

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Zacatenco

Departamento de Biología Celular

Caracterización de la proteína CLP259 y su interacción con el citoesqueleto de actina de *Giardia intestinalis* (syn. *duodenalis, lamblia*).

Tesis que presenta:

Lic. en Biología Dachelys de la Caridad Benítez Landa

Para Obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

En la Especialidad de

Biología Celular

Director Tesis: Dr.C. José Manuel Hernández Hernández

Zacatenco, Ciudad de México

MAYO, 2021

A mi familia, mis amigos y en especial a mi madre.

Agradecimientos

A los profesores del departamento de Biología Celular del CINVESTAV, por ser siempre tan dedicados y excelentes pedagogos, científicos y personas, brindándonos a cada estudiante las herramientas necesarias para el desarrollo de la ciencia.

Especiales agradecimientos a las personas que día y noche vivieron conmigo la experiencia del desarrollo de este trabajo. Agradecer a todos los que en mi familia se preocupaban por el transcurso de mi trabajo. A mi hermano y mi madre, que desde la cercanía o la distancia física siempre han sido mi más grande apoyo. A mi esposo por siempre estar a mi lado y darme fuerzas cuando creía que ya no tenía. A mi padre, que estoy segura que donde esté, se encuentra sonriendo, orgulloso de mi. A mis queridas amigas-hermanas Aneley y Sisi, amigas en serio, colaboradoras incansables y mis grandes apoyos; chicas: Gracias por resistirme tanto.

Especial agradecimiento a mi tutor José Manuel Hernández Hernández por su constancia, apoyo y paciencia durante todo el desarrollo de este trabajo. A mis asesores Gloria de la Luz León Ávila y Juan Pedro Luna Arias por estar siempre disponibles y ayudarme en cada momento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT) por el apoyo económico tan necesario para poder desarrollar esta investigación a tiempo completo, bajo el registro A19440. Y a todos los que indirectamente están detrás de este resultado: Muchas Gracias.

<u>Abreviaturas</u>

<u>A</u>

ABPs: Proteínas de unión a actina, del inglés *Actin binding proteins* ACT: Actina ADI: Arginina desiminasa ANX21: Anexina 21 AP-1: Factor de transcripción ARID1: Proteína participante en el remodelamiento de la cromatina ARP2/3: Proteína relacionada a actina, del inglés *Actin related protein* ATP: Trifosfato de adenosina ATPasa: Enzima que cataliza la hidrólisis de ATP

<u>B</u>

Bax: Proteína proapoptótica, del inglés *Bcl-2-associated X protein*Bcl-2: Proteína antiapoptótica, del inglés *B-cell lymphoma 2 bg*: gen de la β-giardina
BBSoma: Complejo transportador flagelar

<u>C</u>

CCL: Quimiocina Ligando de la familia de quimiocinas CC CDC: Centro para el Control de Enfermedades (Estados Unidos de América) CEIs: Células Epiteliales Intestinales CLCF: Factor de Citocina similar a Cardiotrofina CLH: Cadena pesada de Clatrina CLP259: Proteína puente 259 COP I: Complejo protéico I de recubrimiento de vesículas COP II: Complejo protéico II de recubrimiento de vesículas CWP 1, 2 y 3: Proteína 1, 2 y 3 de la pared del quiste CX3CL1: Quimiocina Ligando 1 de la familia de quimiocinas CX₃C CXCL: Quimiocina Ligando de la familia de quimiocinas CXC

<u>D</u>

DAPs: Proteínas Asociadas al Disco Ventral de *Giardia,* del inglés *Disc asociated proteins* DIC: Microsopía de Interferencia Diferencial

DNA: Ácido Desoxirribonucleico, del inglés **D**eoxyribonucleis acid

<u>E</u>

E1: anexina

E2F1: Factor de transcripción

EB1: Proteína modificadora de la dinámica microtubular

ECV: Vesícula de carbohidratos de enquistamiento

ECDC: Centro Europeo para el Control de Enfermedades

EE.UU: Estados Unidos de América

EGF: Factor de crecimiento Epidermal

EGFCP1: Proteína quística 1 similar al factor de crecimiento epidermal

ELISA: Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas del inglés *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ERES: Sitio de salida del Retículo Endoplasmático

