



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“Construcción de un sistema de silenciamiento inducible para genes de factores de virulencia enolasa y Catepsina tipo B de *Giardia duodenalis*.”

T E S I S

Que presenta

IBT. ROLANDO INZUNZA ARROYO

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directora de la Tesis:

Dra. María Guadalupe Ortega Pierres

Ciudad de México

Diciembre, 2017

El presente proyecto fue realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. María Guadalupe Ortega Pierres, y la asesoría de la Dra. Rosa María del Refugio Bermúdez Cruz y el Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe.

Este trabajo fue posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, mediante el otorgamiento de la beca con número de registro 591199.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado que hizo posible la realización de este proyecto.

A la Dra. Guadalupe Ortega por haberme aceptado en su equipo de trabajo y por haberme proporcionado todas las herramientas necesarias y el invaluable apoyo, tanto moral como profesional, para mi formación y para el cumplimiento de mis objetivos.

A la Dra. Rosa María Bermúdez y al Dr. Luis Kameyama por su excelente asesoría, guía y profunda enseñanza.

A la bióloga Rocío Fonseca por haber sido siempre un gran ejemplo de profesionalismo y haber hecho más provechosa mi labor y formación al brindarme su gran apoyo y experiencia.

A Arturo, Blanca, Isabel y al Dr. Raúl por su indispensable labor en el equipo de trabajo, apoyo, compañía, consejos y empatía,

A la Dra. Luisa Bazán y al equipo de trabajo de la Dra. Bermúdez, Mariana, Ulises, Eduardo, Sara y Loan por su amistad y por haberme compartido siempre sus consejos, experiencias, invaluable apoyo y guía.

Al Dr. Javier Hernández por su gran labor y ayuda en la consumación de mi proyecto de maestría.

A Gabriela Mora y a Lupita Aguilar porque gracias a su trabajo y eficiencia en el apoyo secretarial y de secuenciación se facilitó en trabajo realizado.

A mis compañeros de generación y departamento, por haber compartido conmigo dos de los mejores años de mi vida y por haberme exigido a través de su amistad y talento superarme a mí mismo y ser mejor persona, día con día.

A mis amigos del laboratorio, Yéssica, Rodrigo y Edar por haber hecho de mi tiempo en CIVNESTAV la mejor y más gratificante experiencia que he vivido, por nuestros momentos felices, por su incondicional compañía y ayuda en la adversidad, por haber dejado en mí recuerdos y enseñanzas que conservaré y apreciaré profundamente por el resto de mis días.

A mi hermana Verónica y a mi padre Ezequiel, porque ellos son el motor de mi vida y mi fuerza de voluntad, de mi deseo de llegar más lejos, porque a ellos debo los valores y virtudes con los cuales vivo y el éxito que éstos me han permitido conseguir, y el sustento para lograrlo.

A Teresita, mi madre, por ser la razón por la que existo, porque le debo la vida, porque gracias a ella soy quien soy y he logrado lo que he logrado, por ser mi inspiración. Dedico este trabajo a su memoria.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Giardia duodenalis y giardiasis	3
Generalidades	3
Ciclo de vida	5
Epidemiología	8
Diagnóstico y tratamiento	9
Respuesta inmune.....	10
Genoma y ensamblajes.....	13
Mecanismos de virulencia de Giardia y su impacto en la homeostasis y microbiota intestinal.....	15
Factores de virulencia en Giardia duodenalis	17
Enzima catepsina B.....	18
Enzima enolasa	19
Modelos de estudio in vitro para analizar la interacción Giardia-célula epitelial (IEC-6, MDCK, Caco-2).....	20
Metodologías para el silenciamiento de genes y su importancia	23
Sistema de ARN de interferencia.....	26
ANTECEDENTES DIRECTOS.....	29
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	31
Objetivo general.....	31
Objetivos específicos	31
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS	34
Diseño de oligonucleótidos para ARN antisentido y obtención de secuencias antisentido.....	34
Preparación de células quimiocompetentes de Escherichia coli Δ H5 α	36
Clonación en el vector de transición pJET1.2/Blunt.....	37
PCR de colonias candidatas.....	38

Clonación en el vector pNlop4	38
Transfección de trofozoitos de G. duodenalis con el vector.....	39
Evaluación de la eficiencia de silenciamiento específico	40
Ensayos de interacción con monocapas de células IEC-6	44
Zimogramas para evaluar actividad proteolítica.....	45
RESULTADOS	46
Diseño de oligonucleótidos para ARN antisentido y obtención de secuencias antisentido.....	46
Clonación en el vector de transición pJET1.2/Blunt y PCR de colonias candidatas ..	49
Clonación del inserto antisentido en el vector pNlop4 y comprobación de identidad e integridad de secuencia	51
Evaluación de la eficiencia de silenciamiento	62
Evaluación del efecto del silenciamiento de Catepsina tipo B de G. duodenalis empleando modelos de interacción con células epiteliales.....	66
Evaluación de la actividad proteolítica de los sobrenadantes del ensayo de interacción.....	69
DISCUSIÓN	71
CONCLUSIONES.....	77
PERSPECTIVAS.....	78
Referencias	79

RESUMEN

El primer paso para el desarrollo de la patogénesis de la giardiasis es la adhesión de trofozoítos al epitelio intestinal del hospedero. Este es esencial para la colonización del intestino delgado por este parásito lo cual causa las disfunciones fisiológicas en el tejido epitelial asociadas con la giardiasis. La adhesión es un proceso multifactorial en el que participan varias estructuras del trofozoíto, así como componentes de superficie no metabólicos como las proteínas variables de superficie, la ornitina carbamoil transferasa y la Catepsina tipo B y metabólicos como la Arginina deiminasa y la Enolasa. En estudios previos se ha observado que cuando la Catepsina tipo B (GdCatB) o la enolasa recombinante de *G. duodenalis* (GdEno) se adicionaron a monocapas de células epiteliales se genera daño en éstas caracterizado por la separación de las células entre si y del sustrato así como la formación de cuerpos apoptóticos. Una de las estrategias para evaluar el papel de la GdCatB y la GdEno como potenciales factores de virulencia es mediante el empleo de estrategias de silenciamiento génico por ARN antisentido. Este sistema consiste en la utilización de un vector que expresa un ARN reverso complementario a la secuencia del gen que se desea silenciar y que, al unirse este ARN con el ARN mensajero del gen analizado, se genera un bloqueo transcripcional, así como la activación de mecanismos de degradación específica mediante ARNasas de doble cadena, entre otros, teniendo como consecuencia la disminución de la cantidad de transcrito y por tanto, la cantidad de proteína sintetizada. En este proyecto, se empleó el silenciamiento génico por ARN antisentido de los genes GdCatB y GdEno empleando para ello vectores que contienen un inserto antisentido para cada gen cuya expresión se ve regulada mediante el el promtor P1 y 2 operadores tet1 y tet2 sensible a la inducción por doxiciclina. La evaluación de la eficiencia de cada sistema mediante Western blot mostró un 63% y 66% de reducción en la expresión protéica para cada gen respectivamente. Así mismo el silenciamiento de estos genes se evaluó en ensayos funcionales de interacción de los trofozoítos transfectados con monocapas de células IEC-6 y por zimogramas para medir la actividad proteolítica de la GdCatB. Los resultados mostraron que el silenciamiento de este gen se asocia con una reducción cualitativa del daño en las monocapas incubadas con los trofozoítos en los que se silenció el gen GdCatB. Estos resultados mostraron que la catepsina B puede considerarse como un factor de virulencia en el desarrollo de la patogénesis de la giardiasis.

ABSTRACT

The first step for the development of the pathogenesis of giardiasis is the adhesion of trophozoites to the intestinal epithelium of the host. This is essential for the colonization of the small intestine by this parasite which causes the physiological dysfunctions in the epithelial tissue associated with giardiasis. Adhesion is a multifactorial process involving several structures of the trophozoite, as well as non-metabolic surface components such as variable surface proteins, ornithine carbomoyl transferase and cathepsin type B and metabolites such as Arginine deiminase and Enolase. In previous studies it was observed that when cathepsin type B (GdCatB) or the recombinant enolase of *G. duodenalis* (GdEno) were added to monolayers of epithelial cells, damage was generated in these cells that was characterized by the separation of the cells from each other and from the substrate as well as the formation of apoptotic bodies. One of the strategies to evaluate the role of GdCatB and GdEno as potential virulence factors is through the use of gene silencing strategies by antisense RNA. This system consists on the use of a vector that expresses a reverse RNA complementary to the sequence of the gene to be silenced and when this RNA is united with the messenger RNA of the gene analyzed, a transcriptional block is generated, as well as the activation of mechanisms of specific degradation by double-stranded RNAases, among others. The consequence of this is a decrease in the amount of transcript and, therefore, in the amount of protein synthesized. In this project, gene silencing by antisense RNA of the GdCatB and GdEno genes was employed using vectors containing an antisense insert for each gene whose expression is regulated by the tet operon (P1 promoter and two operators tet1 and tet2) sensitive to induction by doxycycline. The evaluation of the efficiency of each system by Western blot showed 63% and 66% reduction in protein expression for each gene respectively. Likewise, the silencing of these genes was evaluated in functional tests of interaction of the trophozoites transfected with IEC-6 cells monolayers and by zymograms to measure the proteolytic activity of GdCatB. The results showed that the silencing of this gene is associated with a qualitative reduction of the damage in the monolayers incubated with the trophozoites in which the GdCatB gene was silenced. These results showed that cathepsin B can be considered as a virulence factor in the development of the pathogenesis of giardiasis.

INTRODUCCIÓN

***Giardia duodenalis* y giardiasis**

Generalidades

Giardia duodenalis (sinónimos *G. intestinalis* y *G. lamblia*), es un protozooario y parásito entérico, microaerofílico facultativo, diplozóico y flagelado, perteneciente al Phylum Metamonada, orden Diplomonadida, familia Hexamitidae. Este protozooario fue descubierto en 1681 por el científico holandés Antonie van Leeuwenhoek y descrito por vez primera en 1859 por el médico checo Vilém Dušan Lambl (Luján & Svärd, 2011). En la década de los noventa, por medio de análisis filogenéticos de proteínas se identificó a *G. duodenalis* como un organismo eucarionte de divergencia temprana debido a que tiene un mayor número de relaciones filogenéticas con procariontes, en comparación con otras especies de eucariontes inferiores (Hashimoto, et al., 1994). Aunado a lo anterior, destaca la simplicidad de las rutas metabólicas y otros procesos celulares que posee el género, como la incorporación de dominios individuales de enzimas similares a los de bacterias y arqueas, así como un repertorio metabólico limitado, característico de los parásitos. Así mismo, las maquinarias de síntesis de ADN, procesamiento de ARN y ciclo celular que posee son de menor complejidad que aquellas encontradas en otros eucariontes inferiores como levaduras. En *Giardia*, la similitud con arqueas se extiende a la presencia de dos proteínas de reconocimiento de origen de replicación (Orc4 y Orc1/Cdc6), junto con la ausencia de proteínas reguladoras de iniciación (Cdt1, Dpb11, Cdc45, MCM10, Gemini), así como a la similitud en la composición de las polimerasas ϵ y δ (Morrison, et al., 2007).

Entre las principales características fisiológicas del género *Giardia*; se encuentran el poseer dos núcleos diploides transcripcionalmente activos, la ausencia de mitocondrias y peroxisomas, así como la presencia de un organelo de adhesión llamado disco ventral, mismo que distingue a *Giardia* del resto de los Hexamitidae (Luján & Svärd, 2011). En fechas recientes, se ha comprobado por medio de análisis moleculares que dichas características, consideradas primitivas, tales como la ausencia de mitocondrias, son consecuencia de pérdida secundaria y no de la divergencia de un eucarionte ancestral previo a la adquisición de este organelo (Embley & Hirt, 1998). Otros estudios

han mostrado que *Giardia* pudo haber adquirido genes por transferencia lateral de diversos orígenes, incluidas las bacterias (Andersson, et al., 2003) y arqueas (Suguri, et al., 2001), lo cual ha complicado su clasificación con respecto a otras especies en análisis filogenéticos.

Con respecto a la morfología y morfometría de *Giardia*, el parásito cuenta con dos estadios principales el trofozoíto y el quiste. El trofozoíto tiene forma piriforme, mide entre 12 y 18 μm de largo, de 6 a 9 μm de ancho y de 2 a 4 μm de grosor, posee dos núcleos localizados en la parte anterior, una superficie dorsal convexa y otra ventral plana. En ésta última se encuentra el disco ventral cóncavo que le permite a *Giardia* adherirse a la superficie de los enterocitos en el intestino delgado del hospedero. Además, el trofozoíto posee cuatro pares de flagelos dispuestos de forma simétrica bilateral y dirigidos de forma caudal, y dos cuerpos medios con forma de garra-martillo en la porción media del organismo. Por otro lado, el quiste posee forma elipsoide-oval, es incoloro y retráctil con una pared que lo protege, cuatro núcleos agrupados en uno de los polos del organismo, axonemas flagelos dispuestos de forma diagonal a través del eje largo del quiste, y dos cuerpos crecientes que corresponden a fragmentos del disco ventral, dispuestos de forma transversal en la porción media del organismo. El quiste mide de 8 a 14 μm de largo y de 6 a 10 μm de ancho (Luján & Svärd, 2011).

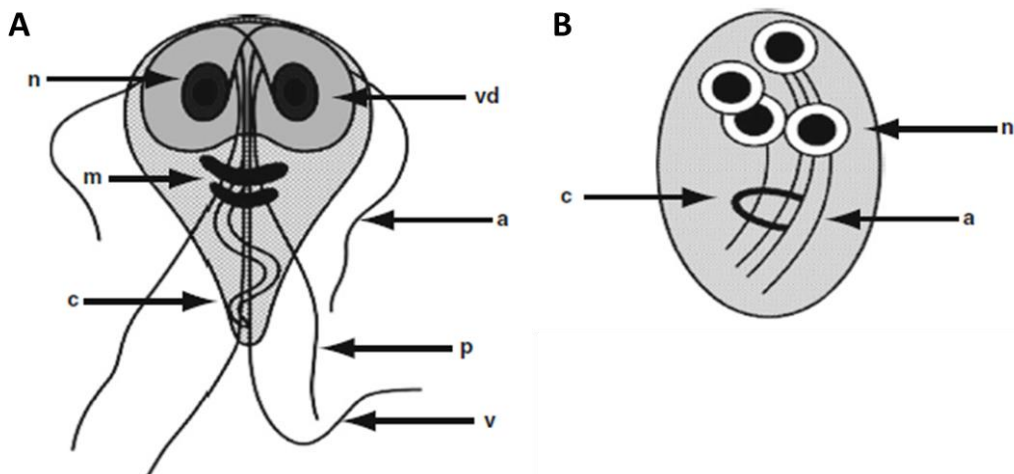


Figura 1. Morfología del trofozoíto (A) y quiste (B) de *G. duodenalis*. Acotación en A: a) flagelo lateral anterior, c) flagelo caudal, m) cuerpos medios, n) núcleo, p) flagelo lateral posterior, v) flagelo ventral, vd) disco ventral. Acotación en B: a) axonema flagelar,

c) fragmentos crecientes del disco ventral, n) núcleo. Modificada de (Luján & Svärd, 2011).

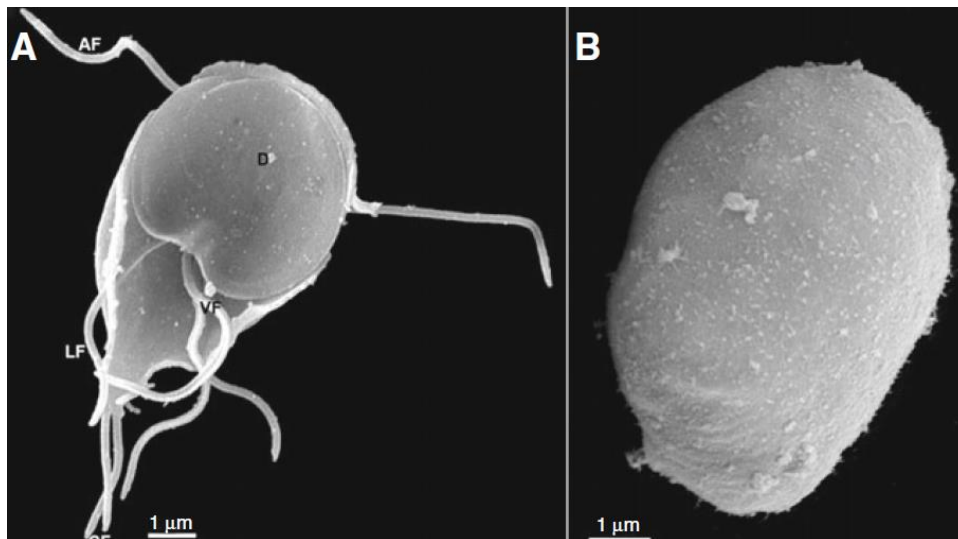


Figura 2. Micrográficas con la técnica de microscopía electrónica de barrido de un trofozoíto (A) y un quiste (B) de *G. duodenalis*. Acotación: D) disco ventral, AF) flagelos anteriores, LF) flagelos laterales posteriores, VF) flagelos ventrales, CF) flagelos caudales. Tomada de (Luján & Svärd, 2011).

Ciclo de vida

La principal vía de transmisión de giardiasis, infección causada por *G. duodenalis* es fecal-oral. La infección inicia con la ingestión de quistes de *G. duodenalis*, los cuales pasan por un proceso de desenquistamiento y liberación de exquistos que poseen forma oval, ocho flagelos y un metabolismo intermedio entre un quiste y un trofozoíto. Estos últimos corresponden a la forma vegetativa de *Giardia* e invaden la parte superior del intestino delgado y se diferencian a quistes una vez que salen de esta región del huésped cuando las condiciones son adversas para su metabolismo. Esta característica la comparte con otros protozoarios parasíticos gastrointestinales tales como *Cryptosporidium parvum* y *Entamoeba histolytica*. No obstante, una característica distintiva de *Giardia* es la ploidía de su genoma la cual varía durante su ciclo de vida. Se ha demostrado que, durante el crecimiento vegetativo, la ploidía de cada uno de los dos núcleos de *Giardia* oscila sincrónicamente entre diploide y tetraploide, dando lugar a ploidías celulares de 4N y 8N respectivamente. Esto tiene un gran impacto en la

diferenciación del parásito, ya que varios estudios han sugerido que proteínas que participan en el ciclo celular tienen un papel importante en la transición de un estado a otro a través del arresto del mismo. Esto último asegura que el genoma se replique al menos una vez en cada ciclo celular, siendo de gran importancia la replicación del ADN en el proceso de enquistamiento, así como lo es la citocinesis en el desenquistamiento (Roxström-Lindquist, et al., 2006) (Svärd, et al., 2002).

El proceso de enquistamiento inicia cuando los trofozoítos migran a la parte inferior del intestino delgado, donde se exponen a un pH y concentraciones de sales biliares mayores. Este puede llevarse a cabo *in vitro* mediante el cultivo de trofozoítos a un pH de 7.8 y bajas concentraciones de colesterol. En este punto, el ciclo celular de *Giardia* es detenido previo al inicio de la fase M, lo que genera un aumento de la población celular en G2/M y una disminución de células en G1. Este proceso puede dividirse en etapa temprana y tardía. Durante la primera ocurre una serie de cambios fisiológicos y morfológicos en el trofozoíto, entre los cuales se encuentran el arresto de la división celular, reducción gradual en el consumo de oxígeno y glucosa, modificaciones en el transporte proteico (particularmente de componentes de la pared superficial del quiste), expresión génica y ultra-estructura, adquisición de una forma redondeada y pierden la capacidad de adherirse a superficies debido a que el disco ventral se fragmenta en cuatro estructuras con forma de creciente. Por otra parte, la etapa tardía del enquistamiento consiste en una ronda de replicación del ADN seguida de división nuclear más no celular en un proceso conocido como endo-replicación. Este ocurre debido a la represión de la actividad de Cdk previa a la citocinesis, dando lugar a una célula polinucleada (Svärd, et al., 2002).

Finalmente, durante el proceso de desenquistamiento se observa una rápida diferenciación de los quistes a trofozoítos. Esto puede ser inducido *in vitro* al exponer los quistes de *Giardia* a pH ácido (condición similar a la estomacal), aunado a la presencia de proteasas pancreáticas en solución ligeramente alcalina (condición similar a la del intestino delgado). La exposición a estos factores activa cadenas de señalización en el quiste en las que participan la desfosforilación de proteínas por fosfatasa lisosomal ácida y de proteínas calmodulinas y PKA, por tanto, se ha sugerido que la señalización por

calcio es de gran importancia para la transducción de señales en el desenquistamiento. Al inicio de este proceso se observa un aumento del espacio peritrófico y la separación del trofozoíto de la pared del quiste, seguido por la liberación de cisteína-proteasas desde vacuolas periféricas hacia el espacio entre el quiste y el trofozoíto, la aparición de flagelos desde la zona polar del quiste y la liberación total de la célula. Al término de este proceso, la célula, identificada como excizoíto, posee ocho flagelos y cuatro núcleos diploides, dando lugar a una ploidía genómica de $16N$, mientras que su metabolismo es intermedio entre el de un trofozoíto y el de un quiste. Posteriormente, el excizoíto se divide dos veces, formando cuatro trofozoítos con dos núcleos diploides cada uno. Las etapas ya mencionadas del ciclo de vida de *Giardia* se representan en la siguiente imagen (Svärd, et al., 2002).

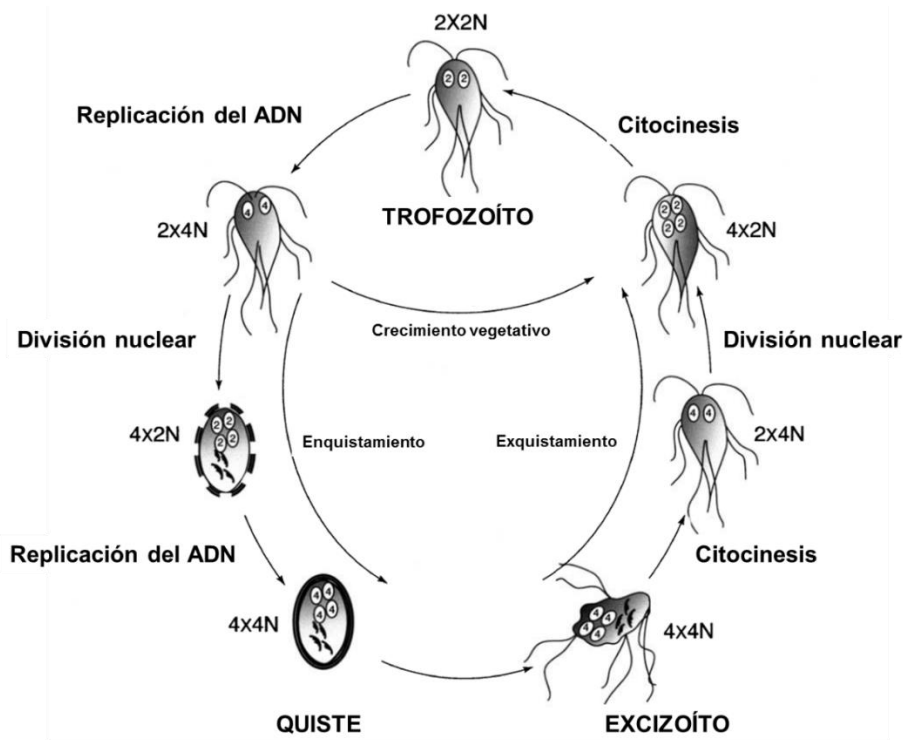


Figura 3. Ciclo de vida de *G. duodenalis*. Modificada de (Svärd, et al., 2002).



Figura 4. Ciclo celular de *G. duodenalis*. Acotación: 1) trofozoíto, 2) enquistamiento, 3) quiste, 4) excistamiento temprano, 5) excistamiento tardío, 6) excizoítos en citocinesis. Tomada de (Luján & Svärd, 2011).

Epidemiología

Giardia es uno de los patógenos parasitarios gastrointestinales que con mayor frecuencia infectan a animales y humanos alrededor del mundo (Feng & Xiao, 2011), de ahí la importancia de su estudio. Dicha infección, conocida como giardiasis, se adquiere por la ingestión de quistes presentes en alimentos y agua potable o recreacional contaminados por materia fecal de animales o personas infectadas. Así mismo, a pesar de que la mayoría de las infecciones son asintomáticas, los principales síntomas de esta enfermedad incluyen diarrea crónica, dolor abdominal, inflamación estomacal, fatiga y pérdida de peso (World Health Organization, 2016). La giardiasis puede catalogarse como una enfermedad tropical desatendida (Savioli, et al., 2006), afectando aproximadamente a doscientos millones de individuos en América Latina, Asia y África, y registrando anualmente alrededor de quinientos mil casos nuevos de esta enfermedad en su forma sintomática (Mbae, et al., 2016). Entre los individuos con mayor vulnerabilidad a adquirir la infección se encuentran niños de entre 1 a 4 y de 5 a 9 años de edad, siendo este grupo en el que se reporta el mayor número de casos de giardiasis (Luján & Svärd, 2011). Un segundo grupo corresponde al de individuos inmuno-

suprimidos a consecuencia de infecciones con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), aquellos que presentan desnutrición o que son sometidos a tratamientos quimioterapéuticos. Esto debido a que la disminución en el número de células CD4+ tiende a una inmunosupresión progresiva y riesgo de presentar síntomas como diarrea crónica a consecuencia de infección por parásitos oportunistas (Dwivedi, et al., 2007). Otros factores de riesgo implicados en una mayor incidencia en giardiasis son: viajar al extranjero (especialmente a zonas con alta prevalencia), contacto con aguas superficiales y animales (Faustini, et al., 2001) (Espelage, et al., 2010), y el personal involucrado en el cuidado de la higiene de infantes (Hoque, et al., 2001).

