common modifications of *giardia* variant surface proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 109, 61–65.
- Holberton, D.V., 1973. Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. *J. Cell Sci.* 13, 11–41.
- Humen, M.A., Perez, P.F., Lievin-Le Moal, V., 2011. Lipid raft-dependent adhesion of *Giardia intestinalis* trophozoites to a cultured human enterocyte-like Caco-2/TC7 cell monolayer leads to cytoskeleton-dependent functional injuries. *Cell Microbiol.* 13, 1683–1702.
- Huynh, M.H., Harper, J.M., Carruthers, V.B., 2006. Preparing for an invasion: charting the pathway of adhesion proteins to *Toxoplasma* micronemes. *Parasitol. Res.* 98, 389–395.
- Jerlstrom-Hultqvist, J., Stadelmann, B., Birkestet, S., Hellman, U., Svard, S.G., 2012. Plasmid vectors for proteomic analyses in *Giardia*: purification of virulence factors and analysis of the proteasome. *Eukaryot. Cell* 11, 864–873.
- Jimenez, J.C., Fontaine, J., Grzych, J.M., Capron, M., Dei-Cas, E., 2009. Antibody and cytokine responses in BALB/c mice immunized with the excreted/secreted proteins of *Giardia intestinalis*: the role of cysteine proteases. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 103, 693–703.
- Jimenez, J.C., Fontaine, J., Grzych, J.M., Dei-Cas, E., Capron, M., 2004. Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. *Clin. Diagn. Immunol.* 11, 152–160.
- Jimenez, J.C., Uzcanga, G., Zambrano, A., Di Prisco, M.C., Lynch, N.R., 2000. Identification and partial characterization of excretory/secretory products with proteolytic activity in *Giardia intestinalis*. *J. Parasitol.* 86, 859–862.
- Kaur, H., Ghosh, S., Samra, H., Vinayak, V.K., Ganguly, N.K., 2001. Identification and characterization of an excretory-secretory product from *Giardia lamblia*. *Parasitology* 123, 347–356.
- Koh, W.H., Geurden, T., Paget, T., O'Handley, R., Steuart, R.F., Thompson, R.C., Buret, A.G., 2013. *Giardia duodenalis* assemblage-specific induction of apoptosis and tight junction disruption in human intestinal epithelial cells: effects of mixed infections. *J. Parasitol.* 99, 353–358.
- Lane, S., Lloyd, D., 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 123–147.
- Lanzer, M., Fischer, K., Le Blancq, S.M., 1995. Parasitism and chromosome dynamics