ERK1: Proteína de fosforilación de la vía MAP/quinasa del inglés *Extracellular signalregulated kinases*

ESPs: Proteínas de excreción-secreción, del inglés *Excretion-secretion proteins*

ESVs: Vesículas de enquistamiento

<u>F</u>

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos (Estados Unidos de América)

FIH-β: Factor inhibidor del factor inducible de hipoxia

FISH: Hibridación in situ fluorescente

<u>G</u>

gdh: Gen de glutamato deshidrogenasa GLP1/2: Proteína 1/2 de *Giardia lamblia*

gMAPs: Proteínas asociadas a microtúbulos de Giadia

<u>H</u>

HBD-2: β-defensina humana 2 (péptido antimicrobiano) HCNCp: Proteínas quísticas invariables con alto contenido de cisteína h: Horas

Ī

IFN: Interferón IFT: Transporte Intraflagelar IgA: Inmunoglobulina A IgG: Inmunoglobulina G IL: Interleucina IMS: Separación Inmunomagnética ITS1-2: Regiones de transcripción interna 1 y 2

M

MAPK: Quinasa activada por mitógeno, del inglés *Mitogen-Activated protein kinase* MAPs: Proteínas asociadas a microtúbulo, del inglés *Microtubule asociated proteins* MBF1: Factor 1 de unión multiprotéica (factor de transcripción) mg: Miligramos min: Minutos MTs: Microtúbulos MUC2: Mucina 2 Myb2: Factor de transcripción

<u>N</u>

NacGAL: N-acetil Galactosamina NaCl: Cloruro de Sodio NADH: Dinucleótido de Nicotinamida NaNO₃: Nitrato de Sodio NFκB: Complejo protéico de control de la transcripción, del inglés *Nuclear factor kappalight-chain-enhancer of activated B cells* NK: Asesino natural o *Natural killer* NMT: N-Miristoil Transferasa NO: Óxido Nítrico

<u>P</u>

PAD: Peptidil Arginina Deiminasa
PAX1: Factor de transcripción del inglés *Paired Box 1*PAX2: Factor de transcripción del inglés *Paired Box 2*PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa del inglés *Polimerase chain reaction*RFLP: Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción, del inglés *Restriction fragment length polymorphism*PFOR: piruvato:ferredoxina oxidorreductasa
PI3K: Fosfatidilinositol- 3-kinasa
PNM: Membranas perinucleares del retículo endoplasmático

<u>R</u>

RNA: Ácido ribonucleico del inglés *Ribonucleic acid*RNAi: Ácido ribonucleico interferente
RNAm: Ácido ribonucleico mensajero
RNAs: Ácido ribonucleico pequeño
ROD: Dominio de la proteína β-giardina
ROS: Especies reactivas de oxígeno

<u>S</u>

SAF: Formalina ácido acético-acetato de sodio

SALP-1: Proteína perteneciante a la familia de giardinas

SGLT-1: Transportador de glucosa

SMC: Mantenimiento estructural de cromosomas, del inglés Structural manteinance of chromosomes

Ţ

TFF3: Factor 3 Tefoilo (Péptido Antimicrobiano)
TGF-β: Factor de crecimiento transformante-β
Th: Célula T colaboradora o *helper*TNFα: Factor α de necrosis tumoral del inglés *Tumor necrosis factor α*TOP3β: Topoisomerasa tipo I *tpi:* Gen de la triosa fosfato isomerasa
TrxR: Tiorredoxin oxidoreductase

<u>V</u>

VSP: Proteína de superficie variante-específica del inglés *Variant specific protein* WRKY: Factor de transcripción que presenta un dominio WRKY