Diagnóstico y tratamiento

La manifestación de síntomas mencionados anteriormente coincide con los observados en otras infecciones parasíticas y bacterianas intestinales. No obstante, si dichos síntomas persisten posterior al tratamiento con antibióticos o con coccidiostáticos, puede ser indicativo de infección por *Giardia*. Debido a la variabilidad de los síntomas, el diagnóstico de giardiasis debe ser confirmado mediante la detección del parásito en muestras fecales por medio de exámenes microscópicos y de flotación, ensayos de inmunofluorescencia para detectar antígenos (IFA) parasitarios específicos, ensayos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) o inmunocromatografía rápida cualitativa de fase sólida, así como por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dirigida a genes de diagnóstico común tales como el 18S ribosomal (Luján & Svärd, 2011).

Para el tratamiento de la infección, existen métodos tanto preventivos como de control. Entre los métodos preventivos se encuentra el suministro de vacunas para combatir la patología de la giardiasis, así como su transmisión. Estas vacunas se ha preparado a partir de aislados de la cepa WB (ATCC_30957) de individuos con o sin síntomas de giardiasis, de extractos crudos de trofozoítos cultivados *in vitro*, o con proteínas antigénicas presentes en los trofozoítos (Luján & Svärd, 2011). El tratamiento con fármacos comúnmente consiste en el uso de los 5-nitroimidazoles (metronidazol, tinidazol, secnidazol y ornidazol) que funcionan como aceptores finales de electrones bloqueando la cadena respiratoria y causantes de daño a la doble cadena de ADN del trofozoíto al unirse a ella y generar radicales libres. Así mismo se han usado compuestos

alternativos como la quinacrina, furazolidona, benzimidazoles (albendazol y mebendazol), paromomicina, bacitracina de zinc, cloroquina y nitazoxanida, que funcionan como agentes reductores generadores de radicales libres (furazolidona) y de unión a componentes del citoesqueleto inhibiendo su polimerización (benzimidazoles), entre otros efectos (Gardner & Hill, 2001) (Pasupuleti, et al., 2014). Entre los efectos adversos del uso de estos compuestos se encuentran náusea, dolor de cabeza, vértigo, sensación de sabor metálico, diarrea, descoloración de la orina, hemólisis (en pacientes deficientes en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), y en algunos casos pancreatitis, ototoxicidad, nefrotoxicidad y neutropenia reversible (Gardner & Hill, 2001). Aunado a ello, se contraindica el consumo de alcohol debido a la inhibición de la enzima aldehído deshidrogenasa (por metronidazol) y el uso durante el embarazo debido a posible teratogenicidad y mutagénesis (por albendazol y por quinacrina y metronidazol, respectivamente) (Gardner & Hill, 2001).

Respuesta inmune

A pesar de que se ha descrito a la inducción de la expresión de quimiocinas y citocinas en el epitelio intestinal del hospedero como respuesta a infecciones por patógenos entéricos (Roxström-Lindquist, et al., 2006), no se ha observado inducción de las mismas a niveles altos después de 5 horas de infección de líneas celulares de epitelio intestinal humano con *G. duodenalis* mediante ensayos *in vitro*. De igual forma, no se observó inducción de interleucina 8 en congruencia con los bajos niveles de inflamación descritos para giardiasis (Jung, 1995). Actualmente, se ha descrito tanto en humanos como en modelos animales la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa a infecciones con *Giardia*. Sin embargo, con el fin de entender dichos mecanismos de defensa, es necesario comprender el contexto fisiológico al que se enfrenta *Giardia* una vez que ha colonizado el duodeno y el yeyuno, zonas en la que se aloja en el intestino. En estos sitios se presenta una alta concentración de enzimas digestivas y sales biliares que reducen considerablemente su susceptibilidad a infecciones microbianas (Maaser & Kagnoff, 2002). Además, el recambio frecuente y renovación celular de la superficie intestinal, que ocurre de cada tres a cinco días, implica que los trofozoítos de *Giardia* deben trasladarse y re-adherirse entre superficies para evitar ser trasladadas fuera de

este sitio como consecuencia de la peristalsis. Convenientemente para el hospedero, la presencia de mucinas en la barrera mucosa que cubre la superficie epitelial impacta de forma negativa el proceso de adhesión de trofozoítos (Roskens & Erlandsen, 2002). Otro factor defensivo es la presencia de microbiota comensal en la parte inferior del intestino delgado, que incluye a los géneros bacterianos aeróbicos *Streptococcus* y *Haemophilus*, así como los anaeróbicos *Lactobacillus*, *Actinomyces* y *Peptostreptococci*, que poseen impacto benéfico en la susceptibilidad a la infección, inhibiendo proliferación y promoviendo la producción de IgA e IgG anti-*Giardia*, así como el reclutamiento de células T CD4+ en las placas de Peyer (Benyacoub, 2005). Como mecanismo contra-defensivo, se ha propuesto que la composición rica en cisteínas de las VSP de *Giardia*, aunada a la estabilidad de su citoesqueleto, le proveen cierta resistencia a proteasas y sales biliares (Nash, 2002).

Dentro de la respuesta inmune innata destacan la secreción de péptidos antimicrobianos desde el epitelio intestinal y células de Paneth para mantener la integridad de la barrera de mucosa, entre ellos defensina y lactoferrina, cuya actividad de defensa en contra de *Giardia* se ha demostrado *in vitro* y se cree podrían ser de gran importancia en infecciones *in vivo* (Eckmann, 2003). Además de éstas, se ha estudiado el efecto de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrosantes como el óxido nítrico (NO) y se ha demostrado que NO inhibe el enquistamiento, desenquistamiento y crecimiento de *Giardia*, pero no su viabilidad. Ante esto, existen mecanismos propios de *G. duodenalis* para combatir dichas condiciones, como la expresión de una flavoproteína tipo A con actividad NO-reductasa, aunada al consumo de arginina por el parásito, principal sustrato para la síntesis de NO por parte del hospedero (Eckmann, 2000) (Sarti, 2004). Con respecto a su susceptibilidad a ROS y debido a la limitada capacidad de *Giardia* para neutralizarlos mediante NADH oxidasa y NADH peroxidasa, no se ha podido dilucidar el papel de dichos factores en la respuesta inmune innata. Así mismo, se ha implicado la participación de mastocitos, células dendríticas y células M como presentadoras de antígenos, y de macrófagos y monocitos que pueden ingerir y eliminar trofozoítos mediante oxidación durante la infección con *Giardia* (Roxström-Lindquist, et al., 2006).

Entre otras moléculas de importancia durante la infección con *Giardia* se encuentra el interferón- γ , producido por células CD4+ humanas post-exposición al parásito (Ebert, 1999) y la interleucina-6, necesaria para el control en etapa temprana de infecciones agudas en ratones. Esta última es producida principalmente por mastocitos, que a su vez activan la respuesta inmune adaptativa a través de las células dendríticas, células B y T (Zhou, 2003) (Galli, 2005). En particular, la deficiencia de células T CD4+ y no CD8+, permite el desarrollo de giardiasis crónica en modelos murinos (Singer & Nash, 2000) sin embargo, son las células T CD4+ y CD8+ las que regulan el incremento en el reclutamiento de linfocitos intra-epiteliales durante giardiasis en ratón (Scott, 2004), además de alterar la membrana apical de los enterocitos sin afectar la funcionalidad de la barrera intestinal (Scott, 2002).

En giardiasis humana, se ha observado la generación de anticuerpos anti-*Giardia*, destacando también la importancia de la producción de IgA y activación de células B durante la infección temprana y tardía, pudiéndose transmitir los primeros a través de la leche materna, brindando al lactante protección contra giardiasis (Roxström-Lindquist, et al., 2006). Finalmente, entre los antígenos de *Giardia* que poseen mayor inmunoreactividad en humanos se encuentran las VSPs, codificadas por alrededor de 150 genes diferentes. De éstas, sólo una se expresa en el trofozoíto en un tiempo dado y están sometidas a variación génica por mecanismos atribuidos a sistemas de silenciamiento similares a ARN antisentido y relacionados a diferenciación (Roxström-Lindquist, et al., 2006).

Genoma y ensamblajes

Una de las principales características de *Giardia* es que posee dos núcleos sincrónicamente replicativos durante su etapa vegetativa de trofozoíto. A través de análisis de campos pulsantes, se ha demostrado que este organismo posee un genoma haploide de alrededor de 12 Mb, constituido por cinco cromosomas distintos (Svärd, et al., 2002). También se han identificado 6470 marcos de lectura abiertos (ORFs) cuya distancia intergénica promedio es de 372 pares de bases, de los cuales solo se ha encontrado evidencia transcripcional para 4787 a través de análisis seriales de expresión génica (SAGE) y secuenciación de cDNA (Morrison, et al., 2007). Adicionalmente, estudios genéticos de poblaciones y análisis moleculares han proporcionado evidencia de recombinación entre cromosomas homólogos y ensamblajes, así como la presencia de maquinaria meiótica, sugiriendo la posibilidad de que la reproducción de *Giardia* pueda ser sexual, aunque no hay evidencias definitivas al respecto (Luján & Svärd, 2011). Dentro del género *Giardia* existe gran diversidad génica, y se ha sugerido que el género *Giardia* pueda incluir once especies (Tabla 1). Así mismo, existen subgrupos genéticos conocidos con ensamblajes, que fueron definidos a partir de estudios de genotipificación y secuenciación de genes conservados como los de glutamato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, β -giardina, factor de elongación 1- α y la subunidad pequeña ribosomal de ARN, así como a través de la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en estos genes (Duringan, et al., 2014). Estos ensamblajes presentan características a nivel morfológico y epidemiológico que los distinguen, así como la especificidad del hospedero infectan y con respecto a su potencial zoonótico. En la tabla 1 se muestra la relación entre especies, ensamblajes y huéspedes caracterizados para el género *Giardia*.

Tabla 1. Relación entre especies, ensamblajes y hospederos de *Giardia*.
Modificada de (Luján & Svård, 2011).

Especie	Hospederos	Características morfológicas del trofozoíto	Dimensiones del trofozoíto en μm (largo / ancho)
<i>G. duodenalis</i> (ensamble A)	Amplio rango de animales silvestres y domésticos, humanos	Forma de pera y cuerpos medios con forma de garra	12-15 / 6-8
<i>G. agilis</i>	Anfibios	Largos y delgados, con cuerpos medios con forma de mazo	20-30 / 4-5
<i>G. muris</i>	Roedores	Redondos con cuerpos medios pequeños y curvos	9-12 / 5-7
<i>G. ardeae</i>	Aves	Redondos con muescas prominentes en el disco ventral y flagelos caudales rudimentarios. Cuerpos medios ovalados con forma de garra	~10 / ~6.5
<i>G. psittaci</i>	Aves	Forma de pera sin bordes ventro-laterales y con cuerpos medios con forma de garra	~14 / ~6
<i>G. microti</i>	Roedores	Similares a los de <i>G. duodenalis</i> . Quistes maduros contienen trofozoítos completamente diferenciados	12-15 / 6-8
<i>G. enterica</i> (ensamble B)	Humanos y otros primates, perros y	Forma de pera y cuerpos medios con forma de garra	12-15 / 6-8

	algunos animales silvestres		
<i>G. canis</i> (ensamble C/D)	Perros y otros cánidos	Forma de pera y cuerpos medios con forma de garra	12-15 / 6-8
<i>G. cati</i> (ensamble F)	Gatos	Forma de pera y cuerpos medios con forma de garra	12-15 / 6-8
<i>G. bovis</i> (ensamble E)	Bovinos y ganado ungulado	Forma de pera y cuerpos medios con forma de garra	12-15 / 6-8
<i>G. simondi</i> (ensamble G)	Ratas	Forma de pera y cuerpos medios con forma de garra	12-15 / 6-8

Mecanismos de virulencia de *Giardia* y su impacto en la homeostasis y microbiota intestinal

Como se mencionó anteriormente, la infección por *G. duodenalis* inicia con la ingestión de quistes que, por el proceso de desenquistamiento, liberan al excizoíto con ploidía de 16N en la parte superior del intestino delgado. Este último experimenta doble división celular sin replicación del ADN, dando lugar a cuatro trofozoítos infectivos con ploidía 4N (Roxström-Lindquist, et al., 2006). Este mecanismo de división celular es responsable de la baja dosis necesaria para causar infección por *Giardia*, que va de diez a cien quistes (Farthing, 1997). En el curso de la infección los trofozoítos debido a la motilidad de sus flagelos migran en el intestino delgado y se adhieren al epitelio por medio de su disco ventral, el cual se ensambla de forma inmediata, permitiendo la rápida adherencia del trofozoíto. Estos dos organelos se desensamblan como parte del proceso de enquistamiento una vez que el trofozoíto activa mecanismos de la respuesta inmune del hospedero.

Se ha propuesto que el genotipo de la especie infectiva es de importancia en la generación de síntomas (Homan & Mank, 2001), sin embargo, no se ha establecido una correlación precisa entre caracteres genéticos y virulencia. En humanos, los posibles causantes de infecciones por *Giardia* corresponden a los ensamblajes A y B. De acuerdo a lo observado en ratones y gerbos, el daño causado a la superficie mucosa del intestino y a las microvellosidades tiene un impacto negativo en la actividad de enzimas digestivas como lipasas, proteasas y disacaridasas (Scott, 2004), sin embargo, en humanos el efecto observado es menor (Oberhuber, 1997). Con respecto al daño al epitelio intestinal, ensayos in vitro han demostrado que *G. duodenalis* causa el re-arreglo de las proteínas de citoesqueleto F-actina y α -actina de células duodenales de humano, reduciendo así su resistencia eléctrica transepitelial (Teoh, 2000). De forma similar, a través de ensayos de co-incubación con monocapas de células intestinales humanas, se observó inducción de apoptosis y disrupción de las uniones estrechas (Chin, 2002). En nuestro equipo de trabajo se estudió mediante ensayos de interacción con monocapas de células IEC-6 y MDCK el efecto de la proteína VSP9B10A, una proteasa de alto peso molecular y producto de secreción en trofozoítos de *Giardia*, expresada de forma constitutiva y secretada durante la co-incubación con dichas monocapas, demostrando que se genera daño citotóxico en ambas líneas celulares, caracterizado por la separación de las células epiteliales entre sí y de su sustrato. Este efecto no se observó cuando los trofozoítos fueron pre-incubados con un anticuerpo policlonal mono-específico anti-VSP9B10A previo a la interacción con las monocapas de células IEC-6, ni en monocapas co-incubadas con trofozoítos que no expresaban dicha proteína (Cabrera-Licona, et al., 2017).

Adicionalmente se ha reportado en ensayos clínicos en humanos que se presenta deterioro moderado de las funciones digestivas y de absorción intestinales (Farthing, 1997), confirmados también en modelos murinos y en gerbos (Faubert, 2000).

Ensayos realizados en modelos murinos han demostrado que la alteración sistémica de la ecología comensal del intestino durante la giardiasis contribuye a la variación presente durante las etapas iniciales de la infección, así como el grado de colonización, inducción de la patología en el hospedero, y eliminación eventual del parásito (Barash, et al., 2017).

Paralelamente, se han observado efectos disruptivos sobre la arquitectura de las biopelículas formadas por la microbiota comensal a consecuencia de la interacción eteropatógena de *Giardia*, a consecuencia del daño causado sobre la capa de mucosas, así como sobre la fisiología y supervivencia celular en el epitelio del hospedero. Estos efectos son mayormente visibles durante las etapas más agudas de la infección, alcanzando a afectar incluso la homeostasis del intestino grueso. Sin embargo, se ha estudiado el impacto positivo de algunas especies comensales como *Lactobacillus ramnosus* GG, *Enterococcus faecium* SF68 y *L. acidophilus* P106, mismas que favorecen en la generación de la respuesta inmune contra *Giardia*, la reparación de la integridad de la barrera de mucosas, y aceleran el proceso de eliminación del parásito, entre otros factores (Allain, et al., 2017).

Factores de virulencia en *Giardia duodenalis*

En *G. duodenalis* se han descrito algunos factores de virulencia, es decir, que permiten o promueven la supervivencia del parásito en el hospedero, así como inducir o favorecer la resistencia de un ensamblaje a la respuesta inmune que induce uno distinto a éste, o bien, promover el desarrollo de una infección crónica (Ringqvist, et al., 2008). En su mayoría, estos factores pueden ser sintetizados y en algunos casos liberados una vez se han expuesto los trofozoítos a las células epiteliales del hospedero, a través de cambios en la expresión génica aunada a la liberación de enzimas de *Giardia*. El conocimiento sobre el mecanismo mediante el cual estos factores impactan en el desarrollo de la infección y su interacción con el hospedero es limitado. Como se mencionó con anterioridad, se ha descrito que durante el proceso de adhesión participan proteínas que incluyen lectinas, giardinas, VSPs y cisteína-proteasas (Cabrera-Licona, et al., 2017) (Meza-Segura, Tesis 2013), de éstas, se ha propuesto que la expresión de las VSPs confiere infectividad zoonótica, además de su potencial como factor de evasión frente al sistema inmune. Asimismo, se ha propuesto que la secreción de tiol-proteinasas (con capacidad de unirse a IgA), y arginina-deiminadas (al consumir arginina endógena y afectar la producción de NO epitelial), promueven la evasión de las respuestas innatas y humorales del hospedero. Otros factores de virulencia con impacto en la patofisiología de la infección por *Giardia* incluyen a una enterotoxina de 58 kDa no caracterizada que

induce secreción excesiva de iones y fluido intestinal, esto a través de la inducción de vías de transducción de señales en los enterocitos del hospedero; adicionalmente, productos parasíticos obtenidos de aislados y extractos de *Giardia* inducen la activación de caspasa-3, -9, y potencialmente MLCK, generando apoptosis enterocítica (Cotton, et al., 2011).

Enzima catepsina B

La proteína precursora de Catepsina B (UniProt: EDO80409.1) de *G. duodenalis* (ATCC 50803), codificada por el gen con GI:157436192, pertenece a la familia de cisteína-proteasas. Esta familia se define por poseer una diada catalítica compuesta por un sitio activo con residuos de cisteína e histidina clasificado como del clan CA de cisteína-proteasas. En particular, las catepsinas B poseen veinte aminoácidos adicionales que conforman el llamado bucle ocluyente, el cual contiene dos residuos característicos de histidina y proveen de actividad endo- o exo-peptidasa (Cotton, et al., 2014). *G. duodenalis* posee numerosos genes que codifican para cisteína-proteasas, la mayoría de las cuales se desconoce su función, no obstante, se ha descrito que su expresión se ve regulada al alza post-exposición a células IEC (Ma'ayeh & Brook-Carter, 2012)]. En el caso de Catepsina B, se ha demostrado, por medio del empleo de monocapas de MDCK e inmunofluorescencia indirecta, que existe co-localización de catepsina B de *G. duodenalis* y proteínas pertenecientes al complejo de unión apical (E-cadherina, Claudina 1 y Ocludina), induciendo además la degradación de éstas (Gómez-Mondragón, 2011). Además, se ha observado que esta cisteína-proteasa degrada CXCL8, factor pro-inflamatorio secretado en el epitelio intestinal durante la infección con *Giardia* (Cotton, et al., 2014). Recientemente, en nuestro equipo de trabajo se demostró mediante zimogramas la actividad proteolítica de la Catepsina tipo B de *Giardia*, identificada como una banda de ~25 kDa mediante un anticuerpo monoclonal en condiciones reductoras. En el mismo estudio se observó además la capacidad de esta proteína de actuar como factor de virulencia al ocasionar daño a monocapas de células epiteliales IEC-6 a través de la inducción de formación de cuerpos apoptóticos mediante microscopía electrónica de barrido y ensayos de anexina V, determinación de caspasa 3 y fragmentación de PARP (Laredo Cisneros, Tesis 2010). En otro estudio del mismo

equipo se demostró que al tratar trofozoítos de *G. duodenalis* con TPCK (tosil-fenilalanil-clorometil-cetona) se observa un aumento en la actividad de catepsina B, induciendo daño al tejido epitelial de gerbos más severo comparado con trofozoítos no tratados, además de originar muerte celular programada en etapas tempranas y alterar la distribución de las proteínas Claudina1 y Ocludina *in vitro* (Meza-Segura, Tesis 2013) (Flores-Mendoza GD., Tesis 2015).

Enzima enolasa

La proteína enolasa (UniProt: EDO81662.1) de *G. duodenalis* (ATCC 50803), codificada por el gen Eno (GI: 157437452), también conocida como 2-fosfoglicerato hidrolasa, es una enzima glicolítica, altamente conservada, activada por iones metálicos divalentes (Mg^{2+} principalmente, además de Zn^{2+} y Mn^{2+}) cataliza de forma reversible la eliminación de agua a partir de 2-fosfoglicerato (2PGA) para formar fosfoenolpiruvato en la penúltima reacción del proceso de glucólisis. Esta enzima posee un tamaño de 445 aminoácidos, un peso de 48.2 kDa, y corresponde a una de las más abundantemente expresadas en el citosol de numerosos organismos, incluido *Giardia*, en cuyos trofozoítos se encuentra una alta expresión del transcrito de ARN mensajero (Castillo-Romero, et al., 2012). Existe evidencia experimental de la participación de enolasa en la patogénesis y diferenciación celular de múltiples organismos, se localiza en la superficie de numerosos parásitos, entre ellos *E. histolytica* y *Naegleria fowleri* (Segovia-Gamboa, et al., 2010) (Chavez-Munguia, et al., 2011). Debido a esto y tomando en cuenta que se ha observado que enolasa es secretada por trofozoítos de *Giardia* en presencia de células epiteliales, además de que ha demostrado su antigenicidad en infección en humanos y modelos murinos, se ha propuesto que enolasa corresponde a un factor de virulencia asociado a superficie, a pesar de no contar con una señal de secreción en su extremo amino terminal (Ringqvist, et al., 2008). La enolasa de *G. duodenalis* posee un alto porcentaje de identidad con la enolasa α y γ de *Homo sapiens*, *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma brucei* y *E. histolytica*, y tiene los residuos aminoacídicos necesarios para la actividad de enolasa (H170, E222, K361, H389 y K412), para la cual es necesaria la unión de dos iones metálicos (Castillo-Romero, et al., 2012).

Además de su función metabólica, se han descrito otras numerosas funciones de enolasa en múltiples organismos. Entre ellas se encuentra fungir como proteína de unión a ácidos nucleicos (Hernández Pérez, 2011), factor de transcripción MBP-1 (Subramanian & Miller, 2000), proteína de choque térmico (Iida & Yahara, 1985) y de estrés hipóxico (Aaronson, 1995), además de participar en la unión y activación secundaria del sistema de regulación de actividad proteolítica plasminógeno-plasmina (Donofrio, 2009). Este sistema se ha identificado en una variedad de organismos bacterianos y protozoarios con gran importancia en el desarrollo de la infección, mecanismos de invasión, metástasis, adhesión y migración de patógenos (Bernal, et al., 2004). El sistema plasminógeno-plasmina requiere la localización transitoria o permanente de enolasa en la superficie del trofozoíto, permitiendo su unión con la proenzima inactiva plasminógeno (ubicua en fluidos corporales) y reclutando activadores fisiológicos (tPA, uPA, Stk) que ejercen proteólisis en el plasminógeno, liberando plasmina activa con función serina-proteasa similar a tripsina, y que efectúa proteólisis sobre las uniones estrechas y matriz extracelular (Díaz-Ramos, et al., 2012). En un trabajo posterior realizado en nuestro equipo de trabajo, se observó este mecanismo en trofozoítos de *G. duodenalis* interactuando con monocapas de líneas celulares IEC-6 y MDCK. En dicho trabajo se mostró además que la enolasa de *Giardia* se localiza en el disco ventral y la superficie del trofozoíto y es responsable del aumento de la generación de plasmina activa y de la inducción de apoptosis en las líneas celulares (Barroeta-Echegaray, Tesis 2013).

Modelos de estudio *in vitro* para analizar la interacción *Giardia*-célula epitelial (IEC-6, MDCK, Caco-2)

A la fecha no se han definido en su totalidad los mecanismos implicados en el desarrollo de la infección por *Giardia* y existe un entendimiento limitado de los factores que participan en ésta. Sin embargo, se conoce que la interacción entre *Giardia* y el epitelio intestinal requiere de la adhesión de los trofozoítos a la superficie de los enterocitos, proceso descrito como multifactorial (Luján & Svärd, 2011). En dicho proceso ejercen gran impacto las estructuras celulares pertenecientes al parásito así como las moléculas que se encuentran en su superficie, o bien, que son secretadas al lumen intestinal.

Actualmente, es necesario y de gran importancia profundizar en el entendimiento de los mecanismos que permiten a *Giardia* sobrevivir a la hostilidad que caracteriza el medio intestinal en el que se desarrolla la infección. La identificación y caracterización de los factores de virulencia de los numerosos ensamblajes del parásito, así como la descripción de sus efectos y ligandos implicados es indispensable para el cumplimiento de este objetivo. Para el estudio de la adhesión de los trofozoítos al epitelio del hospedero, considerado el proceso más descriptivo de la interacción *Giardia*-hospedero (Luján & Svärd, 2011), se han desarrollado estrategias empleando modelos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Dentro de los modelos experimentales desarrollados *in vitro* se encuentra el empleo de líneas celulares tales como IEC-6 las cuales provienen del intestino delgado de rata, son capaces de sintetizar fibronectina y colágeno, su crecimiento es inhibido por cortisol y expresan antígenos de superficie específicos del epitelio intestinal). La línea MDCK deriva de riñón de un Cocker Spaniel en 1958. Esta ha sido utilizada en el estudio de virus y de interacciones trans-epiteliales debido a que presentan protuberancias similares a microvellosidades en su superficie apical y uniones intercelulares. La línea Caco-2 fue aislada de un tumor primario de colon de un hombre caucásico de 72 años de edad a través de la técnica de cultivo de explantes. Estas células forman adenocarcinomas primarios grado II de colon moderadamente bien definidos en ratón y cuya formación de domo, microvellosidades y uniones estrechas ha sido confirmada (Luján & Svärd, 2011).

Estas líneas celulares han sido empleadas para modelar mecanismos implicados en adhesión de trofozoítos *Giardia*, tales como la identificación y descripción de moléculas de superficie (usando MDCK e IEC-6, además de gerbos) (Hernández-Sánchez, et al., 2008), de una proteína similar a la VSP 9B10A (usando MDCK) (Bazán-Tejeda, et al., 2006), lectinas (con Caco-2 e Int-407) (Pegado y de Souza, 1994), cisteína-proteasas (con IEC-6) (Rodríguez-Fuentes, 2006), y tubulinas (a través de Caco-2 e Int-407) (Magne y otros, 1991). Otros estudios se han enfocado en la descripción de factores inhibidores de la adhesión y empleando ensayos de co-incubación, micro-titulación y microscopía electrónica, usando trofozoítos y células IEC-6. En otros estudios se ha descrito que tanto las citocalasinas A, B y D, los agentes quelantes (EDTA y EGTA), las

bajas temperaturas (4°C), como el glutaraldehído reducen de forma significativa la adhesión (McCabe, et al., 1991). De forma similar, se ha estudiado mediante co-cultivos de trofozoítos y monocapas de IEC-6 el impacto de la secreción de cisteína-proteasas en el proceso de adhesión. En estos estudios se ha encontrado que la exposición de trofozoítos de *G. duodenalis* a las monocapas, incrementa la actividad proteolítica de las proteínas secretadas en el sobrenadante de interacción, además de que al pre-tratar los trofozoítos con inhibidores de proteasas E-64 y TPCK previo a la incubación con IEC-6, se inhibe la adhesión del parásito a las células epiteliales (Rodríguez-Fuentes, et al., 2006). Estudios paralelos con Caco-2 incluyen la descripción de otros agentes inhibidores de la adhesión, como pH ácido, colchicina, mebendazol, manosa-6-fosfato, y concanavalina, sin observar diferencias entre distintos aislados de *Giardia* (Katelaris, et al., 1995). La línea Caco-2 fue empleada en otro estudio en el que se describe el daño ocasionado al co-cultivar estas células con trofozoítos de *G. duodenalis*. En éste se observó que, al interactuar con la línea celular, los trofozoítos eran capaces de inducir apoptosis a través de la activación de caspasa-3. En el mismo estudio se observó también la abolición en macrófagos de la inducción de secreción de citosinas inflamatorias GRO e IL-8, proceso relacionado con la incapacidad observada de éstos para abrogar la inducción apoptótica durante la interacción trofozoíto-línea celular. Estos efectos están implicados principalmente en daño y supresión de la respuesta inmune del hospedero durante la infección (Fisher, et al., 2013). El daño ocasionado por la adhesión de trofozoítos de *G. duodenalis* al epitelio intestinal ha sido observado empleando monocapas de MDCK montadas en cámaras Ussing y microscopía electrónica de transmisión y barrido, en las cuales es claro el agotamiento focal de microvellosidades a consecuencia de la adhesión del disco ventral a la superficie apical de las células (Chávez, et al., 1995).

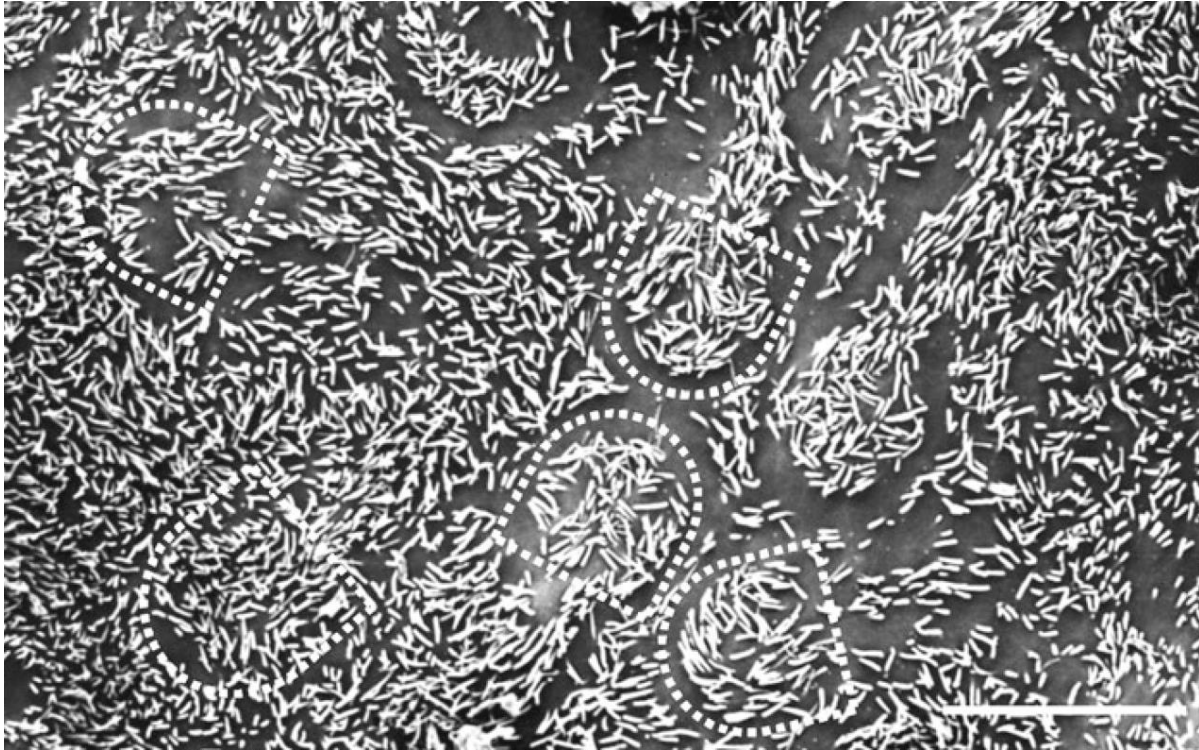


Figura 5. Micrografía de una monocapa de células epiteliales MDCK que muestra las microvellosidades una vez han interactuado con trofozoítos de *G. duodenalis*. Las líneas punteadas muestran la zona en la que el disco ventral hizo contacto físico con la zona apical de las células. Tomada de (Luján & Svärd, 2011).

Metodologías para el silenciamiento de genes y su importancia

Los estudios funcionales a nivel genómico han adquirido mayor importancia en los últimos años tras el desarrollo de técnicas de secuenciación y análisis bioinformático, más rápidos y eficientes permitiendo así identificar secuencias específicas de genes potenciales, evaluar su expresión a nivel de transcripción y traducción, para finalmente deducir la función que desempeña en determinado mecanismo. En el caso del estudio del mecanismo de virulencia de *Giardia* (al igual que el de otros patógenos), una vez que se han identificado, mediante análisis proteómicos, proteínas secretadas o presentes en membrana plasmática durante la interacción parásito-hospedero, es posible dilucidar, mediante estrategias de silenciamiento de los genes que expresan dichas proteínas, el impacto o función de cada proteína en el desarrollo de daño a células epiteliales e identificarla como un factor de virulencia propia de dicho patógeno.

Las estrategias de silenciamiento génico de mayor uso en investigación y desarrollo de terapias en la actualidad incluyen el empleo de enzimas de ADN (DNAzimas), ARN de interferencia (ARN antisentido), oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos señuelo, ribozimas, aptámeros (Bhindi, et al., 2007), y más recientemente, una variante del sistema CRISPR-Cas9 llamada CRISPRi (Larson, et al., 2013).

Las DNAzimas son moléculas de ADN catalítico y sintético no observadas en la naturaleza. La DNAzima que han sido principalmente caracterizada es la perteneciente al subtipo 10-23, que posee un núcleo catalítico de 15 deoxiribonucleótidos, dependiente de cationes que se une a su secuencia de ARN objetivo entre una purina no apareada y una pirimidina apareada, produciendo mediante una reacción de des-esterificación un 2', 3'-ciclo-fosfato terminal y otro extremo 5'-hidroxilo. El núcleo se encuentra flanqueado por secuencias complementarias llamadas brazos de unión, de 6 a 12 nucleótidos de longitud que proveen especificidad a la secuencia blanco de ARN. Una vez unida la DNAzima, se lleva a cabo un proceso de degradación del ARN por medio de RISC (Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN), produciendo silenciamiento génico a nivel post-transcripcional. Este sistema es altamente sensible a pequeños cambios de secuencia y su eficiencia se ve muy afectada por la presencia de estructuras secundarias en la molécula de ARN blanco, por tanto, es necesario el diseño de múltiples moléculas para el mismo blanco y evaluar la eficiencia de silenciamiento de cada una. Además se deben incluir modificaciones químicas como la inclusión de un nucleótido 3'-3' invertido en el extremo 3', o del uso de ácidos nucleicos bloqueados (LNAs) que incrementan afinidad a secuencias complementarias (Santoro & Joyce, 1998).

Los oligonucleótidos antisentido (ASOs) son segmentos de ADN o ARN, de cadena sencilla y de 15-25 nucleótidos de longitud, capaces de unirse a su ARN mensajero blanco por medio de puentes de hidrógeno, bloqueando así su traducción por impedimento estérico al movimiento del ribosoma sobre el mensajero, o bien, por la activación de RNasa H endógena que degrada el heterodúplex formado por ADN-ARN mensajero. Puesto que son de cadena sencilla, los ASOs son puntos de degradación y su carga reduce su eficiencia de penetración a la membrana celular. Para evitar estas inconveniencias, se han desarrollado estrategias de modificación como la introducción

de fósforo-tioato en el esqueleto de fosfatos del ASO, incrementando su vida media, pero al mismo tiempo, su capacidad de unirse a blancos inespecíficos como proteínas, inhibición de polimerasas de ADN y RNAsas H. El empleo de LNAs ha contribuido en la disminución de estos efectos (Rockwell, et al., 1997).

Los oligonucleótidos señuelo consisten en el empleo de moléculas de ADN de doble cadena que contienen sitios de unión a diversas proteínas, generando inhibición competitiva de su unión a promotores y de la expresión génica. Existen numerosos tipos, tales como dúplex de oligonucleótidos, oligonucleótidos α - β -anoméricos, dúplex con uniones modificadas por metil-fosfonato y fósforo-tioato, y el uso de oligodeoxinucleótidos de doble cadena circulares de Dumbbell. Estudios experimentales han observado en su mayoría bajas eficiencias de silenciamiento al emplear oligonucleótidos señuelo, aunado a su susceptibilidad a degradación por nucleasas, capacidad de inducir por sí mismos respuesta inmunológica del hospedero, y el requerimiento de altas concentraciones del oligonucleótido para (Lee, et al., 2003) (Morishita, et al., 1995).

Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas capaces de unirse a su ARN mensajero blanco y activar su degradación a través de mecanismos similares al de las DNAzimas, sin embargo, éstas pueden ocurrir en la naturaleza. Se conocen dos principales tipos, las “*hammerhead*” y las “*hairpin*”, con estructuras secundarias y respuesta catalítica a cambios en el pH del medio distintas. Al igual que las DNAzimas y los ASOs, las ribozimas requieren tener acceso a la zona complementaria de su blanco, además de la posibilidad de sustitución de sus ribonucleótidos por deoxiribonucleótidos en zonas no catalíticas (Schubert & Kurreck, 2004). A pesar de ser susceptibles a degradación, las ribozimas han sido empleadas en numerosos ensayos clínicos como terapia ante infecciones virales, entre ellas hepatitis C y VIH (Brower, et al., 1998) (Usman & Blatt, 2000).

Los aptámeros son ligandos de oligonucleótidos sintéticos derivados de una biblioteca de secuencias capaces de unirse con alta afinidad a proteínas de unión a promotores gracias a su estructura tridimensional, inhibiendo su función, por medio de una selección *in vitro*. A pesar de ser susceptibles a degradación, la modificación de los extremos 2'-

OH del esqueleto de fosfatos ha propiciado su aplicación en ensayos clínicos dirigidos al tratamiento de desórdenes degenerativos e infecciones virales (Ulrich, 2006) (Held, et al., 2006).

Otra de las estrategias recientemente aplicadas para el silenciamiento génico en *Giardia* consiste en el bloqueo de la traducción mediante el uso de morfolinós. Esta técnica es considerada como efectiva para reducir al mínimo la expresión proteica de la mayoría de los genes blanco, incluidos aquellos con altos niveles de expresión como son las proteínas de citoesqueleto. Recientemente se reportó usando esta metodología el silenciamiento una eficiencia de hasta el 80% para el gen de actina,, manteniendo el efecto desde 8-48 horas posterior al tratamiento (Krtková & Paredez, 2017). Este sistema fue implementado para evaluar el papel de la actividad de la enzima Glucosilceramida transferasa, tanto en el proceso de enquistamiento como en la viabilidad de los quistes de *G. duodenalis*. Los resultados de este ensayo mostraron que al silenciar esta enzima, se abolía la producción de vesículas específicas de enquistamiento y se generaban en su mayoría quistes no viables (Mendez, et al., 2013). Estos estudios se llevaron a cabo a pesar de que para este sistema se había reportado ya inespecificidad de blanco y efectos deletereos en otros organismos (Eisen & Smith, 2008) (Bill, et al., 2009).

Sistema de ARN de interferencia

El descubrimiento del mecanismo de ARN de interferencia (ARN antisentido o RNAi largo) en *Caenorhabditis elegans* como sistema de defensa ante infección viral en 1998 representó un gran avance en la investigación por el gran potencial en la manipulación de la expresión génica que implicó, por tanto, el equipo de trabajo fue galardonado con el premio Nobel de Medicina en 2006 (Fire, 1998). A pesar de haber transcurrido ya casi veinte años de dicho descubrimiento, ARN antisentido sigue siendo uno de los métodos más empleados y con mayor eficiencia de silenciamiento génico, tanto en aplicaciones para la investigación como para el desarrollo de terapias y ensayos clínicos.

El mecanismo es similar al observado con las ribozimas, en el cual se induce la destrucción de un ARN mensajero blanco mediante la unión de una secuencia complementaria de ARN sintético para formar un dúplex. En ARN antisentido, el ARN de

doble cadena interactúa con la endoribonucleasa DICER (miembro de la familia de RNasa III) que genera cortes en ambas cadenas para formar fragmentos de 21-23 nucleótidos generando *overhangs* en el extremo 3', mismos que posteriormente entran en el complejo multinucleasa RISC, el cual se encarga de desdoblar el dúplex para obtener cadena sencilla y dirigir la secuencia, por medio de la proteína Argonauta, hacia su blanco por medio de complementariedad de bases Watson-Crick. Esta unión desencadena el silenciamiento mediante diversos mecanismos como son la degradación inducida del ARN mensajero en los cuerpos P citoplasmáticos reduciendo el número de transcritos traducibles, el bloqueo de la unión del factor de inicio de la traducción e-IF al 5'-cap y de la subunidad 60S ribosomal, bloqueo y retraso de la elongación durante la traducción, así como el reclutamiento de histona metil-transferasas al locus genómico correspondiente para convertirlo en heterocromatina, como parte del complejo de silenciamiento transcripcional inducido por ARN (RITS). Los principales componentes del complejo de carga del ARN de doble cadena a RISC son la proteína DICER, la proteína de unión a ARN de respuesta transactivadora al virus de la inmunodeficiencia humana (TARBP2), y la proteína Argonauta 2 (Rayburn & Zhang, 2008). Este mecanismo se describió recientemente como el responsable de la variación antigénica de las VSP en *G. duodenalis*, así como el impacto en la expresión de múltiples formas de VSP en células individuales (en lugar de uno solo) al silenciar dicho sistema (Prucca, et al., 2008).

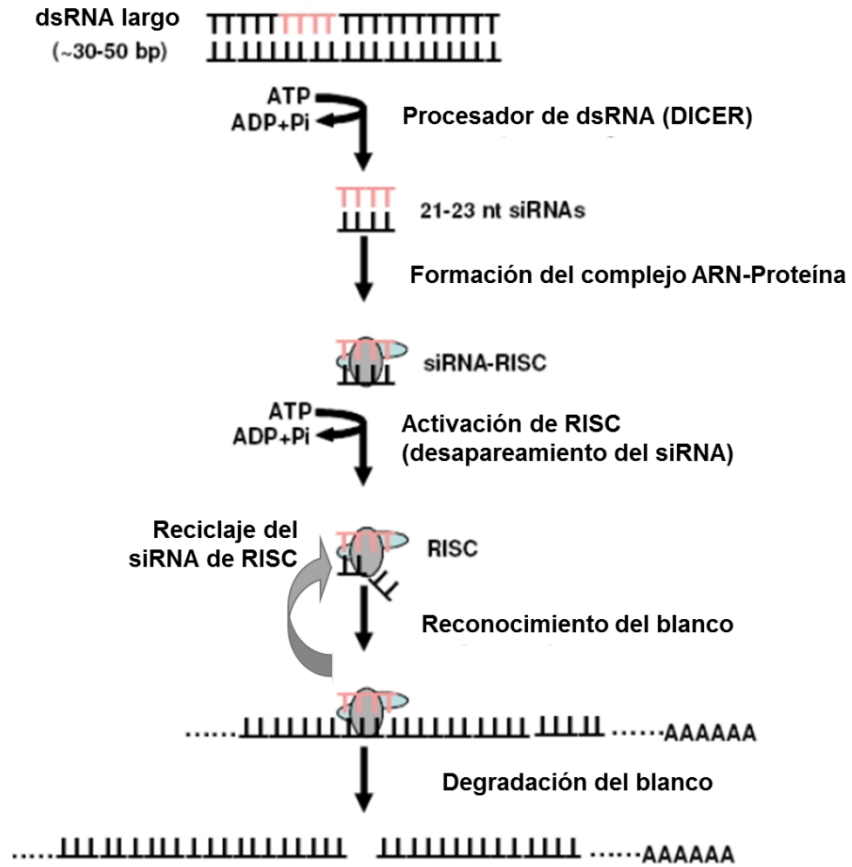


Figura 6. Mecanismo de degradación del ARN mensajero por el complejo DICER-RISC. Tomada de (Lomas-Neirea, et al., 2008).

ANTECEDENTES DIRECTOS

El estudio de la patogenicidad de organismos protozoarios y los factores de virulencia que participan en el desarrollo de la infección han tomado ventaja del empleo de los sistemas de silenciamiento descritos anteriormente a través de los años. Particularmente en *G. duodenalis*, un descubrimiento de gran impacto para el entendimiento de su mecanismo de evasión al sistema inmune se logró al describir que la variación antigénica producto de la expresión de los ~228 genes completos que codifican para VSPs ocurre gracias a la participación de un sistema dependiente de DICER, Argonauta y una polimerasa de ARN ARN-dependiente, proteínas propias del sistema de ARN antisentido (Prucca, et al., 2008). No obstante, este sistema había sido descrito ya en otras especies parasíticas como *T. brucei* (Ngo, et al., 1998), *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* (Militello, et al., 2008) y *E. histolytica* (Solis & Guillen, 2008). Posteriormente se demostraría en *G. duodenalis* que la transfección de vectores para la síntesis endógena de ARN largos de doble cadena secuencia-específicos induce un potente silenciamiento de la expresión de las subunidades medias de adaptinas, de la ARN polimerasa dependiente de ARN, y de la proteína verde fluorescente (GFP) exógena (Rivero, et al., 2010). De forma similar, se diseñó un vector para el silenciamiento por ARN antisentido del gen que codifica para NADH oxidasa (NADHox) en *G. duodenalis*, mostrando un silenciamiento del 80% de la expresión de la proteína y una reducción en la proliferación celular a partir de las 60 horas, concluyendo que NADHox podría ser utilizada como blanco potencial para el desarrollo de nuevas terapias (Marcial-Quino, 2013).

El empleo de ARN antisentido como herramienta para el silenciamiento génico se ha extendido a especies como *E. histolytica*, describiendo la importancia de genes como los que codifican para las proteínas EhILWEQ y EhBAR en fagocitosis y, por tanto, en su mecanismo de virulencia (Sateriale, et al., 2016). Un enfoque similar en el mismo parásito permitió dilucidar la importancia de los genes del complejo cisteína-proteasa-adhesina (EhCPADH y EhADH) en su mecanismo citopático, observando la reducción de la virulencia de los trofozoítos tanto *in vitro* como *in vivo* como la consecuencia del silenciamiento de dichos genes (Ocádiz-Ruiz, et al., 2016). Empleando el sistema ARN antisentido en *T. brucei* fue posible describir que la modificación de deoxi-hipusina del

factor de iniciación de la traducción 5A (eIF5A) es esencial para el crecimiento y expresión de las proteínas polipropiladas del parásito, definiéndolas como posibles blancos terapéuticos (Nguyen, et al., 2015). Así mismo, se encontró que el silenciamiento por ARN antisentido de la proteína IC138 del brazo interno de *T. brucei* causa motilidad deficiente y desapego flagelar (Wilson, et al., 2015). Además de ello, ensayos *in vitro* e *in vivo* con modelos murinos infectados con inóculos de *P. falciparum* en los que se silenció la expresión de las proteínas DHS y eIF5A a través de ARN antisentido desarrollaron una parasitemia reducida a los 9 días de infección, demostrando que dichos genes son de gran importancia para la proliferación del parásito (Schwentke, et al., 2012).

JUSTIFICACIÓN

La elevada frecuencia de giardiasis a nivel mundial requiere profundizar en la identificación de los factores de virulencia de este parásito, así como en el conocimiento de los mecanismos que participan en la interacción de estos con los elementos del hospedero. En particular nuestro grupo de investigación ha estudiado la catepsina tipo B y la enolasa de *Giardia duodenalis* como posibles factores de virulencia. El empleo de técnicas moleculares para silenciamiento génico de estas proteínas como es el sistema de ARN antisentido, permitirá confirmar el papel que pueden tener estos factores de virulencia de *G. duodenalis* al emplear modelos in vitro (interacción con células epiteliales).

HIPÓTESIS

Si la catepsina tipo B y la enolasa de *Giardia* participan en el daño a monocapas de células epiteliales entonces el silenciamiento de los genes que las codifican empleando la metodología de ARN antisentido permitirá determinar si estas proteínas pueden ser consideradas como factores de virulencia de *Giardia*.

OBJETIVOS

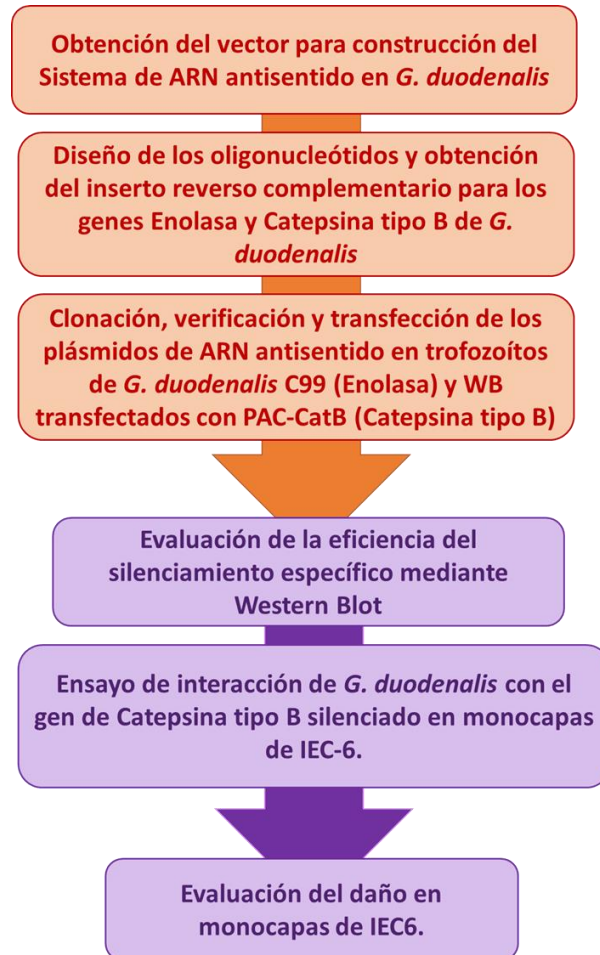
Objetivo general

Evaluar el efecto del silenciamiento de los genes de la enolasa y de la catepsina tipo B de *Giardia* empleando modelos de interacción con células epiteliales.