<u>Y</u>

YiP: Proteína transportadora de levaduras

<u>Z</u>

ZnSO4: Sulfato de Zinc

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Descubrimiento	4
1.2 Taxonomía	5
1.3 Especies, ensamblajes y subensamblajes	5
1.3.1 Ensamblajes genotípicos de <i>G. intestinalis</i> (syn. duodenalis, lamblia)	9
1.4 Epidemiología	10
1.5 Manifestaciones clínicas	12
1.5.1 Anclaje a los enterocitos del hospedero	12
1.5.2 Afectaciones intestinales al hospedero	15
1.5.3 Inmunidad del hospedero en la infección por Giardia spp	18
1.5.3.1 Proteínas de superficie variante-específicas	21
1.6 Diagnóstico	22
1.7 Tratamiento	25
1.7.1 Resistencia y tratamientos alternativos	29
1.8 Morfología de <i>G. intestinalis</i>	35
1.8.1 Quiste	35
1.8.2 Enquistamiento	37
1.8.2.1. ESVs	42
1.8.3 Desenquistamiento	44
1.8.4 Trofozoítos	45
1.8.4.1 Citoesqueleto	46
1.8.4.1.2 Cuerpo medio	57
1.8.4.1.3 Funis	58
1.8.4.1.4 Disco ventral	59
2. ANTECEDENTES	64
3. OBJETIVOS	66
3.1 Objetivo General	66
3.2 Objetivos Específicos	66
4 MATERIAL Y MÉTODOS	67
4.1 Caracterización de CLP259	67
4.2 Proteínas de G. intestinalis con motivos de anquirina y homología a proteínas SMCs	67
4.3 Alineamiento de secuencias de los motivos de anquirina.	68
4.4 Análisis de interacciones.	68

CONTENIDO

5	RESULTADOS	. 69
	5.1 Caracterización de CLP259	. 69
	5.2 Proteínas de G. intestinalis con motivos de anquirina y homología a proteínas SMCs	72
	5.3 Alineamiento de motivos de anquirina.	77
	5.4 Análisis de redes de interacción.	78
6	DISCUSIÓN	80
7	CONCLUSIONES	. 91
8	PERSPECTIVAS	92
9	BIBLIOGRAFÍA	93

RESUMEN

Giardia intestinalis es un protozoario parásito del humano causante de la giardiasis. La transmisión de este parásito ocurre mediante la ingestión de quistes, en agua o alimentos contaminados, mientras que la infección del epitelio intestinal se lleva a cabo por la forma vegetativa, el trofozoíto. El parásito causa daños graves a nivel de duodeno e induce una modulación de la respuesta inmune del hospedero, dando lugar a un cuadro clínico caracterizado por: diarrea recurrente con o sin vómito. El citoesqueleto en este microorganismo es determinante para llevar a cabo el ciclo de vida, el cual está conformado por microtúbulos, microfilamentos y no tiene filamentos intermedios, ni proteínas relacionadas. Varias proteínas canónicas de eucariontes están ausentes en este parásito, entre ellas las de unión al citoesqueleto; sin embargo, las funciones asociadas sí están presentes en este organismo. Recientemente se descubrió una proteína capaz de unirse tanto a los filamentos del citoesqueleto de microtúbulos como a los microfilamentos, denominada CLP259. Aunque se observó una interacción fuerte con actina, esta unión aún no está caracterizada. Del mismo modo no se han descrito completamente los posibles dominios dentro de la secuencia de CLP259 ni proteínas similares dentro del proteoma de G. intestinalis. El objetivo de nuestro trabajo fue determinar, desde el punto de vista bioinformático, las características estructurales de CLP259 y de su interacción con actina, así como poder detectar proteínas similares a CLP259 aún no reportadas en la literatura. En este estudio obtuvimos que CLP259 presenta tres repetidos de anquirina en la región N-terminal, tiene una región homóloga a proteínas de mantenimiento estructural del cromosoma (SMC) y en su secuencia se encuentran varias regiones coiled-coil y regiones de desorden. Además, las modificaciones postraduccionales que puede sufrir son: glicilaciones, forsforilaciones y miristoilaciones. Por otra parte, encontramos y caracterizamos proteínas de G. intestinalis que también presentan repetidos de anquirina y homología a SMCs, las cuales no se habían descrito hasta el momento en este parásito. Finalmente se determinó que la interacción entre actina y CLP259 puede ser mediada por otras proteínas. Concluimos que dentro del proteoma de G. intestinalis existen varias proteínas con repetidos de anquirina y posiblemente pertenecientes a la familia de proteínas SMCs, entre ellas

CLP259, las cuales pudieran tener funciones similares en este parásito; por otra parte, la interacción actina-CLP259 pudiera ser una interacción indirecta.