Objetivos específicos

- Diseñar y clonar plásmidos con el sistema ARN antisentido para el silenciamiento de los genes de catepsina tipo B y de enolasa de *G. duodenalis*.
- Determinar la efectividad del sistema de ARN antisentido en el silenciamiento de los genes de de Catepsina tipo B y de enolasa de *G. duodenalis*.
- Determinar el efecto del silenciamiento de los genes de la catepsina tipo B de *G. duodenalis* empleando modelos de interacción con células epiteliales.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



La estrategia que se siguió en este proyecto consistió en la construcción de vectores inducibles para el silenciamiento individual de los genes de Enolasa y Catepsina B de *G. duodenalis*, por medio del sistema de ARN antisentido, empujando un total de cuatro vectores distintos (1 vector/gen/sistema). Para ello fue necesario diseñar oligonucleótidos con el objetivo de amplificar por medio de PCR el inserto necesario para cada gen y sistema. Una vez hecho esto, se transfectó cada vector por separado en trofozoítos de *G. duodenalis* y se evaluó la expresión post-inducción de los elementos propios de cada sistema. Para el caso particular del gen de Catepsina tipo B, se transfectaron trofozoítos WB de que contenían ya un plásmido PAC para sobreexpresión de Catepsina tipo B con una etiqueta FLAG, mientras que para el gen de Enolasa, se emplearon trofozoítos de C99 tipo silvestre para la transfección. Posteriormente, se analizó y cuantificó el silenciamiento génico provocado para cada uno de los genes a

través de Western Blot. Finalmente, se realizaron ensayos de interacción de trofozoítos con monocapas de células IEC-6 para evaluar el efecto del sistema de silenciamiento de Catepsina tipo B en estos. En los experimentos se incluyeron como controles trofozoítos con alta o con muy baja expresión de la Catepsina B. El daño se observó mediante microscopía óptica para el caso de las monocapas de IEC-6 y los sobrenadantes de interacción se analizaron por medio de zimogramas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de oligonucleótidos para ARN antisentido y obtención de secuencias antisentido

El silenciamiento por ARN antisentido se llevó a cabo empleando el vector pNlop4, amablemente proporcionado por el equipo de trabajo de la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, quien a su vez lo recibió del Dr. Alex Paredes, Universidad de Washington. Este vector en su estructura contiene, entre los de mayor relevancia, los siguientes elementos:

- Un operón conformado por un promotor P1 para expresión en *Giardia duodenalis* e inducible por tetraciclina mediante sitios de unión al represor (operadores: Tet1 y Tet2), así como el represor de Tet.
- Una secuencia que codifica para la proteína cinasa de serina-treonina PAK1 la cual es eliminada para nuestros propósitos.
- Una secuencia que codifica para tres etiquetas de c-Myc en el extremo 5' del gen PAK1.
 - La transcripción de los elementos anteriores está regulada por el promotor P1.
- Un casete de resistencia a ampicilina para la selección de cultivos bacterianos de *Escherichia coli* transformados con el vector en cuestión.
- Un casete de resistencia a geneticina (neomicina) para la selección de cultivos de *G. duodenalis* transfectados con el vector.

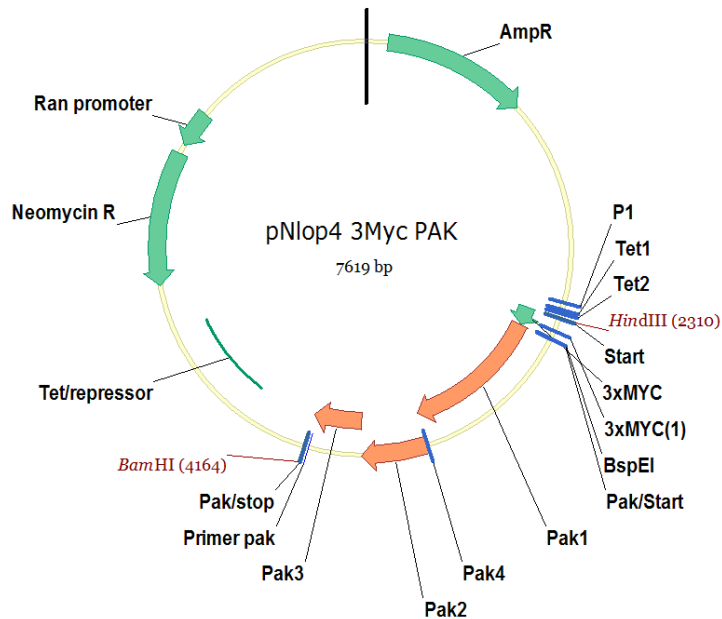


Figura 7. Mapa del vector pNlop4.

El gen PAK1, aunado a la secuencia codificante para las etiquetas de c-Myc, se encuentran flanqueados por sitios de restricción HindIII cercano al extremo 5' del casete, y BamHI cercano al 3'. Este gen proviene de aplicaciones previas del vector, mismas que no son relevantes para los objetivos de este proyecto. Debido a ello, se utilizaron estos mismos sitios de restricción para la clonación de la secuencia reverso-complementaria de cada uno de los genes que se silenciaron, aprovechando de igual manera su posición respecto al promotor P1.

Para la obtención de las secuencias anti-sentido se realizó el diseño de oligonucleótidos dirigidos a la secuencia reverso-complementaria de cada gen. Esto se llevó a cabo con el apoyo del programa Oligo7. Ambos pares de oligonucleótidos contienen en el extremo 5' un sitio de restricción HindIII y en el 3' un sitio BamHI. Estos oligonucleótidos fueron sintetizados químicamente a través de un proveedor comercial.

Una vez obtenidos los oligonucleótidos, las secuencias anti-sentido se obtuvieron a partir de DNA genómico de *G. duodenalis* C99 mediante PCR punto final.

Las condiciones empleadas para la PCR fueron las siguientes:

Reactivos:

- ADN genómico de *Giardia duodenalis* WB: 1 µL

- ADN polimerasa Pfx Platinum: 1 μ L
- Buffer Pfx 10X: 2.5 μ L
- DNTPs: 10 mM: 1 μ L
- Oligo Forward (10 mM): 1 μ L
- Oligo Reverse (10 mM): 1 μ L
- Agua ultrapura (MiliQ): 17.5 μ L

Total Rx: 25 μ L

Protocolo para amplificación del gen Enolasa (GI:159118233, 1284 pb)

1. 5 min @ 95°C
2. [40 s @ 95°C, 45 s @ 63°C, 77 s @ 72°C] x34 ciclos
3. 5 min @ 72°C
4. ∞ @ 4°C

Protocolo para amplificación del gen de Catepsina tipo B (GI:159109222, 908 pb)

1. 5 min @ 95°C
2. [40 s @ 95°C, 45 s @ 64°C, 55 s @ 72°C] x34 ciclos
3. 5 min @ 72°C
4. ∞ @ 4°C

Posteriormente, se verificó el tamaño de ambos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X.

Preparación de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* Δ H5 α

Para los ensayos de transformación de los vectores que se construyeron durante el proyecto, se emplearon células quimiocompetentes de *E. coli* Δ H5 α , mismas que se prepararon empleando el siguiente protocolo.

1. Se incubó una semilla de 5 mL de medio LB inoculado con la cepa bacteriana durante toda la noche en agitación a 37°C.
2. Se tomó una alícuota del cultivo semilla (500 μ L) para inocular 50 mL de LB y se incubó en agitación a 37°C. Durante este período, se tomaron muestras del

cultivo homogenizado para lectura de densidad óptica a 600 nm en intervalos de 20 minutos.

3. Una vez que el cultivo alcanzó una densidad óptica de entre 0.4 y 0.7, se enfrió el cultivo en hielo por 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 3825 x g durante 15 minutos a 4°C.
4. La pastilla obtenida se resuspendió en 1 mL de CaCl₂ 0.1 M estéril, posteriormente se agregaron 24 mL más de este reactivo. Esta mezcla se incubó en hielo durante 1 hora.
5. Se centrifugó la resuspensión a 1700 x g durante 10 minutos a 4°C.
6. La pastilla obtenida se resuspendió en 500 µL de una solución estéril de CaCl₂ 0.1 M con 20% glicerol anhidro.
7. Del volumen obtenido se realizaron alícuotas de 50 µL en tubos de 1.5 mL para ser usadas en el momento, de lo contrario, se almacenaron en ultracongelador para usarse en un periodo no mayor a un mes.

Clonación en el vector de transición pJET1.2/Blunt

Una vez obtenido el fragmento antisentido para cada gen, se purificó la banda del tamaño correspondiente desde gel de agarosa mediante un kit comercial, siguiendo el protocolo especificado en el producto. El ADN purificado se empleó en una reacción de clonación en el vector de transición pJET1.2/Blunt (Thermo Scientific #K1231) siguiendo la metodología descrita para ello. Se transformaron 50 ng (1 µL) de la reacción de ligación en una alícuota de 50 µL de células quimiocompetentes de *E. coli* Δh5α. Se incubó la mezcla durante 30 minutos en hielo y se realizó un choque térmico a 42°C durante 60 segundos. Posteriormente, se incubaron las células en 450 µL de medio LB precalentado a 42°C durante 1 hora en agitación, esto con el objetivo de recuperar la viabilidad de las células transfectadas posterior al choque. Una vez transcurrido el tiempo, se plaqueó todo el medio distribuido en alícuotas de distintos volúmenes en medio LB agar adicionado con ampicilina, mismas que se incubaron toda la noche a 37°C para observar colonias candidatas.

PCR de colonias candidatas

Con el propósito de seleccionar aquellas colonias que fueron exitosamente transformadas con el vector de transición y que contuvieran el inserto antisentido, se prepararon tubos con reacciones de PCR correspondientes a cada gen como se describe a continuación.

Reactivos:

- ADN Taq polimerasa: 0.2 μ L
- Buffer Pfx 10X: 1 μ L
- DNTPs: 10 mM: 0.5 μ L
- Oligo Forward (10 mM): 0.5 μ L
- Oligo Reverse (10 mM): 0.5 μ L
- Agua ultrapura (MiliQ): 7.3 μ L

Total Rx: 10 μ L

En ellos se inoculó una asada con mínima biomasa de cada colonia por tubo previamente etiquetados y se llevó a cabo la reacción de PCR en las condiciones correspondientes a cada gen, descritas con anterioridad. Las reacciones obtenidas se analizaron mediante gel de agarosa donde se observó la presencia de una banda de tamaño correspondiente al amplificado del gen en cuestión y, de ser así, considerar la colonia seleccionada como positiva.

Clonación en el vector pNlop4

El vector de transición obtenido con cada una de las secuencias anti-sentido (inserto) fueron digeridos de forma secuencial con las enzimas HindIII y BamHI a la par del plásmido pNlop4. Se llevó a cabo una reacción de ligación empleando T4 DNA ligasa y una proporción 1:3 vector-inserto. En este ensayo se incluyeron además dos controles de ligación, uno de los cuales no incluyó inserto mientras que el otro consistió en el plásmido sin digerir (súper-enrollado). Ambos controles y la reacción con el inserto se transformaron independientemente por choque térmico como se describió anteriormente en células quimiocompetentes de *E. coli* Δ h5 α , mismas que fueron inoculadas en medio

Luria sólido adicionado con ampicilina para el conteo de colonias post-incubación. Dicho conteo permitió determinar la cantidad de colonias candidatas potenciales obtenidas de la transformación. Una vez que la suma del número de colonias provenientes de los controles fue menor a la cantidad obtenida de la reacción con el inserto, se continuó a realizar la inoculación individual de cada colonia candidata en caldo Luria más ampicilina para realizar la extracción del plásmido y observar su tamaño en contraste con el del plásmido súper-enrollado y el del plásmido digerido sin ligar, esto mediante electroforesis en gel de agarosa. Se seleccionaron solo aquellas colonias cuyo plásmido extraído haya generado el tamaño de banda esperado de la ligación del inserto, mismas que fueron cultivadas de nuevo en caldo Luria más ampicilina para extraer suficiente cantidad de pNlop4+inserto antisentido para realizar la transfección del mismo en *G. duodenalis* C99.

Paralelamente se realizó un ensamble y análisis de los resultados de secuenciación obtenidos por el equipo de trabajo que proporcionó el vector mediante el programa DNAbaser <<http://www.dnabaser.com/>> con el fin de evaluar que todos los elementos de expresión del inserto antisentido se encontraran íntegros.

Transfección de trofozoitos de *G. duodenalis* con el vector

Se realizó una transfección del vector obtenido pNlop4+inserto antisentido purificado en trofozoítos de *G. duodenalis* cepa C99 tipo silvestre para el vector de silenciamiento dirigido al gen de enolasa, y trofozoítos de *G. duodenalis* WB previamente transfectados con el vector VSP9B10A-PAC para sobreexpresión de Catepsina tipo B etiquetada con FLAG que le provee resistencia a puromicina. La utilización de estas cepas en particular se debió a que se cuenta con ellas en nuestro equipo de trabajo y ha sido confirmado experimentalmente que éstas no cuentan con resistencia a geneticina. Estos trofozoítos fueron previamente cultivados en medio líquido TYS-31 adicionado con suero fetal de ternera al 10% v/v (des-complementado a 56°C por 30 minutos) y una mezcla antibióticos y anti-micótico al 1% v/v (10,000 U/mL de penicilina, 10,000 µg/mL de estreptomycin y 25 µg/mL de anfotericina B), a 37°C hasta alcanzar una confluencia aproximada del 70%. Previo a la transfección, se realizó un conteo de los trofozoítos empleando una cámara de Neubauer, en la que se colocó 10 µL de una dilución 1:10 del cultivo para posteriormente promediar el conteo de los 4 cuadrantes y multiplicar por 1×10^5 para

obtener el número de células por mL de cultivo. La transfección se realizó mediante electroporación, utilizando al menos diez millones de células en un volumen no mayor a 300 μ L del medio mencionado sin suero añadido y 50 μ g de plásmido, mientras que la selección de las células transfectantes se realizó añadiendo geneticina (concentración final 0.2 mg/mL), esto una vez pasadas 24 horas de incubación axénica a 37°C en medio, se añadió el antibiótico de selección de células transfectantes, 200 μ g/ μ L concentración final de geneticina para trofozoítos transfectados tanto con el vector de silenciamiento de Enolasa como para Catepsina tipo B, y 160 μ g/ μ L concentración final adicional de puromicina para los transfectados para silenciamiento de Catepsina tipo B. Se incluyó un control negativo de transfección (agua ultrapura en sustitución del plásmido) para evaluar la efectividad del agente de selección. Tanto los controles como los cultivos transfectados con el vector fueron comparados 48 horas posteriores a la adición del antibiótico para comparar la viabilidad de las células. El resultado esperado es el abatimiento de las células del cultivo control y el aumento del conteo celular en los cultivos con las células transfectadas con el vector.

Evaluación de la eficiencia de silenciamiento específico

Una vez obtenidos cultivos de trofozoítos transfectados con la construcción correspondiente para cada sistema de silenciamiento, se procedió a realizar la inducción de los mismos con doxiciclina (análogo de tetraciclina) para el ensayo preliminar a la cinética de silenciamiento. Para ello, se dispuso de cinco tratamientos por duplicado, cada uno correspondiente a un cultivo con trofozoítos transfectados con el vector de silenciamiento inducidos con doxiciclina a concentraciones de 0 (no inducido), 1, 5, y 10 μ g/ μ L respectivamente, y un cultivo control sin dicho vector. Estos cultivos fueron incubados durante 12 horas y posteriormente procesados para extracción de proteínas. Esto con el objetivo de determinar con cuál concentración de doxiciclina se observa mayor reducción en la expresión de la proteína blanco del silenciamiento comparado con el control y el tratamiento no inducido.

Los reactivos empleados, así como protocolo seguido para la extracción de proteínas fueron los siguientes:

Reactivos

- PBS 10X
 - 80 g NaCl
 - 2 g KCl
 - 14.4 g Na₂HPO₄
 - 2.4 g KH₂PO₄
 - Disolver en 1 L para stock.
 - Realizar dilución 1X para uso.
- RIPA 1X
 - Tris HCl 50 mM pH=8
 - NaCl 150 mM
 - SDS 0.1%
 - Desoxicolato de sodio 0.5%
 - Tritón 1%
 - Preparar solución stock.
 - Tomar 7 mL y disolver 1 tableta de inhibidor de proteasas Complete para uso en extracción de proteínas de *Giardia*.
 - Almacenar a 4°C.
- Buffer de carga Laemmli 5X
 - 125 µL Tris 1 M
 - 400 µL SDS 10%
 - 200 µL Glicerol anhidro
 - 5 mg Azul de bromofenol
 - Disolver en 1.8 mL de agua ultrapura.
 - Realizar 2 alícuotas de 900 µL y añadir a cada una 100 µL de β-mercaptoetanol.
 - Proteger de la luz.

Procedimiento

1. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el cultivo de trofozoítos correspondiente a cada tratamiento se enfrió en hielo durante al menos 1 hora.

2. Se centrifugó el cultivo a 2150 x g durante 15 minutos a 4°C y se descartó el medio sobrenadante.
3. La pastilla se resuspendió en 500 µL de PBS 1X y se trasladó con micropipeta a un tubo de 1.5 mL.
4. Se centrifugó el tubo a 6800 x g durante 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante.
5. Se repitieron dos veces más los pasos 3 y 4 para retirar todo residuo del medio de cultivo.
6. La pastilla obtenida al final de los lavados se resuspendió en 100 µL de RIPA 1X adicionado con Complete.
7. Las células se incubaron en hielo durante 25 minutos, agitando levemente cada 5 minutos o de forma continua en shaker.
8. Una vez transcurrido el tiempo, se apartó una alícuota de 10 µL de la resuspensión para la cuantificación de proteínas.
9. Al resto se le añadió un volumen adecuado de buffer Laemmli 5X para quedar a una concentración final de 1X.
10. Se homogenizó la mezcla y se hirvió a baño María durante 5 minutos. Una vez hecho esto, la mezcla quedó lista para ensayos de electroforesis.
11. De no utilizarse, la mezcla se almacenó en ultracongelador.

Para la cuantificación de proteína total en cada muestra, se realizó un ensayo colorimétrico en una placa de 96 pozos, en los cuales se colocaron 10 µL de cada una de las muestras por duplicado. Para la curva de calibración se empleó una solución estándar de 2 mg/mL BSA y seis diluciones consecutivas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) con RIPA como el resto de los puntos de la curva, así como un blanco sólo con buffer RIPA, estos también por duplicado. Una vez dispuestas todas las muestras, el blanco y la curva de calibración, se añadieron a cada pozo 200 µL de una mezcla 50:1 de los reactivos A y B respectivamente, del kit comercial Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, #23225) para cuantificación de proteínas por ácido bicinónico, y se incubó la placa durante 30 minutos a 37°C, en agitación ligera y protegida de la luz. Habiendo transcurrido el tiempo de incubación, se leyeron las absorbancias de cada pozo en la placa a 562 nm por medio de un espectrofotómetro UV-Vis. Las lecturas

obtenidas de la curva de calibración se normalizaron contra el blanco y se graficaron absorbancia en el eje Y y concentración en el eje X. La función obtenida de la forma $y=mx+b$ a partir de la curva se empleó para determinar la concentración protéica de las muestras por medio de extrapolación.

Para visualizar el resultado del ensayo preliminar de inducción, se realizó un ensayo de Western blot empleando geles SDS-PAGE al 10% donde se cargaron 35 μg de proteína por muestra (tratamientos y control), junto con 4 μL de marcador de peso molecular para proteínas Dual Color (BioRad, #161-0374). La corrida electroforética se realizó a 100 V, 400 mA y 60 W durante 1 hora y 45 minutos. Posteriormente, la transferencia se realizó a membranas de nitrocelulosa a 100 V, 400 mA y 60 W durante 1 hora y 15 minutos. Una vez terminada la transferencia, se tiñeron las membranas con rojo de Ponceau para comprobar que la transferencia fuera exitosa y no hubiese degradación protéica. El colorante fue removido mediante buffer TBS-T (24.2 g Trizma base y 80 g NaCl disueltos en un litro de agua, diluir 1:10, añadir 1 μL de Tween 20 por cada mL de solución). A continuación, se bloquearon las membranas de nitrocelulosa durante 1 hora usando una solución al 10% de leche en polvo libre de grasa en TBS-T. Transcurrido el tiempo de bloqueo, se incubaron las membranas durante 12 horas a 4°C con el anticuerpo primario anti-FLAG monoclonal (Sigma-Aldrich) dilución 1:1000 en 7% leche-TBS-T para el caso de Catepsina tipo B, y con el anticuerpo policlonal mono-específico anti-enolasa de *Giardia* (preparado en nuestro equipo de trabajo) en una dilución 1:100 en 7% leche-TBS-T. Posteriormente, se lavaron las membranas con TBS-T a periodos de 5 minutos cada uno, luego se incubaron con el anticuerpo primario anti-tubulina a las mismas condiciones que en la incubación anterior. Terminada la incubación, se realizaron otros tres lavados y se prosiguió a incubar las membranas con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (GE-Healthcare) dilución 1:20000 en 7% leche-TBS-T. Previo al revelado, las membranas se lavaron tres veces más con TBS-T. El revelado se realizó a 1, 2 y 5 minutos de exposición con películas Medical X-ray General Purpose Blue (Kodak, REF 6040331).

El resultado del ensayo se empleó para determinar la concentración óptima de doxiciclina para la cinética de silenciamiento, la cual fue de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para el siguiente ensayo

preliminar, se realizó de nuevo la inducción con doxiciclina pero esta vez incubando a 0, 2, 4 y 6 horas post-inducción, utilizando concentraciones de 0 (sin inducir) y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para las células transfectadas con el vector de silenciamiento, e incluyendo un control de células tipo silvestre para Enolasa y transfectadas con el vector de sobreexpresión PAC para Catepsina tipo B para cada uno de los tiempos. La extracción y cuantificación de proteínas se realizaron de la misma forma que fue anteriormente descrita, al igual que la corrida electroforética, transferencia, incubación con anticuerpos y revelado.

La eficiencia de silenciamiento específico para cada gen se determinó mediante un análisis densitométrico utilizando el programa Image-J del National Institutes of Health <<https://imagej.nih.gov/>>, en el cual se compararon la intensidad de las bandas correspondientes a cada proteína de interés con las del tratamiento sin inducir y su control respectivo al tiempo correspondiente, habiendo sido todas normalizadas contra la banda del control de carga.

Ensayos de interacción con monocapas de células IEC-6

Con el fin de evaluar el daño causado por los trofozoítos transfectados con los vectores de silenciamiento, se realizaron ensayos de interacción con monocapas de células IEC-6 (ATCC CRL1592). Para ello, esta línea celular se cultivó en cajas para cultivo celular de 25 cm^2 adicionadas con medio mínimo esencial Dulbeccos Eagles modificado (DMEM), (GibcoBRL) suplementado con 10% suero fetal bovino (HyClone), una mezcla de antibióticos/antimicóticos 100x (HyClone) al 1%, glutamina al 0.1% e incubadas a 37°C y 5% CO_2 . El medio fue reemplazado cada tercer día. Posteriormente, se realizó la tripsinización de los cultivos confluentes (Sigma Trypsin 1:250 de páncreas porcino) durante 5 minutos y una alícuota de 100 μL . A continuación se transfirieron a cajas nuevas con medio fresco para renovar los cultivos. Para el ensayo, se sembraron células IEC6 en fase exponencial de crecimiento en placas de 24 pozos (~500,000 células por pozo), en cuyo fondo se colocaron cubreobjetos estériles y se incubaron durante 48 horas a 37°C y 5% de CO_2 en medio DMEM completo con el fin de obtener capas confluentes. En los ensayos de adhesión con monocapas de células IEC-6 estas se co-cultivaron con 2×10^6 trofozoítos transfectados con los respectivos vectores de silenciamiento, resuspendidos en 500 μL de medio DMEM sin suero por pozo. La interacción se llevó a

cabo durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los sobrenadantes de interacción se recuperaron de cada condición y se centrifugaron a 250 x g durante 10 minutos a 6°C para remover los trofozoítos. El sobrenadante obtenido fue empleado en zimogramas para determinar la actividad proteolítica del mismo.

Zimogramas para evaluar actividad proteolítica

Para evaluar la actividad proteolítica de los sobrenadanes obtenidos de la interacción de los trofozoítos con las células IEC-6, se realizaron zimogramas empleando geles de poliacrilamida preparados con una solución de gelatina al 2%. Estos geles se renaturalizaron durante 1 hora con 50 mL de tritón X-100 2.5% v/v. Posterior a ello, se lavaron 3 veces con agua bidestilada con la finalidad de remover exceso de detergente. A continuación, se incubaron los geles durante 16 horas a 37°C con una solución de acetato de sodio 0.1 M pH=5.5 más 10 mM de DTT, para luego realizar lavados con agua bidestilada, seguidos de una tinción con azul de Coomassie (Coomassie R-250 0.125% en 50% metanol y 10% ácido acético) durante toda la noche.

RESULTADOS

Diseño de oligonucleótidos para ARN antisentido y obtención de secuencias antisentido

Con el objetivo de obtener el inserto antisentido (reverso-complementario) tanto del gen de Catepsina tipo B (GI:159109222) como el de Enolasa (GI:159118233) de *G. duodenalis*, se diseñaron oligonucleótidos a partir de las secuencias reportadas de los genes mencionados, así como con el apoyo del software Oligo7. En dichos diseños se incluyeron las secuencias correspondientes a los sitios de corte para las enzimas de restricción HindIII (AAGCTT) en el oligonucleótido Forward, y BamHI (GGATCC) en el oligo Reverse, esto con el fin de utilizarlos durante las reacciones de digestión para asegurar la obtención de los respectivos insertos para clonación en la dirección antisentido. A continuación, se muestran las secuencias correspondientes a dichos diseños.