Palabras Clave: *Giardia intestinalis*, proteínas SMC, repetidos de anquirina, actina, CLP259, bioinformática.

ABSTRACT

G. intestinalis is a parasitic protozoan that affects humans, causing the disease known as giardiasis. The transmission of this parasite occurs through the ingestion of cysts, either by contaminated water or by food, while the infection of the intestinal epithelium is carried out by trophozoites, the vegetative form. The parasite causes serious damage to the duodenum and induces a modulation of the host's immune response, giving rise to a clinical picture characterized by the presence of recurrent diarrhea and / or vomiting. The cytoskeleton in this microorganism is decisive to carry out the life cycle; the cytoskeleton is made up of microtubules and microfilaments, but it has no intermediate filaments or related proteins. Several canonical proteins present in eukaryotes are absent in this parasite, among them those that bind to the cytoskeleton. However, the cytoskeleton associated functions are present in this organism. Recently, a protein capable of binding both the microtubule and actin cytoskeleton was discovered, called CLP259, although a strong interaction with the actin cytoskeleton was observed, this binding is not characterized. Likewise, the possible domains within the CLP259 sequence and similar proteins within the G. intestinalis proteome are not fully described. The objective of our work was to determine, trough bioinformatics, the structural characteristics of CLP259 and the characteristics of its interaction with actin, as well as to search for proteins like CLP259 not yet reported in the literature. In this study, we found that CLP259 has three ankyrin repeats in the N-terminal region, presents a region homologous to chromosome structural maintenance proteins (SMC), and in addition, it contains several coiled-coil regions and as well as disorder regions along its sequence. Moreover, we detected glycilations, forsphorylations and myristoylations. On the other hand, we found and characterized G. intestinalis other proteins also presenting ankyrin repeats and homology to SMCs, which in this parasite, had not been described so far. Finally, considering our analysis, it is possible that other proteins could mediate the interaction between actin and CLP259. As a conclusion, we can say that within the G. intestinalis proteome there are several proteins with ankyrin repeats and possibly belong to the SMCs family, among them CLP259, which could have similar functions in this parasite; on the other hand, the actin-CLP259 interaction could be an indirect interaction.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descubrimiento

La primera descripción de un integrante del género Giardia ocurrió en el año 1682, por Antony Van Leeuwenhoek, al examinar bajo el microscopio muestras de una evacuaciones diarréica. Leeuwenhoek notificó a la Royal Society su observación y en su carta describía microorganismos como "Animáculos móviles", con cuerpos más largos que anchos, aplanados y con varios pies (flagelos). Este es el primer registro de un protozoo parasítico y Leeuwenhoek, fue el primero en reportar un protozoo en humanos (Dobell, 1920). Después, en 1859 ocurre una segunda descripción de Giardia, por Vilém Lambl, médico sueco quién describió un flagelado intestinal en muestras de heces humanas. Lo catalogó en el género Cercomonas y lo denominó Cercomonas intestinalis (Adam, 2001; Thompson et al., 2011). En los años posteriores, los reportes de estos microorganismos intestinales continuaron; no sólo se detectaron en humanos, sino también en otros vertebrados. Davaine en 1875 describió en el conejo una forma de Giardia que llamó Hexamita duodenalis (Thompson et al., 2011). En 1879, Grassi observó un microorganismo intestinal en roedores, el cual denominó Dimorphus muris (Adam, 2001). Kunstler, en 1882 y 1883, describió un flagelado en el intestino de renacuajos de anfibios anuros que llamó Giardia y a partir de este reporte se estableció el nombre genérico para este tipo de microorganismos (Thompson et al., 2011). No obstante, en 1888, Blanchard sugirió que el nombre genérico debería ser Lamblia, en conmemoración al médico checo Vilém Dušan Lambl, quién hizo la primera descripción precisa del parásito (Adam, 2001). La denominación de género Lamblia permaneció hasta el año 1914, cuando Alexeieff planteó establecer Lamblia y Giardia como sinónimos. Así quedó establecido "Giardia" como designación de género para este parásito flagelado (Plutzer et al., 2010). Desde entonces, se han descrito varias especies de Giardia tanto en humanos como en otras especies de vertebrados.

1.2 Taxonomía

Giardia spp pertenece al Reino Protista, Subreino Excavata, Filo Metamonada, Subfilo Trichozoa, Superclase Eopharyngia, clase Trepomonadea, subclase Diplozoa, orden Diplomonadida y la familia Hexamitidae (Plutzer *et al.*, 2010; Thompson *et al.*, 2011) Los miembros de esta familia son protozoos flagelados con cuatro pares de flagelos, diplozoicos, que poseen dos núcleos diploides similares, transcripcionalmente activos. *Giardia* no tiene aparato de Golgi, peroxisomas ni mitocondrias, pero si tienen mitosomas, organelos considerados remanentes de mitocondrias que conservan los *clusters* Fe-S. La característica distintiva de *Giardia spp* usada para diferenciarla de otros miembros de la misma familia, es el disco ventral adhesivo y el cuerpo medio (Adam, 2001; Thompson *et al.*, 2011,)

1.3 Especies, ensamblajes y subensamblajes

El número de especies dentro del género *Giardia* fue un aspecto controversial durante muchos años; mientras que algunos investigadores sugerían nombres de especies basados en el huésped de origen, otros se centraban en la morfología del parásito (Adam, 2001). En el año 1952, Filice publicó una descripción morfológica detallada de *Giardia* y planteó que la denominación de especies basado en el hospedero era poco valiosa desde el punto de vista taxonómico, estableciendo que los caracteres morfológicos eran de mayor confiabilidad a la hora de diferenciar especies (Plutzer *et al.*, 2010), por lo que propuso dividir las especies descritas en el género en tres grupos morfológicamente diferentes, considerando la forma del cuerpo medio y el tamaño del trofozoíto. Así, propuso el uso de los nombres de las especies *G. duodenalis, G. muris y G. agilis* (Plutzer *et al.*, 2010).

El primer grupo de organismos, *G. duodenalis*, comprendía especies con trofozoítos en forma piriforme con un cuerpo medio distintivo en forma de "garra" (Fig. 1), que infectan a una variedad de mamíferos, incluidos los humanos.



Figura 1. Dibujo de la morfología del trofozoíto y el quiste de *G. duodenalis, G. muris y G. agilis.* Tomado de Thompson, 2004.

Posteriormente, al menos 20 especies identificadas en mamíferos y algunas en aves se ubicaron en el grupo *G. duodenalis* (Thompson *et al.*, 2004). Los miembros del segundo grupo *G. muris*, principalmente infectan a los roedores, se caracterizaron por tener cuerpos medios redondeados y la forma del trofozoíto es más redonda, (Thompson *et al.*, 2004) (Fig. 1); mientras que los miembros del grupo *G. agilis* presentan cuerpo largo y estrecho, los discos adhesivos son relativamente cortos, los cuerpos medios son alargados en forma de garrote, y sólo han sido aislados de anfibios (Fig. 1) (Thompson *et al.*, 2011).