Catepsina tipo B:

A-CatB-F2:

GCTAAGCTTCGAAGAAGCCCGCATAGGCC

A-CatB-R2:

TCGGGATCCGCTCTTTCTCCTCGCCGCTG

Enolasa:

A-Eno-F1:

GCTAAGCTTTTAGCGCAGCGCTCAGAGCG

A-Eno-R1:

TCGGGATCCGGCTCCGTCTACGATCAAGGC

Estos oligonucleótidos generan amplificados de 908 pb para Catepsina tipo B y 1284 pb para Enolasa.

Para corroborar que estos oligonucleótidos no amplificaran blancos inespecíficos a partir del genoma de *Giardia*, se realizó una búsqueda por medio de la plataforma BLASTn < https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch>, utilizando estas secuencias como entrada de datos. El análisis arrojó que el único alineamiento con un valor esperado (E Value) lo suficientemente bajo y una puntuación máxima (Max score) lo suficientemente alta para descartar la posibilidad de coincidencia en el alineamiento por azar fueron alineamientos con los respectivos genes para los cuales fueron diseñados los oligonucleótidos, como se observa en las figuras 8-11.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Giardia lamblia ATCC 50803 Cathepsin B precursor (GL50803_14019) mRNA, complete cds	42.1	42.1	72%	3e-05	100%	XM_001704825.1
<input type="checkbox"/>	Giardia lamblia ATCC 50803 Protein 21.1 (GL50803_17613) mRNA, complete cds	26.3	26.3	44%	1.7	100%	XM_001709819.1

Figura 8. Resultados de la plataforma BLASTn para el oligonucleótido A-CatB-F2, donde se muestran los dos resultados con menor valor esperado y mayor puntuación máxima.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Giardia lamblia ATCC 50803 Hypothetical protein (GL50803_37275) mRNA, complete cds	40.1	58.5	68%	1e-04	100%	XM_001704826.1
<input type="checkbox"/>	Giardia lamblia ATCC 50803 Cathepsin B precursor (GL50803_14019) mRNA, complete cds	40.1	58.5	68%	1e-04	100%	XM_001704825.1
<input type="checkbox"/>	Giardia lamblia ATCC 50803 Cathepsin B precursor (GL50803_16779) mRNA, complete cds	40.1	40.1	68%	1e-04	100%	XM_001704530.1
<input type="checkbox"/>	Giardia lamblia ATCC 50803 Spindle pole protein, putative (GL50803_24122) mRNA, complete cds	30.2	89.2	65%	0.11	100%	XM_001707716.1

Figura 9. Resultados de la plataforma BLASTn para el oligonucleótido A-CatB-R2, donde se muestran los cuatro resultados con menor valor esperado y mayor puntuación máxima.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Giardia lamblia ATCC 50803 Enolase (GL50803_11118) mRNA, complete cds	40.1	58.5	68%	1e-04	100%	XM_001709284.1
<input type="checkbox"/>	Giardia lamblia ATCC 50803 Hypothetical protein (GL50803_13671) mRNA, complete cds	30.2	30.2	51%	0.11	100%	XM_001704454.1

Figura 10. Resultados de la plataforma BLASTn para el oligonucleótido A-Eno-F1, donde se muestran los dos resultados con menor valor esperado y mayor puntuación máxima.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Giardia lamblia ATCC 50803 Hypothetical protein (GL50803_20276) mRNA, complete cds	42.1	42.1	70%	3e-05	100%	XM_001709285.1
<input type="checkbox"/>	Giardia lamblia ATCC 50803 Enolase (GL50803_11118) mRNA, complete cds	42.1	60.5	100%	3e-05	100%	XM_001709284.1
<input type="checkbox"/>	Giardia lamblia ATCC 50803 Metallo-beta-lactamase superfamily protein (GL50803_14392) mRNA, complete cds	26.3	26.3	43%	1.7	100%	XM_001708021.1

Figura 11. Resultados de la plataforma BLASTn para el oligonucleótido A-Eno-R1, donde se muestran los tres resultados con menor valor esperado y mayor puntuación máxima.

Una vez descartada la posibilidad de obtener blancos inespecíficos de amplificación, se prosiguió a solicitar la síntesis química de los oligonucleótidos a un proveedor comercial. Al recibirlos en forma liofilizada, se resuspendieron de acuerdo a las indicaciones presentes en el reporte de síntesis de cada uno. De esta suspensión, se realizaron diluciones a una concentración final de 10 mM para cada uno y con ellos, se realizaron reacciones de PCR para obtener el inserto reverso complementario de cada gen bajo las condiciones descritas con anterioridad. A la par se realizó una reacción como control negativo a la que no se añadió ADN genómico de *Giardia*.

La reacción de PCR obtenida de cada gen se observó en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X, teñido con bromuro de etidio. Para el inserto antisentido del gen de Catepsina tipo B se obtuvo una banda de un peso aproximadamente menor a 1 kb correspondiente al amplificado esperado de 908 pb como se observa en la figura 12. En el caso del gen de Enolasa, se obtuvo una banda de un peso de entre 1.5 kb y 1 kb correspondiente al amplificado esperado de 1284 pb como se observa en la figura 13. En ambos casos se observan bandas de tamaños inespecíficos de menor intensidad que la del amplificado esperado. A consecuencia de ello, se escindió la banda correspondiente al inserto en cada caso y se purificó mediante un kit comercial como se mencionó previamente.

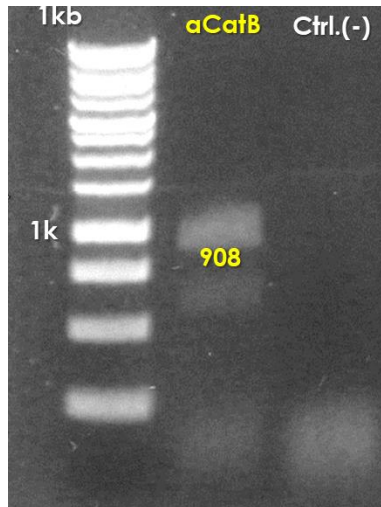


Figura 12. Ensayo de PCR. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% en el que se muestra la banda obtenida de la PCR empleando los oligonucleótidos A-CatB-F2 y A-CatB-R2.

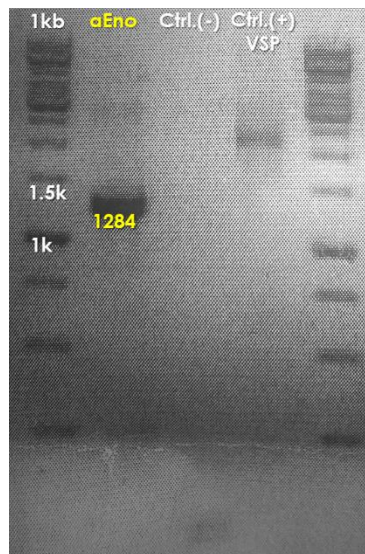


Figura 13. Ensayo de PCR. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% en el que se muestra la banda obtenida de la PCR empleando los oligonucleótidos A-Eno-F1 y A-Eno-R1.

Clonación en el vector de transición pJET1.2/Blunt y PCR de colonias candidatas

El inserto purificado se empleó para su clonación en el vector de transición pJET1.2/Blunt empleado el protocolo descrito. Las colonias obtenidas posterior a la transformación de

la reacción de clonación se evaluaron mediante PCR de colonias. Estas se analizaron en geles de agarosa. Las colonias de cuya PCR se obtuvo una banda del mismo tamaño que la obtenida en la reacción control con ADN genómico de *Giardia* se consideraron como positivas, siendo así 8 positivas de 16 colonias evaluadas para el gen de Catepsina tipo B (figura 14) y 3 de 16 para el gen de Enolasa (figura 15). De éstas, se seleccionó una y se cultivó en medio líquido para obtener plásmido para diagnóstico de perfil de restricción.

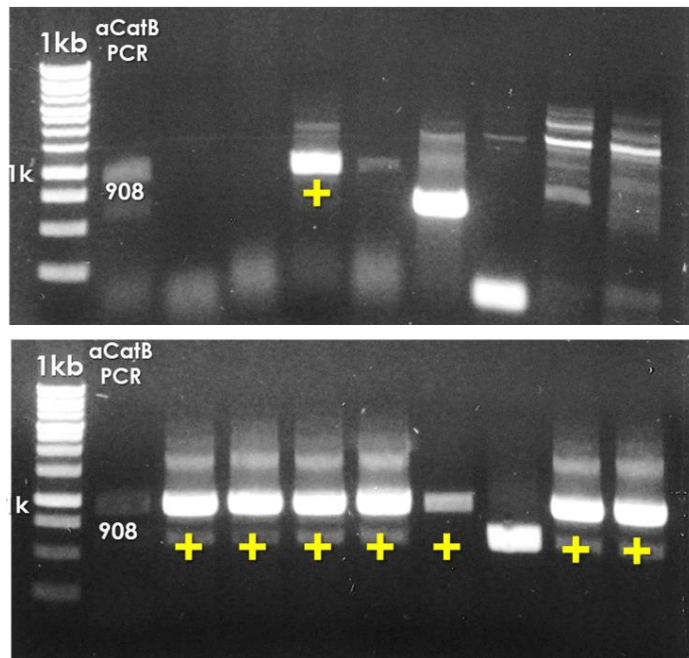


Figura 14. Ensayos de PCR de colonias para la transformación de la reacción de clonación del inserto antisentido para el gen de Catepsina tipo B con el vector de transcripción pJET1.2/Blunt. Con un signo de más (+) amarillo se muestran las bandas correspondientes a las colonias positivas para este inserto.

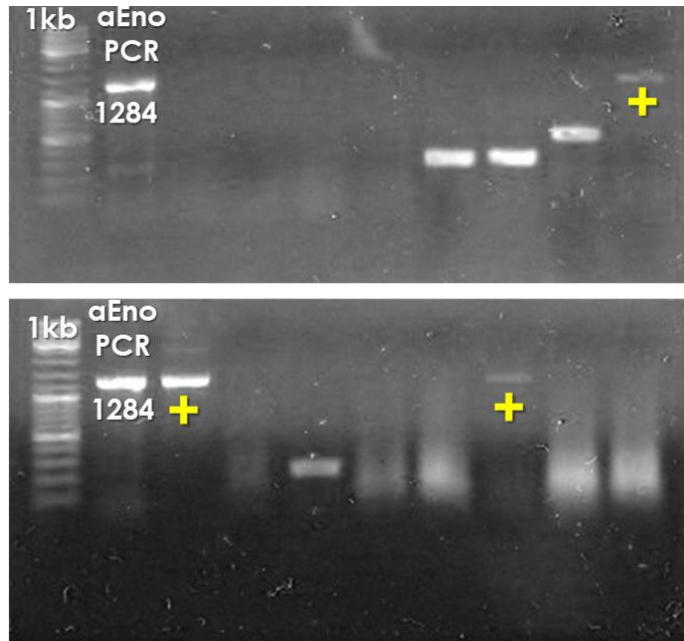


Figura 15. Ensayos de PCR de colonias para la transformación de la reacción de clonación del inserto antisentido para el gen de Enolasa con el vector de transición pJET1.2/Blunt. Con un signo de más (+) amarillo se muestran las bandas correspondientes a las colonias positivas para este inserto.

Clonación del inserto antisentido en el vector pNlop4 y comprobación de identidad e integridad de secuencia

Las colonias seleccionadas como positivas para cada clonación en el vector de transición fueron cultivadas para extracción de plásmido mediante el protocolo descrito, el cual fue digerido empleando las enzimas de restricción HindIII y BamHI para el gen de Catepsina tipo B. Concomitantemente se realizó la digestión del vector para transfección en *Giardia* pNlop4 empleando las mismas enzimas. Los fragmentos resultantes de la reacción de digestión se visualizaron mediante un gel de agarosa, del cual se escindieron las bandas correspondientes al inserto antisentido de Catepsina tipo B y el esqueleto del vector pNlop4 como se muestra en la figura 16, posteriormente se extrajo y purificó el ADN de estos fragmentos mediante un kit comercial como fue descrito.

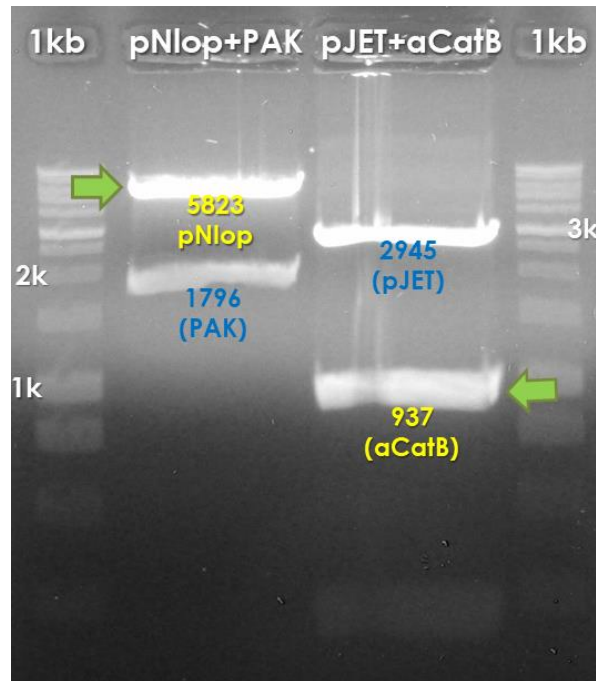


Figura 16. Análisis de la digestión del vector de transición pJET+inserto antisentido de Catepsina tipo B y del vector pNlop4 con las enzimas HindIII y BamHI. Con flecha verde y texto amarillo se indica las bandas correspondientes al esqueleto del vector para transfección en Giardia (5823 pb), así como el inserto antisentido para Catepsina tipo B (937 pb). El resto de las bandas, etiquetadas en azul, corresponden al fragmento PAK (1796 pb) y el esqueleto del vector de transición (2945 pb), que no fueron utilizados en ensayos posteriores.

En el caso del vector de transición con el inserto antisentido de Enolasa, se determinó que los sitios de restricción seleccionados no serían de utilidad debido a que éstos se encontraban en múltiples posiciones adicionales en el inserto como se muestra en la figura 17.

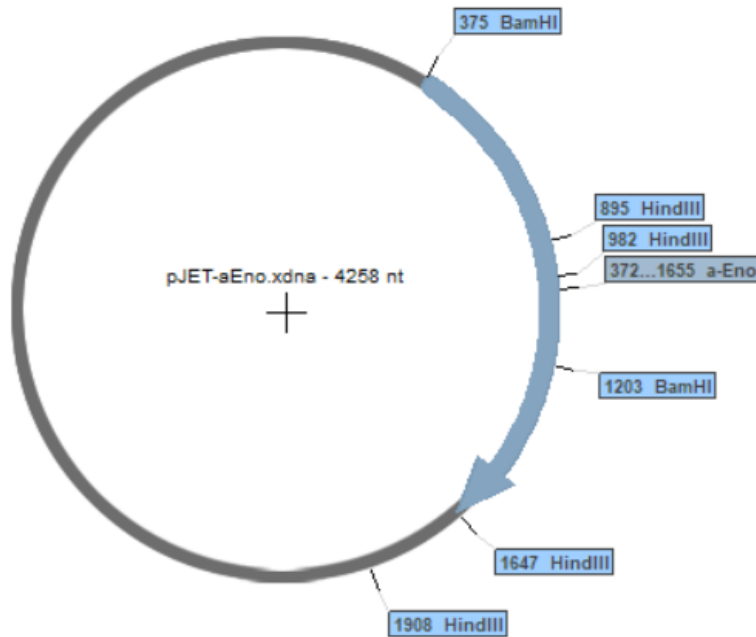


Figura 17. Mapa que muestra la presencia de múltiples sitios de restricción para HindIII y BamHI en el vector de transición con el inserto antisentido de Enolasa (a-Eno).

Con el fin de tener nuevos sitios de restricción, se verificó la orientación del inserto mediante restricción enzimática usando los sitios PvuII y NcoI, cuyos resultados se muestran en la figura 18. Con base en esto, se seleccionaron nuevos sitios de restricción propios del vector de transición para escindir el inserto antisentido. Como no existían dos pares de sitios de restricción únicos e iguales entre el vector de transición y el vector para transfección pNlop4 en la posición adecuada (posterior al promotor P1 y operadores Tet1 y Tet2), se decidió emplear el sitio NcoI (común para ambos vectores), y HindIII en pNlop4 y NotI del vector de transición como sitios cohesivos no compatibles que fueron digeridos para posteriormente ser convertidos a sitios romos por medio de la enzima Klenow exonucleasa negativa. Los fragmentos obtenidos a partir de este procedimiento (figura 19) se purificaron de gel de agarosa de la misma forma que los fragmentos obtenidos para Catepsina tipo B.

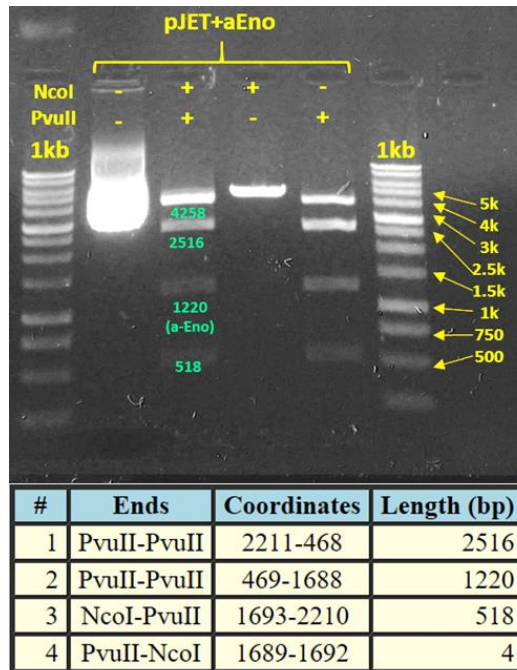


Figura 18. Análisis de la restricción del vector de transición con el inserto antisentido para Enolasa, empleando las enzimas PvuII y NcoI. En la tabla se muestran los tamaños esperados, mientras que en el gel se observan bandas correspondientes a dichos tamaños, así como una banda de plásmido sin digerir de 4258 pb.

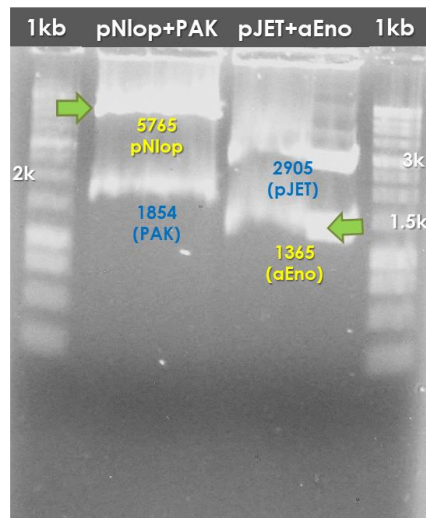


Figura 19. Análisis de los fragmentos obtenidos a partir de la restricción del vector de transición con el inserto antisentido de Enolasa y el vector pNlop4 con los nuevos sitios seleccionados.

El ADN obtenido para ambos genes fue ligado en una proporción 1:3 vector-inserto y la reacción obtenida fue transformada en *E. coli* Δ h5 α para obtener colonias candidatas, las cuales se evaluaron mediante PCR de colonias de la misma forma que en ocasiones anteriores. En este ensayo se obtuvieron 2 colonias positivas de 4 evaluadas para Catepsina tipo B como se muestra en la figura 20, mientras que para Enolasa se obtuvieron 10 positivas de 15 evaluadas como se muestra en la figura 21. Se seleccionó solo una de ellas en cada caso para realizar los ensayos posteriores.

Para verificar tanto la identidad como la integridad del ADN plasmídico purificado de cada banda para ambos genes, se realizaron para Catepsina tipo B dos reacciones de digestión, empleando en cada caso tres enzimas de restricción (EcoRV, ClaI y KpnI, así como XhoI, EcoRV y KpnI), y para Enolasa dos en cada caso (NcoI y NotI, así como NcoI y NsiI), seleccionadas con el fin de generar un patrón de bandeos el cual, además de verificar la presencia del inserto antisentido, el tamaño de los fragmentos correspondiera con el generado *in silico* (figura 24 para Catepsina tipo B y figura 26 para Enolasa) para la secuencia teórica de la construcción (figura 22 para Catepsina tipo B y figura 23 para Enolasa) a través de la plataforma de NEBCutter de New England Biolabs <nc2.neb.com/NEBcutter2>. En este ensayo se comprobó que las bandas obtenidas de la restricción corresponden en tamaño a las esperadas, como se muestra en las figuras 25 (Catepsina tipo B) y 27 (Enolasa).

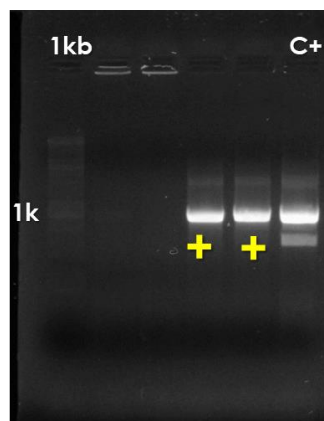


Figura 20. Análisis por PCR de colonias candidatas para la ligación del inserto antisentido de Catepsina tipo B e el vector pNlop4. Colonias positivas para el inserto marcadas con un signo más (+). El control empleado fue una PCR a partir de ADN genómico de *Giardia*.

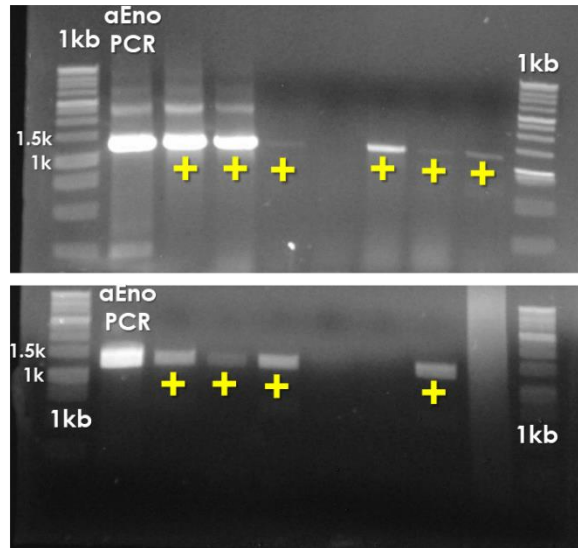


Figura 21. Análisis por PCR de colonias candidatas para la ligación del inserto antisentido de Enolasa e el vector pNlop4. Colonias positivas para el inserto marcadas con un signo más (+). El control empleado fue una PCR a partir de ADN genómico de *Giardia*.

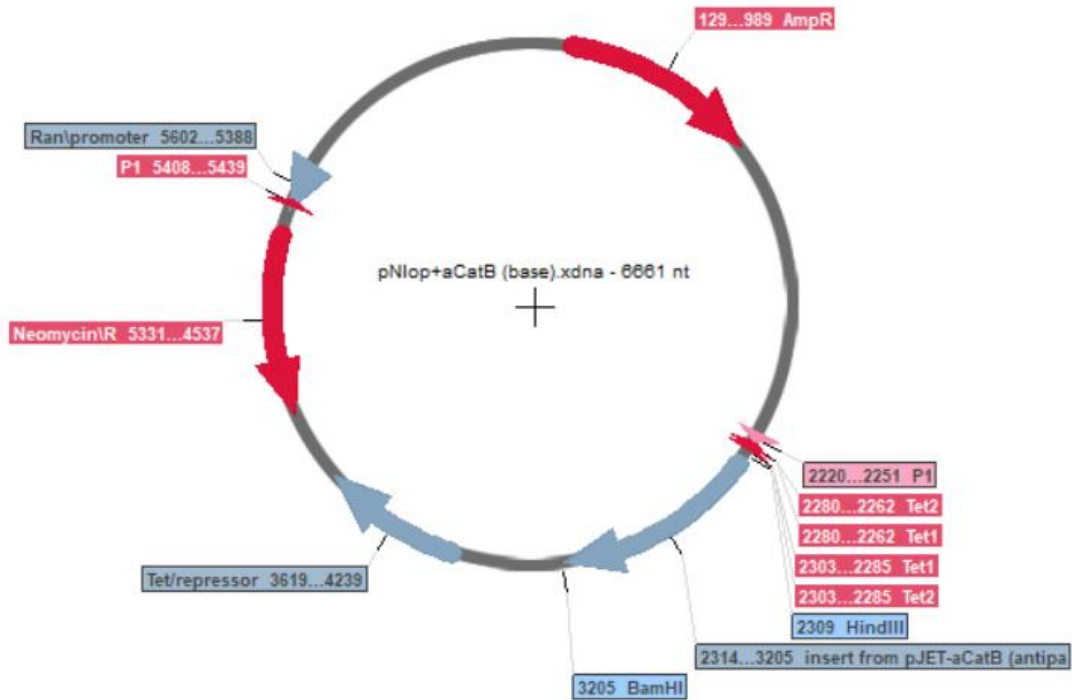


Figura 22. Mapa teórico del vector obtenido de la ligación del inserto antisentido para el gen de Catepsina tipo B de *G. duodenalis* y el vector de transfección en *Giardia* pNlop4. Los elementos se muestran identificados en el mapa, así como los sitios de restricción usados para la digestión y ligación (HindIII y BamHI).

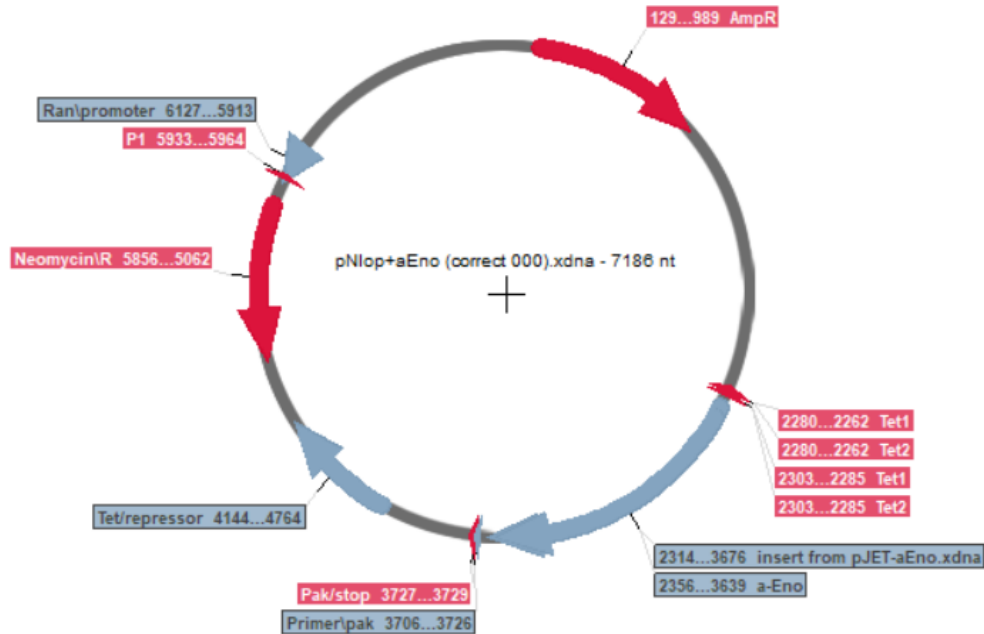


Figura 23. Mapa teórico del vector obtenido de la ligación del inserto antisentido para el gen de Enolasa de *G. duodenalis* y el vector de transfección en *Giardia* pNlop4. Los elementos se muestran identificados en el mapa.

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	EcoRV-KpnI	5821-2206	3047
2	ClaI-EcoRV	3519-5820	2302
3	KpnI-ClaI	2207-3518	1312

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	EcoRV-KpnI	5821-2206	3047
2	XhoI-EcoRV	4241-5820	1580
3	XhoI-XhoI	3065-4240	1176
4	KpnI-XhoI	2207-3064	858

Figura 24. Patrón de bandeado esperado (tamaño de los fragmentos esperados) al digerir el vector pNlop+aCatB con las enzimas de restricción EcoRV, ClaI y KpnI, así como con XhoI, EcoRV y KpnI. Información obtenida de la plataforma NEBCutter2.

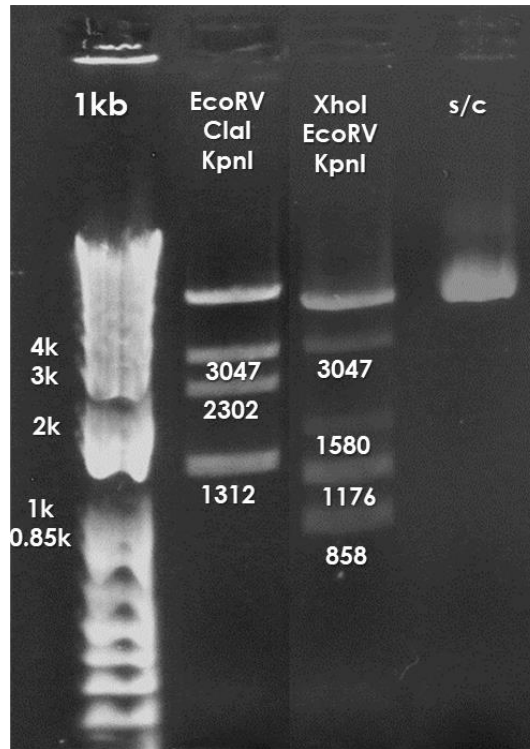


Figura 25. Análisis de patrón de bandeado obtenido al digerir el vector pNlop+aCatB con las enzimas de restricción seleccionadas. Se observa que los tamaños de las bandas corresponden con las esperadas al analizar el mapa teórico del vector, sin embargo, se observa que la digestión no fue completa puesto que aparece en ambos casos una banda correspondiente al vector sin digerir que migra a la misma altura que la banda del vector sin digerir (s/c).

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	NotI-NotI	6516-2316	2990
2	NcoI-NotI	3680-6515	2836
3	NotI-NcoI	2317-3679	1363

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	NotI-NotI	6516-2316	2990
2	NotI-NsiI	2317-4533	2217
3	NsiI-NotI	4534-6515	1982

Figura 26. Patrón de bandeado esperado (tamaño de los fragmentos esperados) al digerir el vector pNlop+aEno con las enzimas de restricción NotI y NcoI, así como con NotI y NsiI. Información obtenida de la plataforma NEBCutter2.

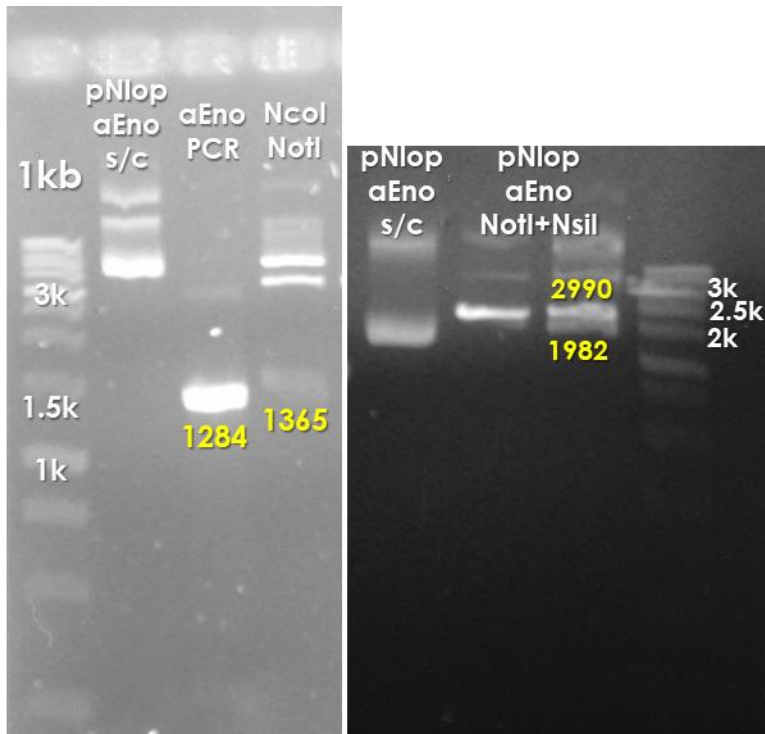


Figura 27. Análisis del patrón de bandeos obtenido al digerir el vector pNlop+aEno con las enzimas de restricción seleccionadas. Se observa que los tamaños de las bandas corresponden con las esperadas al analizar el mapa teórico del vector, sin embargo, se observa que la digestión no fue completa puesto que aparece en ambos casos una banda correspondiente al vector sin digerir que migra a la misma altura que la banda del vector sin digerir (s/c).

Una vez analizados los vectores pNlop+aEno y pNlop+aCatB mediante ensayo de restricción, se corroboró su integridad mediante secuenciación como fue descrito. Para ello se emplearon dos oligonucleótidos, F1 para amplificar el extremo 5' del fragmento antisentido, y R2 para amplificar el extremo 3' del mismo en cada caso. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 28, 29 (pNlop+aCatB), 30 y 31 (pNlop+aEno), en las cuales se observa que existe homología de secuencia entre el molde (secuencia esperada para cada plásmido respectivamente) y la obtenida de la secuenciación.

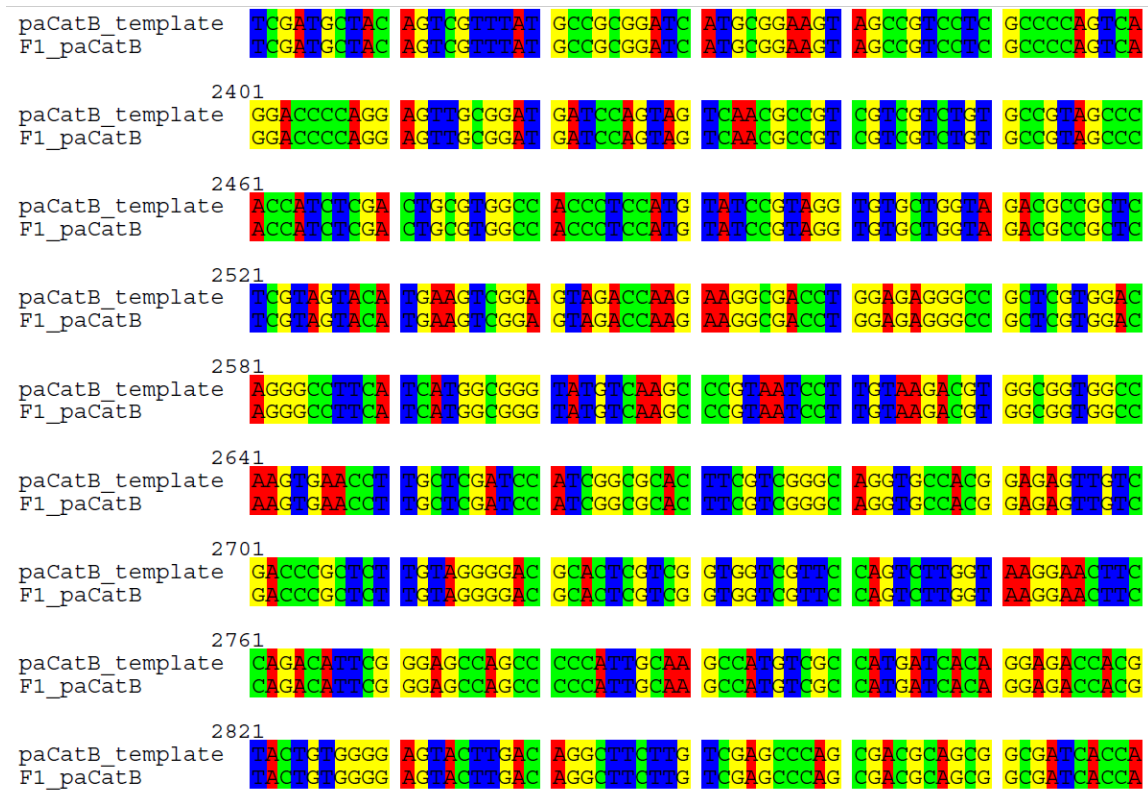


Figura 28. Secuenciación de pNlop+aCatB (paCatB) empleando el oligonucleótido F1 para amplificar el extremo 5' del inserto antisentido.

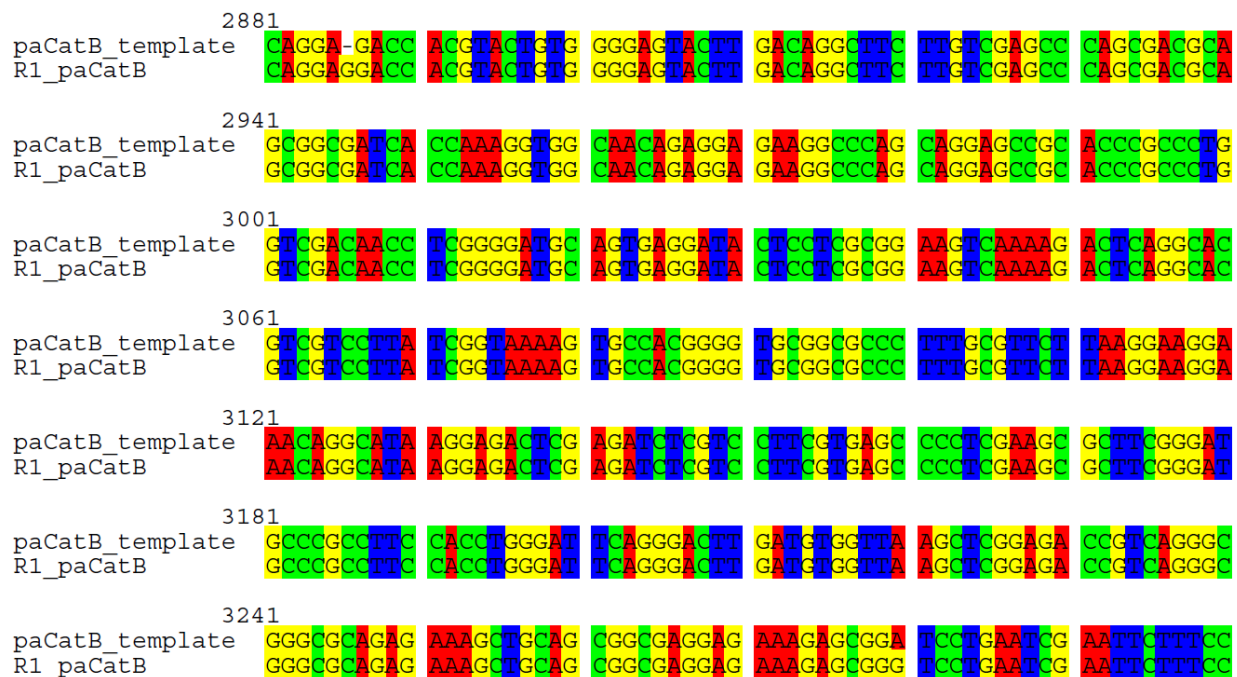


Figura 29. Secuenciación de pNlop+aCatB (paCatB) empleando el oligonucleótido R1 para amplificar el extremo 3' del inserto antisentido.

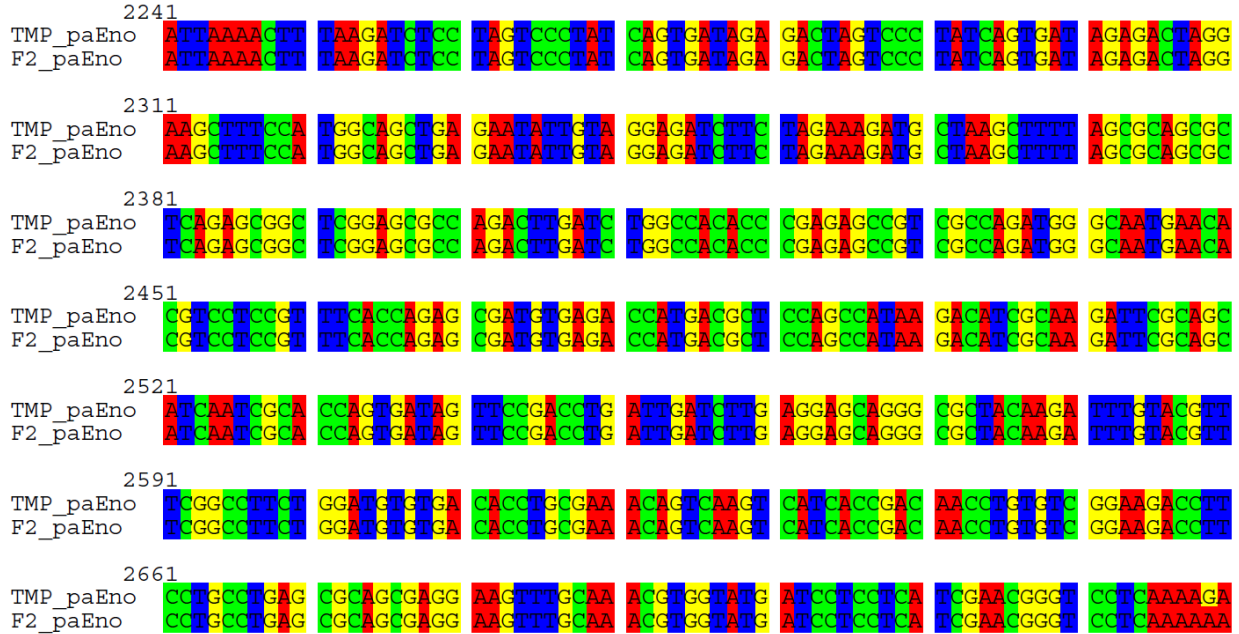


Figura 30. Secuenciación de pNlop+aEno (paEno) empleando el oligonucleótido F1 para amplificar el extremo 5' del inserto antisentido.

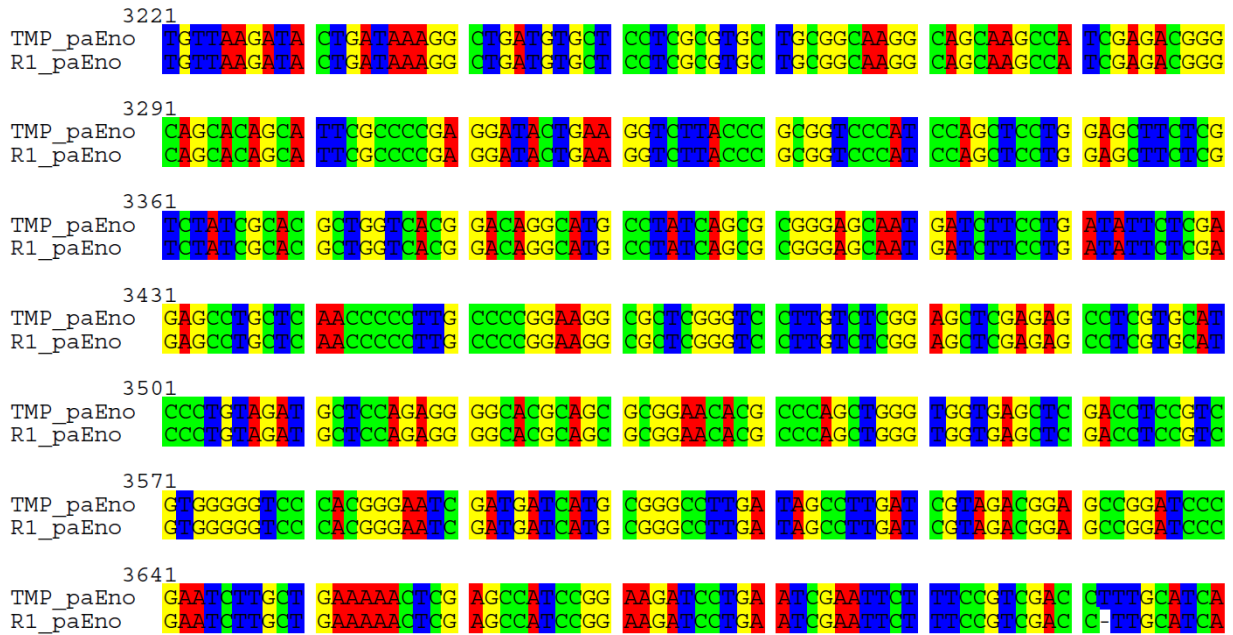


Figura 31. Secuenciación de pNlop+aEno (paEno) empleando el oligonucleótido R1 para amplificar el extremo 5' del inserto antisentido.

Evaluación de la eficiencia de silenciamiento

Posterior a la verificación de la integridad e identidad de la secuencia de los vectores pNlop+aCatB y pNlop+aEno, se obtuvo plásmido a partir de ambas colonias seleccionadas para estos ensayos y se transfectaron 35 µg de cada uno en trofozoítos de *G. duodenalis* WB previamente transfectadas con el vector de sobreexpresión de Catepsina tipo B etiquetada con FLAG para el caso del silenciamiento de Catepsina tipo B, y C99 para el caso del silenciamiento de enolasa, mediante electroporación como se describió en materiales y métodos. Una vez pasado el tiempo de recuperación de las células y 48 horas de selección con geneticina y puromicina para Catepsina tipo B, y solo geneticina para Enolasa, se observó que la viabilidad de los cultivos control transfectados con agua fue abatida en su totalidad, mientras que los cultivos transfectados con los plásmidos de silenciamiento presentaban ambos una confluencia aproximada del 70%. Estas células fueron empleadas para realizar ensayos preliminares de cinética de silenciamiento para cada gen, en los cuales se indujeron cultivos de trofozoítos transfectados usando 1, 5 y 10 µg/µL de doxiciclina durante 12 horas, con puntos para evaluación de la eficiencia establecidos en intervalos de 2 horas para Catepsina tipo B, y de 3 horas para Enolasa. De estos cultivos se extrajeron proteínas totales y se evaluó la expresión protéica mediante Western Blot empleando antiFLAG como anticuerpo primario para Catepsina tipo B, y un anticuerpo policlonal mono específico para Enolasa, subsecuentemente las bandas de reactividad con los anticuerpos empleados se reveló como se describió con anterioridad. En estos ensayos se evaluó la eficiencia de silenciamiento como disminución en la intensidad de la banda correspondiente a cada proteína en cada punto de la cinética comparada con el control sin inducir, en los cuales se determinó que existía un mayor silenciamiento al utilizar las concentraciones de 10 µg/mL de doxiciclina en ambos casos, a las 4 horas de inducción para Catepsina tipo B, y a las 6 horas para Enolasa. Una vez determinados estos parámetros, se llevó a cabo un segundo ensayo por duplicado para el cual se empleó el diseño experimental mostrado en la figura 32 para el silenciamiento de Catepsina tipo B, y en la figura 33 para el silenciamiento de Enolasa.

[Doxiciclina] µg/µL	TIEMPOS DE INCUBACIÓN				
	0 hr	2 hr	4 hr	6 hr	8 hr
0	A1, A2, C	A1, A2, C	A1, A2, C	A1, A2, C	A1, A2, C
10	A1, A2	A1, A2	A1, A2	A1, A2	A1, A2

Figura 32. Diseño experimental para la cinética de silenciamiento del gen de Catepsina tipo B de *G. duodenalis*. Se emplearon las concentraciones de 0 (sin inducir) y 10 µg/mL de doxiciclina para la inducción y se evaluó la eficiencia de silenciamiento a las 0, 2, 4, 6 y 8 horas post-inducción). C corresponde al control empleando trofozoítos de *G. duodenalis* WB con el vector para sobreexpresión de Catepsina tipo B, mientras que A1 y A2 corresponden a tratamientos idénticos empleando los trofozoítos usados en C transfectados con el vector pNlop+aCatB.

[Doxiciclina] µg/µL	TIEMPOS DE INCUBACIÓN			
	0 hr	3 hr	6 hr	9 hr
0	A1, A2, C	A1, A2, C	A1, A2, C	A1, A2, C
10	A1, A2	A1, A2	A1, A2	A1, A2

Figura 33. Diseño experimental para la cinética de silenciamiento del gen de Enolasa de *G. duodenalis*. Se emplearon las concentraciones de 0 (sin inducir) y 10 µg/µL de doxiciclina para la inducción y se evaluó la eficiencia de silenciamiento a las 0, 3, 6 y 9 horas post-inducción). C corresponde al control empleando trofozoítos de *G. duodenalis* C99, mientras que A1 y A2 corresponden a tratamientos idénticos empleando los trofozoítos usados en C trasfectados con el vector pNlop+aEno.

Las proteínas extraídas de cada tratamiento y control fueron cuantificadas mediante el ensayo colorimétrico de ácido bicinconínico. En la figura 34 se muestra una curva de calibración para la cinética de silenciamiento de Catepsina tipo B, y en la figura 35 para la cinética de silenciamiento de Enolasa.

26/06/2017		ABS1	ABS2	PROM	
CURVA	BLANCO	0	0.007	0.0035	
[BSA] 2mg/mL	ABS1	ABS2	ABS PROM	ABS REAL	
2	0.903	0.965	0.934	0.9305	
1	0.49	0.559	0.5245	0.521	
0.5	0.277	0.267	0.272	0.2685	
0.25	0.134	0.141	0.1375	0.134	
0.125	0.097	0.083	0.09	0.0865	
0.0625	0.053	0.053	0.053	0.0495	
0.03125	0.038	0.038	0.038	0.0345	

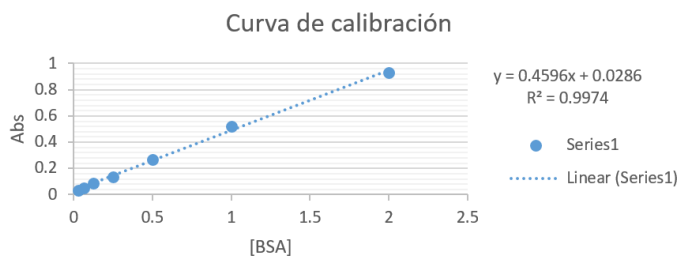


Figura 34. Curva de calibración estándar empleada para la cuantificación de proteínas obtenidas de la cinética de silenciamiento de Catepsina tipo B.

08/11/2017		ABS1	ABS2	PROM	
CURVA	BLANCO	0.13	0.136	0.133	
[BSA] 2mg/mL	ABS1	ABS2	ABS PROM	ABS REAL	
2	0.845	0.809	0.827	0.694	
1	0.475	0.522	0.4985	0.3655	
0.5	0.347	0.342	0.3445	0.2115	
0.25	0.247	0.234	0.2405	0.1075	
0.125	0.209	0.179	0.194	0.061	
0.0625	0.17	0.178	0.174	0.041	

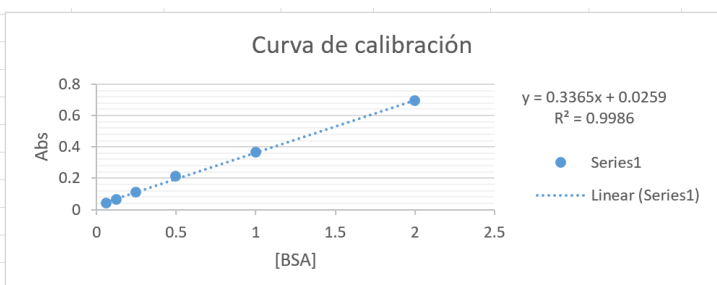


Figura 35. Curva de calibración estándar empleada para la cuantificación de proteínas obtenidas de la cinética de silenciamiento de Enolasa.

Una vez reveladas las membranas obtenidas en los ensayos de Western Blot para los tratamientos de ambas cinéticas, se determinó la eficiencia de silenciamiento a partir de un análisis densitométrico empleando el software ImageJ como fue descrito anteriormente. En la figura 36 se muestra el promedio de los datos obtenidos del análisis densitométrico de 3 ensayos por duplicado (tratamientos A1 y A2) de cinética de silenciamiento de Catepsina tipo B, donde se observa una clara disminución de la expresión de esta proteína a las 4 horas post-inducción, siendo ésta de 37% de expresión (63% de silenciamiento) con respecto al control C, y de 54% de expresión (46% de silenciamiento) con respecto al tratamiento sin inducción 0. No se observa mayor diferencia en el porcentaje de expresión entre los tratamientos inducido y sin inducción en el resto de los tiempos. En la parte inferior de esta figura se observa un resultado representativo de los Western Blots empleados para realizar el análisis densitométrico.



Figura 36. Análisis densitométrico de la cinética de silenciamiento para el gen de Catepsina tipo B. Se observa mayor eficiencia de silenciamiento de la proteína a las 4 horas post-inducción con 10 μg/μL de doxiciclina (37% y 54% de expresión, 63% y 46% de silenciamiento con respecto al control C y al tratamiento sin inducción 0, respectivamente). Promedio de 3 ensayos por duplicado.

En el caso del silenciamiento de Enolasa, la figura 37 se muestra el promedio de los datos obtenidos del análisis densitométrico de 2 ensayos por duplicado (tratamientos A1 y A2) de cinética de silenciamiento de este gen, donde se observa una clara disminución de la expresión de esta proteína a las 6 horas post-inducción, siendo ésta de 34% de expresión (66% de silenciamiento) con respecto al control C, y de 39% de expresión (61% de silenciamiento) con respecto al tratamiento sin inducción. No se observa mayor diferencia en el porcentaje de expresión entre los tratamientos inducido y sin inducción en el resto de los tiempos. En la parte inferior de esta figura se observa un resultado representativo de los Western Blots empleados para realizar el análisis densitométrico.

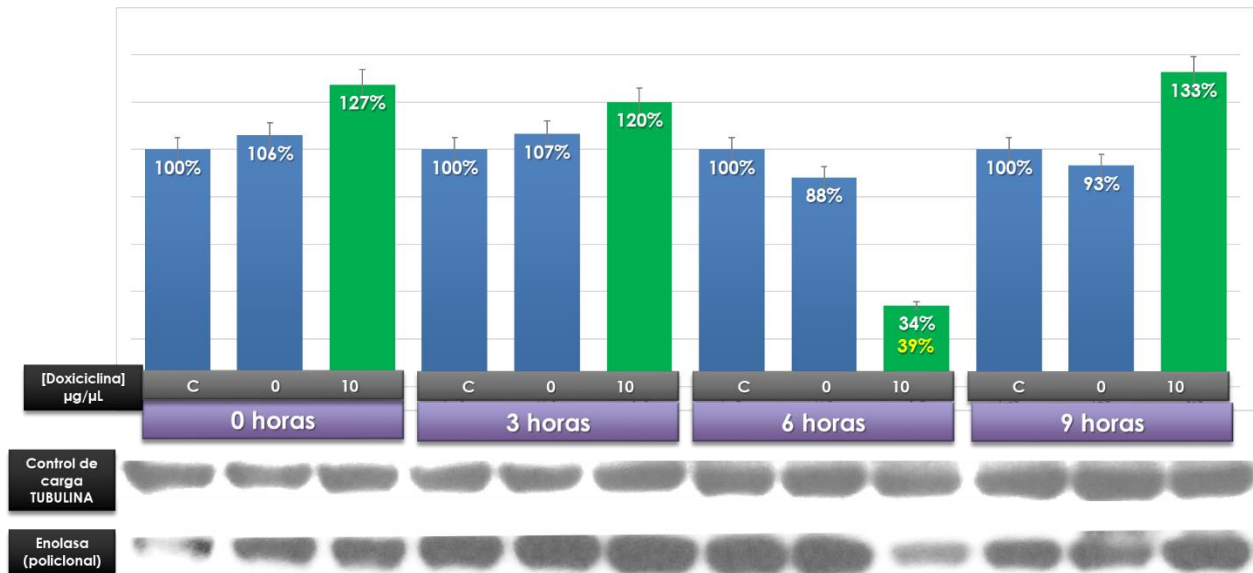


Figura 37. Análisis densitométrico de la cinética de silenciamiento para el gen de Enolasa. Se observa mayor eficiencia de silenciamiento de la proteína a las 6 horas post-inducción con 10 µg/mL de doxiciclina (34% y 39% de expresión, 66% y 61% de silenciamiento con respecto al control C y al tratamiento sin inducción 0, respectivamente). Promedio de 2 ensayos por duplicado.

Evaluación del efecto del silenciamiento de Catepsina tipo B de *G. duodenalis* empleando modelos de interacción con células epiteliales.

Con el fin de determinar si el silenciamiento del gen de Catepsina tipo B había tenido efecto en el daño generado por trofozoítos de *G. duodenalis* sobre monocapas de células IEC-6. Este ensayo se realizó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Se emplearon monocapas de alrededor de 500,000 células IEC-6 dispuestas por duplicado para cada tratamiento sobre una placa de 24 pozos. Los controles utilizados fueron las células del cultivo sin trofozoítos añadidos como blanco del ensayo, IEC-6 coincubadas con trofozoítos WB con alta reactividad para Catepsina tipo B como control positivo de daño, e IEC-6 coincubadas con trofozoítos WB con baja reactividad para Catepsina tipo B como control negativo de daño. Los tratamientos correspondieron a células IEC-6 coincubadas con los trofozoítos empleados durante la cinética de silenciamiento para Catepsina tipo B (WB transfectada con el vector de sobreexpresión pAC-CatB, y WB transfectadas tanto con el vector de sobreexpresión como con el vector de silenciamiento

pNlop+aCatB inducidas durante 4 horas de acuerdo a los resultados de la cinética de silenciamiento mostrados en la figura 36). Estos trofozoítos fueron procesados bajo las mismas condiciones y parámetros que durante las cinéticas y una vez cumplido el tiempo post-inducción se les realizaron lavados y se contabilizaron de acuerdo a lo descrito en métodos. Una vez hecho esto, se inició la interacción con las monocapas. Para el ensayo se emplearon 2×10^6 de trofozoítos por pozo y se coincubaron durante 3 horas a 37°C y 20% de CO₂. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Posterior al término de este tiempo, se recolectó el sobrenadante de cada tratamiento y se centrifugó para retirar los trofozoítos, éste se utilizó en un ensayo funcional de actividad proteolítica por zimograma descrito más adelante. Las monocapas se fijaron como se describió en la sección de material métodos y se observaron por microscopía de campo claro a 10X de aumento (objetivo AX10plan) y empleando el software ZEN Lite 2011, con el fin de analizar las diferencias en el daño ocasionado por los trofozoítos sobre la monocapa de IEC-6. En la figura 38 se muestran los resultados obtenidos del ensayo funcional de interacción. En los co-cultivos de células IEC-6 con trofozoitos que tenían una expresión alta de la catepsina B se observó daño a las monocapas delineado por la formación de cuerpos apoptóticos en éstas y la separación de las células entre sí y del sustrato. En los controles que incluyeron co-cultivos de células IEC-6 y trofozoitos con una expresión muy baja de la catepsina B prácticamente no se observó daño celular. En los co-cultivos de células trasfectadas con el vector pAC-CatB o trofozoitos trasfectados con este vector y el vector de silenciamiento pNlop+aCatB se observaron daños en las monocapas semejantes a los inducidos por los trofozoitos CatB+. Los co-cultivos en los que se analizó el efecto de los trofozoitos silenciados con el vector de silenciamiento pNlop+aCatB el daño a las monocapas se disminuyó considerablemente ya que se observaron un número menor de células con cuerpos apoptóticos. Estos resultados indican que el silenciamiento del gen que codifica para la proteína catepsina B disminuye el daño a las células epiteliales sugiriendo que esta proteína puede considerarse como un factor de virulencia de *G. duodenalis*.

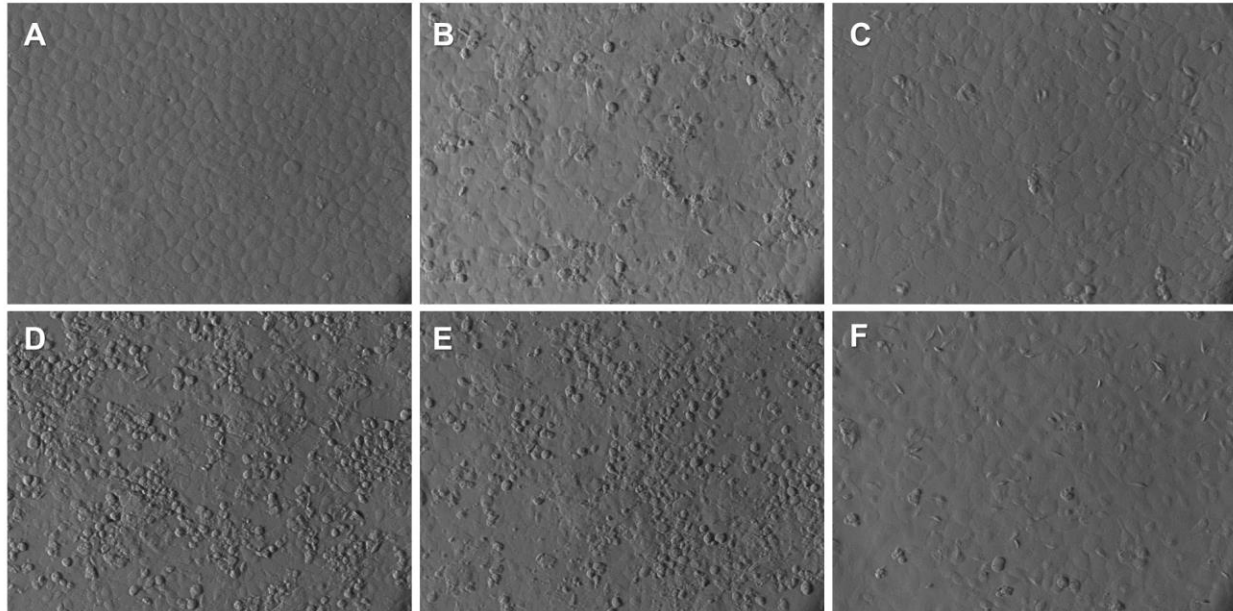


Figura 38. Micrografías de los ensayos funcionales de interacción de células IEC-6 con diferentes poblaciones de trofozoítos de *G. duodenalis* para evaluar el efecto del silenciamiento del gen de Catepsina tipo B sobre el daño generado a las monocapas después de 3 horas de incubación. A) Control de cultivo de células IEC-6 con medio DMEM sin trofozoítos añadidos donde se observa una estructura íntegra de la monocapa. B) Co-incubación de estas células con trofozoitos WB de alta reactividad donde se observa la aparición de cuerpos apoptóticos y separación de las células entre sí y del sustrato. C) Co-incubación con WB de baja reactividad donde prácticamente no se observa daño a la monocapa. D) Control de WB que sobreexpresa Catepsina tipo B mediante el vector pAC+CatB, se observa un alto número de cuerpos apoptóticos y ruptura de la integridad de la monocapa. E) Trofozoítos WB transfectadas con pAC-CatB y pNlop+aCatB sin inducir, se observa daño similar en la monocapa al inducido por trofozoitos WB CatB+ F) WB transfectadas con pAC-CatB y pNlop+aCatB inducidas durante 4 horas, se observa menor daño caracterizado por un menor número de cuerpos apoptóticos y mayor conservación de la integridad de la monocapa.

Evaluación de la actividad proteolítica de los sobrenadantes del ensayo de interacción

El efecto del silenciamiento de Catepsina tipo B se evaluó paralelamente determinando la actividad proteolítica en los sobrenadantes obtenidos de los ensayos de ensayo de interacción y concentrados 5 veces mediante centrífuga. Esto se evaluó mediante zimogramas SDS-PAGE. En la figura 39 se muestra el resultado obtenido de este ensayo en la que se observa una disminución importante de la intensidad de la banda generada a partir del sobrenadante correspondiente al tratamiento de los trofozoítos inducidos, con respecto al tratamiento no inducido y al control de sobreexpresión de la CatB. La actividad proteolítica sobre gelatina como sustrato se cuantificó mediante densitometría de la banda correspondiente a la Catepsina tipo B (~25 kDA) (Figura 40).

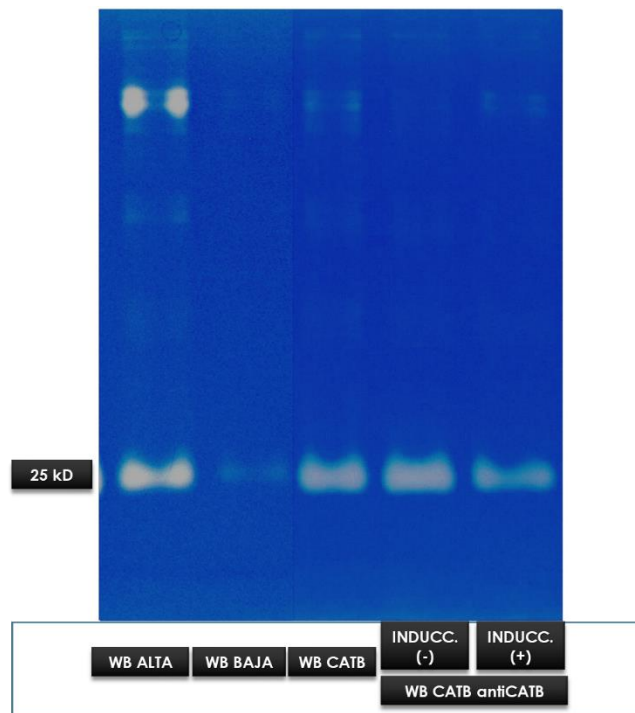


Figura 39. Ensayo de zimograma SDS-PAGE empleando sobrenadantes obtenidos del ensayo de interacción de 3 horas empleando monocapas de IEC-6 coincubadas con diferentes poblaciones de trofozoítos de *G. duodenalis*. En este ensayo se observó que la banda de 25 kDA, que corresponde a la catepsina B se encuentra disminuída en cuanto a la actividad proteolítica en el sobrenadante correspondiente a la co-incubación con trofozoítos transfectados con los vectores pAC-CatB y pNlop+aCatB para

silenciamiento inducidos durante 4 horas (WB CATB antiCATB INDUCC. (+). Esto con respecto a la co-incubación de de las células IEC-6 con trofozoítos sin inducción (WB CATB antiCATB INDUCC. (-)), y al control de co-incubación con trofozoítos transfectados con pAC-CatB para sobre-expresión de Catepsina tipo B (WB CATB). Los sobrenadantes de co-incubación con trofozoítos WB de alta (WB ALTA) y baja reactividad (WB BAJA) que mostraron una alta y baja reactividad de la CatB fueron empleados como controles de alta y baja actividad proteolítica respectivamente.

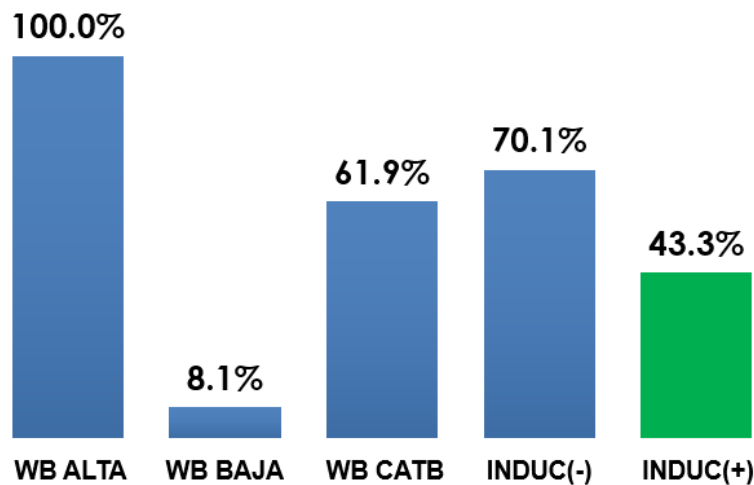


Figura 40. Análisis densitométrico del ensayo de zimograma SDS-PAGE. Los porcentajes fueron calculados tomando como 100% la actividad proteolítica correspondiente a la co-incubación con trofozoítos WB de alta reactividad (WB ALTA). Se observa una disminución al 43.3% de esta actividad en el sobrenadante de la co-incubación con los trofozoítos transfectados con los vectores pAC-CatB y pNlop+aCatB para silenciamiento inducidos durante 4 horas (INDUC(+)), siendo menor que la del sobrenadante correspondiente a la co-incubación de estos mismos trofozoítos sin inducción (INDUC(-)), y a la del sobrenadante correspondiente a la co-incubación co-incubación con trofozoítos trasfectados con pAC-CatB para sobreexpresión de Catepsina tipo B (WB CATB).

DISCUSIÓN

El desarrollo de la patogénesis durante la giardiasis es un proceso en el que interviene, entre otros múltiples factores, la secreción de componentes de superficie del trofozoíto durante su adhesión al epitelio intestinal (Ringqvist, et al., 2008). La identificación y estudio del papel de estos componentes como potenciales factores de virulencia y en la generación del daño durante la interacción hospedero-parásito es de crucial importancia para el entendimiento de los mecanismos que participan en esta enfermedad de tan elevada frecuencia a nivel mundial.

En nuestro equipo de trabajo se han estudiado mediante ensayos *in vitro* a la Catepsina tipo B y a la enzima Enolasa de *G. duodenalis*, dos de las proteínas que se secretan durante la interacción de este parásito con el hospedero y que se ha descrito que se asocian con el daño a células epiteliales durante la interacción de éstas con las proteínas mencionadas (Gómez-Mondragón, Tesis 2011) (Barroeta-Echegaray, Tesis 2013).

Uno de los métodos para corroborar que el daño ocasionado en las células epiteliales ocurre por la acción de estas proteínas del trofozoitos, y determinar su participación en la patogénesis de la giardiasis, es la utilización de sistemas de manipulación de la expresión génica. Para ello, existen diversos métodos como es el caso de la transfección de plásmidos para expresión de material génico de forma episomal, para el cual se ha demostrado co-expresión de hasta tres proteínas distintas (Faso, et al., 2012).

Otro método útil y que se ha implementado en otros organismos, es el sistema de ARN antisentido, también conocido como ARN de interferencia (RNAi), para evaluar el papel de la Catepsina tipo B y Enolasa de *G. duodenalis* sobre el daño a monocapas de células epiteliales IEC-6. Este ha demostrado ser efectivo en *G. duodenalis* para la degradación de los ARN mensajeros a través de un mecanismo post-transcripcional de silenciamiento génico. En este interviene la reducción de la vida media o estabilidad de estas moléculas y el bloqueo de la maquinaria de traducción, siendo así sustancialmente más efectivo que el empleo de sistemas endógenos o exógenos mediante cadenas dobles cortas de ARN (Rivero, et al., 2010). Además, este sistema de silenciamiento, como se utilizó en el presente proyecto, presenta la ventaja de que su expresión en el vector es controlada mediante la inducción por doxiciclina, permitiendo así determinar de forma precisa la

ventana de tiempo en la cual fue posible observar el efecto del silenciamiento sobre la expresión y actividad de estas proteínas. Así mismo permitió estandarizar dichos parámetros sin comprometer la viabilidad de los trofozoítos transfectados. Este sistema de inducción consiste en la integración de los elementos del operador-represor tet bacteriano y el promotor P1 de *Giardia* en un vector de expresión episomal viable y previamente probado para transfección en *Giardia* (Sun & Tai, 2000), en el cual se insertan promotores sensibles a tetraciclina (o análogos) y múltiples operadores tet junto con un promotor tipo ran sintético para controlar la expresión del gen resistencia a genética. En este proyecto se determinó que la concentración de 10 µg/mL de doxiciclina como agente inductor permitió obtener una mayor eficiencia de silenciamiento, tanto para Catepsina tipo B como para Enolasa, en un periodo de 4 y 6 horas post-inducción respectivamente. En tanto que a concentraciones más altas este inductor no fue efectivo. Estos resultados coinciden con lo reportado por el equipo de trabajo responsable del desarrollo del sistema de inducción, quienes probaron su efectividad mediante la expresión de un gen reportero de luciferasa, donde se observó que al emplear un promotor de alfa-giardina sintético y 2 operadores tet se obtenía la mayor actividad de luciferasa a 10 horas post-inducción cuando se empleaba una concentración de doxiciclina (análogo de tetraciclina) de 10 µg/mL. A concentraciones más altas del agente inductor, no hubo cambio sustancial sobre la actividad de luciferasa y se mantuvieron niveles relativamente estables de señal hasta 50 horas posterior a la inducción (Sun & Tai, 2000).

En algunos estudios se ha encontrado que la eficiencia de silenciamiento de este sistema es variable y depende del gen seleccionado como blanco, puesto que al dirigirlo contra proteínas altamente expresadas como tubulina o la proteína específica de estadio de pared quística 2, el efecto de silenciamiento no fue evidente. Por el contrario, el silenciamiento sí fue efectivo cuando se le dirigió a las subunidades medias de adaptinas y contra la expresión exógena de la proteína verde fluorescente (GFP) (Rivero, et al., 2010).

En el presente proyecto se logró obtener eficiencias de silenciamiento para la Catepsina tipo B del 63% con respecto a los trofozoítos de *G. duodenalis* que la expresan de forma

constitutiva y de 46% respecto a los trofozoítos transfectados con este sistema de silenciamiento sin inducir. En el caso de la Enolasa se obtuvo un 66% de silenciamiento con respecto a los trofozoítos silvestres y de 64% con respecto a los transfectados con el sistema sin inducir. Estos resultados son comparables y considerablemente mayores a los obtenidos en otro estudio en el que se empleó el sistema de ARN antisentido para evaluar el papel de proteínas en la viabilidad de *G. duodenalis* con el fin de identificar nuevos blancos para desarrollo de fármacos, en particular de la enzima NADH Oxidasa (Marcial-Quino, et al., 2017). En este estudio se construyó un vector para síntesis de un ARN de cadena doble con el fin de silenciar el gen que codifica para dicha proteína. La eficiencia de silenciamiento fue de 30%, expresada como reducción en el número de ARN mensajeros y se observó también una consecuente reducción de la actividad enzimática y del número de trofozoítos con respecto a la cepa silvestre, demostrando así la importancia de la enzima NADH oxidasa en la viabilidad de *G. duodenalis* (Marcial-Quino, et al., 2017).

La aplicación de enfoques genéticos y de biología celular para el estudio de *Giardia duodenalis* se enfrenta a diversos factores limitantes. Entre ellos se encuentran la naturaleza diploide o binucleada del parásito tan solo en su estadio de trofozoíto, mientras que en el estadio de quiste es tetraploide. Se ha demostrado que la inserción de material genético en el genoma del parásito ocurre solo en uno de los dos cromosomas que posee el parásito, a pesar de que ambos núcleos son capaces de aceptar este tipo de inserciones. Además de ello, existe un número limitado de antibióticos capaces de ser utilizados para la selección de transfectantes en este parásito (Wampfler, et al., 2014).

Otros de los factores que se han descrito tienen impacto en la eficiencia de silenciamiento es la longitud de la doble cadena generada por el apareamiento de la secuencia antisentido con el blanco del ARN mensajero, la cantidad de transcrito generado por el gen blanco y su vida media, así como los elementos que contiene o el tipo de vector que se empleó para la expresión del sistema mismo (Touz, et al., 2004). Es posible que estos últimos factores sean los responsables de la recuperación de la expresión de los genes silenciados en ese ensayo, Catepsina tipo B y Enolasa, posterior al tiempo identificado

como en el que se observaba la mayor eficiencia de silenciamiento (4 y 6 horas respectivamente).

Si bien, el silenciamiento de la expresión proteica no fue total, en el caso de la catepsina B puede deberse a que *G. duodenalis* posee numerosas cisteína-proteasas que pertenecen a las ramas de divergencia temprana de la familia de la Catepsina tipo B, así como otras proteasas, de entre las cuales se ha descrito su efecto en el daño sobre el epitelio, como es el caso de la VSP9B10A (Cabrera-Licon, et al., 2017). Otro factor importante a consideración es que el silenciamiento fue dirigido hacia una Catepsina tipo B expresada de forma constitutiva empujando un vector con el fin de observar una expresión estable de la misma. En el caso de la enolasa debido a que esta es una enzima multifuncional y muy importante en el metabolismo de *Giardia*, fue posible observar un porcentaje importante en el silenciamiento de la misma en los trofozoítos transfectados y queda por analizar el efecto de éste sobre las actividades de esta proteína, en particular con referencia a la actividad citotóxica de ésta sobre células epiteliales (Barroeta, E y col. Manuscrito en preparación).

Una vez que se ha desarrollado un sistema de silenciamiento de genes, el siguiente paso es el empleo de ensayos funcionales para la evaluación del efecto del silenciamiento de un gen en particular. En el caso de este estudio este enfoque fue crucial para la determinación del papel de las proteínas catepsina B y enolasa que participan tanto en el daño a células epiteliales, y consecuentemente en la patogénesis de la giardiasis, como en el metabolismo del parásito. En el presente proyecto se evaluó el efecto del silenciamiento de la Catepsina tipo B de *G. duodenalis* sobre el daño que causa este parásito durante su interacción con el epitelio intestinal. La reducción de la expresión de esta cisteína-proteasa a través del silenciamiento por ARN antisentido inducible demostró que el daño causado a las monocapas de IEC-6 co-incubadas con trofozoítos silenciados para esta proteína fue cualitativa y considerablemente menor con respecto al de las células co-incubadas con trofozoítos que expresaban la Catepsina tipo B de forma constitutiva. Así mismo, la determinación de la actividad proteolítica de esta proteína mediante ensayos de zimogramas mostró una reducción significativa de ésta en los trofozoítos en los que el gen de esta proteína fue silenciado. Estos resultados

representan así una evidencia más para confirmar el papel de las cisteína-proteasas, en particular de la Catepsina tipo B en la patogénesis de la giardiasis.

Este tipo de proteínas han sido descritas como las responsables de diversos procesos del desarrollo de la patogénesis mediante interacciones hospedero-parásito, como es el caso de la invasión de las mucosas, adherencia al epitelio, citotoxicidad, disrupción del citoesqueleto de glóbulos rojos, hemólisis, y evasión de la respuesta inmune del hospedero (Hernández, et al., 2014). Estos efectos tienen impacto en el desarrollo y generación de síntomas tanto de las enfermedades inflamatorias gastrointestinales como en el síndrome de intestino irritable, para las cuales se han aplicado tratamientos no muy efectivos en la resolución de los síntomas y en la prevención de aparición de síntomas crónicos (Sałaga, et al., 2013). En el caso de *G. duodenalis*, se ha descrito mediante el uso de zimogramas que las proteasas secretadas durante la interacción trofozoíto-epitelio presentan actividad colágeno-lítica, atribuido principalmente a cisteína-proteasas mediante ensayos de inhibición (Piña-Vázquez, et al., 2012). Este tipo de ensayos se han empleado para analizar el efecto en el daño a monocapas de células MDCK cocubadas con trofozoítos amoeboides de *Naegleria fowleri*, y el efecto de daño a las monocapas se inhibió al emplear el inhibidor E-64 se previene el (Shibayama, et al., 2013). Se ha demostrado también la participación de las moléculas de expresión en superficie de *G. duodenalis* durante el proceso de adhesión de los trofozoítos al epitelio mediante modelos experimentales en gerbos (*Meriones unguiculatus*) y el empleo de anticuerpos monoclonales específicos de superficie, donde se demostró que la deficiencia en adhesión de los trofozoítos se correlaciona con una expresión reducida de un componente de superficie de 200 kDa (Hernández-Sánchez, et al., 2008) que ha sido identificado como la catepsina B de *G. duodenalis* (Ortega-Pierres. 2017. Sometido a publicación)

Si bien, el silenciamiento de la expresión protéica no fue total, esto puede deberse a que *G. duodenalis* posee numerosas cisteína-proteasas que pertenecen a las ramas de divergencia temprana de la familia de la Catepsina tipo B, así como otras proteasas, de entre las cuales se ha descrito su efecto en el daño sobre el epitelio, como es el caso de la VSP9B10A (Cabrera-Licon, et al., 2017). Otro factor importante a consideración es

que el silenciamiento fue dirigido hacia una Catepsina tipo B expresada de forma constitutiva empleando un vector con el fin de observar una expresión estable de la misma.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo permiten sugerir que el sistema de silenciamiento empleado en este trabajo permitió observar una disminución en la expresión de dos proteínas de *G. duodenalis*, la Catepsina B y la enolasa cuyo papel es muy relevante en el daño ocasionado a células epiteliales por trofozoítos que las expresan. Por otro lado, los ensayos funcionales con los trofozoítos en los que se silenció parcialmente la catepsina B aportan datos muy importantes en cuanto a la función de esta proteína como factor de virulencia de este parásito y su papel en la patogénesis de la giardiasis.

CONCLUSIONES

- La efectividad del sistema de ARN antisentido en el silenciamiento del gen de Catepsina tipo B de *G. duodenalis* fue de 63% a las 4 horas de inducción respecto al control y de 46% respecto al tratamiento sin inducción.
- La efectividad del sistema de ARN antisentido en el silenciamiento del gen de enolasa de *G. duodenalis* fue de 66% a las 6 horas de inducción respecto al control y de 64% respecto al tratamiento sin inducción.
- El silenciamiento del gen de catepsina tipo B en trofozoítos de *G. duodenalis* se reflejó en un menor daño en monocapas de IEC-6 en comparación con los trofozoítos que expresan la catepsina B, el cual coincidió con una menor actividad proteolítica de esta enzima en los sobrenadantes de interacción de células IEC-6 con trofozoítos silenciados para el gen de la catepsina B.

PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto del silenciamiento del gen de Enolasa en trofozoitos de *G. duodenalis* sobre el daño a monocapas de células IEC-6 mediante ensayos de interacción.
- Inducir el silenciamiento de gen de catepsina B en trofozoitos silvestres que expresan esta enzima y evaluar éste en ensayos funcionales
- Emplear este sistema de silenciamiento para otras proteínas de *G. duodenalis*.

Referencias

- Allain, T. y otros, 2017. Interactions of *Giardia* sp. with the intestinal barrier: epithelium, mucus, and microbiota. *Tissue Barriers*, 5(1).
- Andersson, J. O. y otros, 2003. Phylogenetic analyses of diplomonad genes reveal frequent lateral gene transfers affecting eukaryotes. *Current Biol*, pp. 94-104.
- Barash, N. R., Maloney, J. G., Singer, S. M. & Dawson, S. C., 2017. *Giardia* alters commensal microbial diversity throughout the murine gut. *Infect. Immun.*, Issue 10.1128.
- Barroeta-Echegaray, E., Tesis 2013. *Clonación, caracterización y evaluación de la participación de la proteína enolasa de Giardia duodenalis durante su interacción con células epiteliales.*, Ciudad de México: Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Bazán-Tejeda, M. L. y otros, 2006. Protein kinase C isoforms from *Giardia duodenalis*: identification and functional characterization of a beta-like molecule during encystment.. *Arch. Microbiol.* 187, pp. 55-66.
- Benyacoub, J. y o., 2005. *Enterococcus faecium* SF68 enhances the immune response to *Giardia intestinalis* in mice.. *J. Nutr.* 135, pp. 1171-1176.
- Bernal, D. y otros, 2004. Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*.. *FEBS Lett.* 563, pp. 203-206.
- Bhindi, R. y otros, 2007. Brothers in Arms. DNA Enzymes, Short Interfering RNA, and the Emerging Wave of Small-Molecule Nucleic Acid-Based Gene-Silencing Strategies.. *Am. J. Pathol.* 171, pp. 1079-1088.
- Bill, B. R. y otros, 2009. A Primer for Morpholino Use in Zebrafish. *Zebrafish*, Volumen 6(1), pp. 69-77.
- Brouns, S. J. J., 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes.. *Science.* 321, pp. 960-964.
- Brower, V. y otros, 1998. All clear for HIV-targeting ribozyme in phase II.. *Nat. Biotechnol.* 16, p. 123.
- Buret, A., Gall, D. G. & Olson, M. E., 1991. Growth activities of enzymes in the small intestine, and ultraestructure of microvili-lous border in gerbils infected with *Giardia duodenalis*.. *Parasitol. Res.* 77, pp. 109-114.
- Cabrera-Licona, A. y otros, 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*, Volumen 179, pp. 49-64.

- Cabrera-Licona, A., Tesis 2010. *Estudio del papel de la proteína de superficie VSP9B10A de Giardia duodenalis en la adhesión a células epiteliales.*, Ciudad de México: Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Castillo-Romero, A., Davids, B. J., Lauwaet, T. & Gillin, F. D., 2012. Importance of enolase in Giardia lamblia differentiation.. *Mol. Biochem. Parasitol.* 184, pp. 122-125.
- Chávez, B., González-Mariscal, L., Cedillo-Rivera, R. & Martínez-Palomo, A., 1995. Giardia lamblia: in vitro cytopathic effect of human isolates.. *Exp. Parasitol.* 80, pp. 133-138.
- Chavez-Munguia, B. y otros, 2011. Naegleria fowleri: Enolase is Expressed During Cyst Differentiation.. *J. Eukaryot. Microbiol.* 58, pp. 463-469.
- Chin, A. C. y o., 2002. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by Giardia lamblia disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner.. *Infect. Immun.* 70, pp. 3673-3680.
- Cotton, J. A., Beatty, J. K. & Buret, A. G., 2011. Host parasite interactions and pathophysiology in Giardia infections.. *Int J. Parasitol.* 41, pp. 925-933.
- Cotton, J. A. y otros, 2014. Giardia duodenalis Cathepsin B Proteases Degrade Intestinal Epithelial Interleukin-8 and Attenuate Interleukin-8-Induced Neutrophil Chemotaxis.. *Infect. Immun.* 82, pp. 2772-2787.
- Deltcheva, E., 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III.. *Nature.* 471, pp. 602-607.
- Deveau, H., 2008. Phage response to CRISPR-encoded resistance in Streptococcus thermophilus.. *J. Bacteriol.* 190, pp. 1390-1400.
- Díaz-Ramos, A., Roig-Borrellas, A., García-Melero & López-Aleman, R., 2012. α -Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations.. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2012, p. ID 156795.
- Duringan, M. y otros, 2014. Genetic Diversity of Giardia duodenalis: Multilocus Genotyping Reveals Zoonotic Potential between Clinical and Environmental Sources in a Metropolitan Region of Brazil. *PloS One*, pp. 1-27.
- Dwivedi, K. K., Prasad, G. & Saini, S., 2007. Enteric opportunistic parasites among HIV infected individuals: associated risk factors and immune status.. *Jpn J Infect Dis*, pp. 76-81.
- Ebert, E. C., 1999. Giardia induces proliferation and interferon γ production by intestinal lymphocytes.. *Gut*, pp. 342-346.
- Eckmann, L., 2000. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen Giardia lamblia.. *J. Immunol.*, pp. 1478-1487.

- Eckmann, L., 2003. Mucosal defences against Giardia.. *Parasite Immunol.*, pp. 259-270.
- Eisen, J. S. & Smith, J. C., 2008. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense.. *Development*, Volumen 135(10), pp. 1735-1743.
- Embley, T. M. & Hirt, R. P., 1998. Early branching eukaryotes?. *Curr Opin Genet Dev*, pp. 624-629.
- Espelage, W., An der Heiden, M., Stark, K. & Alpers, K., 2010. Prevalence and clinical correlations of genetic subtypes of Giardia lamblia in an urban setting.. *BMC Public Health (In press)*.
- Farthing, M. J., 1997. The molecular pathogenesis of giardiasis.. *J. Pediatr. Gastroentero. Nutr.* 24, pp. 79-88.
- Faso, C., Konrad, C., Schraner, E. M. & Hehl, A. B., 2012. Export of cyst wall material and Golgi organelle neogenesis in Giardia lamblia depend on endoplasmic reticulum exit sites.. *Cell Microbiol.*, Issue 10.1111.
- Faubert, G., 2000. Immune response to Giardia duodenalis.. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, pp. 35-54.
- Faustini, A., Marinacci, C. & Fabrizi, E., 2001. The impact of the Catholic Jubilee in 2000 on infectious diseases. A case-control study of giardiasis, Rome, Italy.. *Epidemiol Infect*, pp. 649-658.
- Feng, Y. & Xiao, L., 2011. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of Giardia Species and Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, pp. 110-140.
- Fire, A., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans.. *Nature.* 391, p. 806.
- Fisher, B. S., Estraña, C. E. & Cole, J. A., 2013. Modeling Long-Term Host Cell-Giardia lamblia Interactions in an In Vitro Co-Culture System.. *PLoS ONE* 8(12).
- Galli, S. J., 2005. Mast cells in the development of adaptative immune responses.. *Nat. Immunol.*, pp. 135-142.
- Gardner, T. B. & Hill, D. R., 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin Microbiol Rev*, pp. 114-128.
- Gómez-Mondragón, M., Tesis 2011. *Análisis de la interacción de la Catepsina B-Like de Giardia duodenalis con proteínas de adhesión de células epiteliales.*, Ciudad de México: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco.
- Hashimoto, T. y otros, 1994. Protein Phylogeny Gives a Robust Estimation for Early Divergences of Eukaryotes: Phylogenetic Place of a Mitochondria-lacking Protozoan, Giardia lamblia. *Molecular Biology and Evolution*, pp. 65-71.

- Held, D. M. y otros, 2006. HIV-1 inactivation by nucleic acid aptamers.. *Front. Biosci.* 11, pp. 89-112.
- Hernández, H. M., Marcet, R. & Sarracent, J., 2014. Biological roles of cysteine proteinases in the pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasite*, Volumen 21, pp. 54-64.
- Hernández-Sánchez, J., Fonseca, R., Salinas, M. & Ortega-Pierres, G., 2008. *Giardia duodenalis*: adhesion-deficient clones have reduced ability to establish infection in Mongolian gerbils.. *Experimental parasitology* 119, pp. 364-372.
- Homan, W. L. & Mank, T. G., 2001. Human giardiasis: genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea.. *Int. J. Parasitol.* 32, pp. 822-826.
- Hoque, M. E. y otros, 2001. Nappy handling and risk of giardiasis. *Lancet*, pp. 1017-1018.
- Iida, H. & Yahara, I., 1985. Yeast heat-shock protein of Mr 48,000 is an isoprotein of enolase.. *Nature* 315, pp. 688-690.
- Jimenez, J. A., Uwiera, T. C., Inglis, G. D. & Uwiera, R. R. E., 2015. Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals.. *Gut Pathog.* 7, p. 29.
- Jinek, M., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.. *Science.* 337, pp. 816-821.
- Jinek, M. y otros, 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.. *Science.* 337, pp. 816-821.
- Jung, H. C., 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion.. *J. Clin. Invest.*, pp. 55-65.
- Katellaris, P. H., Naeem, A. & Farthing, M. J. G., 1995. *Attachment of Giardia lamblia trophozoites to a cultured human intestinal cell line.*, 512-518: *Gut* 37.
- Krtková, J. & Paredez, A. R., 2017. Use of Translation Blocking Morpholinos for Gene Knockdown in *Giardia lamblia*.. *Methods Mol Biol*, Volumen 1565, pp. 123-140.
- Lander, N., Li, Z.-H., Niyogi, S. & Docampo, R., 2015. CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar Attachment.. *mBio.* 6, p. 4.
- Laredo Cisneros, M. S., Tesis 2010. *Identificación y análisis funcional de una proteína de superficie de Giardia duodenalis*, Ciudad de México: Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Larson, M. H. y otros, 2013. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat. Protoc.* 8, pp. 2180-2196.
- Lee, I. K. y otros, 2003. Advantages of the circular dumbbell decoy in gene therapy and studies of gene regulation.. *Curr. Drug Targets.* 4, pp. 619-623.

- Lomas-Neirea, J., Chung, C.-S. & Ayala, A., 2008. RNA Interference as A Potential Therapeutic Treatment for Inflammation Associated Lung Injury. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 1, pp. 154-160.
- Luján, H. D. & Svärd, S., 2011. *Giardia A Model Organism*. Viena: SpringerWienNewYork.
- Maaser, C. & Kagnoff, M. F., 2002. Role of the intestinal epithelium in orchestrating innate and adaptative mucosal immunity.. *Z. Gastroenterol.* 40, pp. 525-529.
- 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, pp. 501-509.
- Marcial-Quino, J., 2013. *Gene silencing in Giardia lamblia through RNA interference, a strategy for the design of specific drug.*, Cancún, México: XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Marcial-Quino, J. y otros, 2017. RNAi-Mediated Specific Gene Silencing as a Tool for the Discovery of New Drug Targets in *Giardia lamblia*; Evaluation Using the NADH Oxidase Gene. *Genes (Basel)*, Volumen 8(11), p. 303.
- Mbae, C. y otros, 2016. Molecular Characterization of *Giardia duodenalis* in Children in Kenya. *BMC Infectious Diseases*, p. 135.
- McCabe, R. E. y otros, 1991. In Vitro Model of Attachment of *Giardia intestinalis* Trophozoites to IEC-6 Cells, an Intestinal Cell Line.. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, pp. 29-35.
- Mendez, T. L. y otros, 2013. Glucosylceramide Transferase Activity Is Critical for Encystation and Viable Cyst Production by an Intestinal Protozoan, *Giardia lamblia*.. *J Biol Chem*, Volumen 288(23), pp. 16747-16760.
- Meza-Segura, M. A., Tesis 2013. *Estudio del efecto in vivo de trofozoítos de Giardia duodenalis que expresan la catepsina tipo B empleado como modelo experimental gerbils (Meriones unguiculatus).*, Ciudad de México: Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Militello, K. T., Refour, P., Comeaux, C. A. & Duraisingh, M. T., 2008. Antisense RNA and RNAi in protozoan parasites: working hard or hardly working?. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 320, pp. 117-126.
- Morishita, R. y otros, 1995. A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation in vivo.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, pp. 5855-5859.
- Morrison, H. G. y otros, 2007. Genomic Minimalism in the Early Diverging Intestinal Parasite *Giardia lamblia*. *Science*, pp. 1921-1926.

- Nash, T. E., 2002. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*.. *Mol. Microbiol.* 45, pp. 585-590.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K. & Ullu, E., 1998. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, pp. 14687-14692.
- Nguyen, S. y otros, 2015. Deoxyhypusine Modification of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A) Is Essential for *Trypanosoma brucei* Growth and for Expression of Polyprolyl-containing Proteins.. *J. Biol. Chem.* 290, pp. 19987-199998.
- Oberhuber, G., 1997. Giardiasis: a histologic analysis of 567 cases.. *Scand. J. Gastroenterol.* 32, pp. 48-51.
- Ocádiz-Ruiz, R. y otros, 2016. The knockdown of each component of the cysteine proteinase-adhesin complex of *Entamoeba histolytica* (EhCPADH) affects the expression of the other complex element as well as the in vitro and in vivo virulence.. *Parasitology.* 143, pp. 50-59.
- Pasupuleti, V. y otros, 2014. Efficacy of 5-Nitroimidazoles for the Treatment of Giardiasis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *PLoS Negl Trop Dis*, pp. 1-11.
- Piña-Vázquez, C. y otros, 2012. Host-Parasite Interaction: Parasite-Derived and -Induced Proteases That Degrade Human Extracellular Matrix. *Journal of Parasitology Research*, Volumen 2012, p. 24.
- Prucca, C. G. y otros, 2008. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference.. *Nature.* 11, pp. 750-754.
- Qi, L. S. y otros, 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*, pp. 1173-1183.
- Rayburn, E. R. & Zhang, R., 2008. Antisense, RNAi, and Gene Silencing Strategies for Therapy: Mission Possible or Impossible?. *Drug Discov. Today.* 13, pp. 513-521.
- Ringqvist, E. y otros, 2008. Molecular & Biochemical Parasitology Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells.. *Mol Biochem Parasitol.* 159(2), pp. 85-91.
- Rivero, M. R., Kulakova, L. & Touz, M. C., 2010. Long Double-stranded RNA Procedures Specific Gene Downregulation in *Giardia lamblia*.. *J. Parasitol.* 96, pp. 815-819.
- Rivero, M. R., Kulakova, L. & Touz, M. C., 2010. Long double-stranded RNA produces specific gene downregulation in *Giardia lamblia*. *Journal of Parasitology*, 96(4), pp. 815-819.
- Rockwell, P. y otros, 1997. Cell-surface perturbations of the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor receptors by phosphorothioate oligodeoxynucleotides.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, pp. 6523-6528.

- Rodríguez-Fuentes, G. B. y otros, 2006. Giardia duodenalis: analyses of secreted proteases upon trophozoite-epithelial cell interaction in vitro.. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101.
- Roskens, H. & Erlandsen, S. L., 2002. Inhibition in vitro attachment of Giardia trophozoites by mucin.. *J. Parasitol.* 88, pp. 869-873.
- Roxström-Lindquist, K. y otros, 2006. Giardia immunity - an update. *Trends in Parasitology*, pp. 26-31.
- Sałaga, M., Sobczak, M. & Fichna, J., 2013. Inhibition of proteases as a novel therapeutic strategy in the treatment of metabolic, inflammatory and functional diseases of the gastrointestinal tract. *Drugs Discovery Today*, Volumen 18, pp. 708-715.
- Santoro, S. W. & Joyce, G. F., 1998. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochemistry* 37, pp. 13330-13342.
- Sapranauskas, R., 2011. Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli.. *Nucleic Acids Res.* 39, pp. 9275-9282.
- Sarti, P., 2004. Trichomonas vaginalis degrades nitric oxide and expresses a flavorubredoxin-like protein: a new pathogenic mechanism?. *Cell. Mol. Life Sci.*, pp. 618-623.
- Sateriale, A., Miller, P. & Huston, C. D., 2016. Knockdown of Five Genes Encoding Uncharacterized Proteins Inhibits Entamoeba histolytica Phagocytosis of Dead Host Cells.. *Infect. Immun.* 84, pp. 1045-1053.
- Savioli, L., Smith, H. & Thompson, A., 2006. Giardia and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in Parasitology*, pp. 203-208.
- Schubert, S. & Kurreck, J., 2004. Ribozyme- and deoxyribozyme- strategies for medical applications.. *Curr. Drug Targets* 5, pp. 667-681.
- Schwentke, A. y otros, 2012. In vitro and in vivo silencing of plasmodial dhs and elf-5a genes in a putative, non-canonical RNAi-related pathway.. *BMC Microbiol.* 12, p. 107.
- Scott, K. G., 2002. Intestinal infection with Giardia spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion.. *Gastroenterology*, pp. 1179-1190.
- Scott, K. G., 2004. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis.. *Infect. Immun.*, pp. 3536-3542.
- Segal, D. J. & Barbas, C. F., 2001. Custom DNA-binding proteins come of age: polydactyl zinc-finger proteins.. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, pp. 632-637.
- Segovia-Gamboa, N. C. y otros, 2010. Entamoeba invadens, encystation process and enolase.. *Exp. Parasitol.* 125, pp. 63-69.

- Shibayama, M. y otros, 2013. Disruption of MDCK cell tight junctions by the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Microbiology*, Volumen 159, pp. 392-401.
- Singer, S. M. & Nash, T. E., 2000. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice.. *Infect. Immun.*, pp. 170-175.
- Solis, C. F. & Guillen, N., 2008. Silencing genes by RNA interference in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*.. *Methods in Molecular Biology*. 442, pp. 113-128.
- Subramanian, A. & Miller, D., 2000. Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene.. *J. Biol. Chem.* 275, pp. 5958-5965.
- Suguri, S. y otros, 2001. Archaeobacterial relationships of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene reveal mosaicism of *Giardia intestinalis* core metabolism. *J Eukaryot Microbiol*, pp. 493-497.
- Sun, C. H. & Tai, J. H., 2000. Development of a tetracycline controlled gene expression system in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*.. *Mol Biochem Parasitol*, Volumen 105(1), pp. 51-60.
- Sun, X. E. y otros, 2010. Prodrug activation by *Cryptosporidium* thymidine kinase.. *J. Biol. Chem.* 285, pp. 15916-15922.
- Svärd, S. G., Hagblom, P. & Palm, J. D., 2002. *Giardia lamblia* - a model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS Microbiology Letters*, pp. 3-7.
- Swabby, K. D., Hibler, C. P. & Wegrzyn, J. G., 1988. Infection of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) with *Giardia* from human and animal sources.. *In Advances in Giardia Research*, University of Calgary Press, pp. 75-77.
- Teoh, D. A. y o., 2000. *Giardia lamblia* rearranges F-actin and α -actin in human colonic and duodenal monolayers and reduces transepithelial electrical resistance.. *J. Parasitol.* 86, pp. 800-806.
- Touz, M. C., Kulakova, L. & Nash, T. E., 2004. Adaptor protein complex 1 mediates transport of lysosomal proteins from a Golgi-like organelle to peripheral vacuoles in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol. Biol.*, Volumen 15, pp. 3053-3060.
- Ulrich, H., 2006. RNA aptamers: from basic science towards therapy.. *Handb. Exp. Pharmacol.* 173, pp. 305-326.
- Usman, N. & Blatt, L. M., 2000. Nuclease-resistant synthetic ribozymes: developing a new class of therapeutics.. *J. Clin. Invest.* 106, pp. 1197-1202.
- Visvesvara, G. S., Dickerson, J. W. & Healy, G. R., 1988. Variable infectivity of human-derived *Giardia lamblia* cysts for Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*).. *J. Clin. Micro.* 26, pp. 837-841.

Wampfler, P. B., Faso, C. & Hehl, A. B., 2014. The Cre/loxP system in *Giardia lamblia*: genetic manipulations in a binucleate tetraploid protozoan. *International Journal for Parasitology*, Volumen 44, pp. 497-506.

Wilson, C. S. y otros, 2015. Knockdown of Inner Arm Protein IC138 in *Trypanosoma brucei* Causes Defective Motility and Flagellar Detachment.. *PLoS ONE* 10, p. 11.

World Health Organization, 2016. *Giardiasis, Disease Information*, s.l.: s.n.

Zak, O. & Sande, M. A., 1999. *Handbook of Animal Models of Infection*. Salt Lake City, EUA: Academic Press.

Zhou, P., 2003. Role of interleukin-6 in the control of acute and chronic *Giardia lamblia* infections in mice.. *Infect. Immun.*, pp. 1566-1568.