Sin embargo, aunque durante mucho tiempo, dicha agrupación sirvió para mantener ubicada a la mayoría de las especies de *Giardia spp*, posteriormente se descubrieron dos especies que no encajaban estrictamente en alguna de estas agrupaciones: *Giardia psittaci* descrita en periquitos (Erlandsen *et al.*, 1987) y *Giardia ardeae* (Erlandsen *et al.*, 1990). *Giardia psittaci* presenta una morfología similar a *G. duodenalis*, pero carecen por ejemplo, del surco marginal que sí está presente en el grupo *duodenalis*. Por su parte *Giardia ardeae* comparte características morfológicas con *G. duodenalis* y *G. muris* (Erlandsen *et al.*, 1990). Otra especie reportada 1988 por Feely que también infecta a los mamíferos es *G. microti* (Adam, 2001). Esta nueva especie se ha identificado en varios roedores y fue descrita basándose en la morfología del quiste, el cual contiene en su

interior dos trofozoítos diferenciados, con discos ventrales maduros, mientras que el quiste de *G. duodenalis* contiene un solo trofozoíto carente de disco ventral. Actualmente ya no se emplea el agrupamiento propuesto por Filice, sólo quedaron establecidas seis especies y siete agrupamientos genotípicos o ensamblajes (Adam, 2001) (Tabla I).

Un aspecto para destacar es que el nombre de la especie *G. lamblia* fue aceptado ampliamente durante la década de 1970, posteriormente, en la década de 1980, se usó el nombre *G. duodenalis* y en la década de 1990, otro grupo investigadores propuso el nombre *G. intestinalis* (Adam, 2001). Por lo anterior, los nombres *intestinalis* o *lamblia* se utilizan a menudo como sinónimos, particularmente para aislados de origen humano. Esto parece basarse más en motivos de preferencia que en motivos taxonómicos (Thompson *et al.,* 2011).

Tabla I. Especies del género *Giardia* y ensamblajes genotípicos (Plutzer *et al.,* 2010; Thompson *et al.,* 2011; Heyworth, 2016; Zhangxia *et al.,* 2018).

Especie	Hospedero	Características morfológicas	Dimensiones del trofozoíto largo/ancho (µm)
<i>G. duodenalis</i> (= ensamblaje A) (Leeuwenhoek, 1681; Lamb, 1859) (Homan, 1992; Mayrhofer, 1995; Karanis y Ey, 1998)	Animales domésticos y salvajes, cetáceos y humano	Trofozoítos en forma de pera con cuerpo medio en forma de garra.	12-15/6-8
<i>G. agilis</i> (Kunstler, 1882, 1883)	Anfibios	Trofozoítos largos y estrechos con cuerpo medio en forma de maza.	20-30/4-5
<i>G. muris</i> (Grassi, 1879)	Roedores	Trofozoítos redondeados con cuerpo medio redondos.	9-12/5-7
<i>G. ardae</i> (Noller, 1920; Erlandsen <i>et al.</i> , 1990)	Aves	Trofozoítos redondeados, con muesca prominente en disco ventral y flagelo caudal rudimentario. Cuerpo medio redondo, ovalado, en forma de garra.	~10/6.5
<i>G. psittaci</i> (Erlandsen y Bemrick, 1987)	Aves	Trofozoítos en forma de pera, sin bridas ventrolaterales. Cuerpo medio en forma de garra	-14/ 6
<i>G. microti</i> (Feely, 1988)	Roedores	Trofozoítos similares a <i>G. duodenalis</i> . Los quistes maduros contienen trofozoítos completamente diferenciados.	12-15/6-8
<i>G. enterica</i> (= ensamblaje B) (Homan, 1992; Mayrhofer, 1995)	Humanos y otros primates, perros y algunas especies de animales salvajes	Trofozoítos en forma de pera con cuerpo medio en forma de garra.	12-15/6-8
<i>G. canis</i> (= ensamblaje C/D) (Meloni y Thompson, 1987; Monis <i>et al.</i> , 1998)	Perros y otros cánidos, cerdos, cetáceos, canguros	Trofozoítos en forma de pera con cuerpo medio en forma de garra.	12-15/6-8
<i>G. cati</i> (= ensamblaje F) (Monis <i>et al.</i> , 1999)	Gatos, cetáceos y cerdos	Trofozoítos en forma de pera con cuerpo medio en forma de garra.	12-15/6-8
<i>G. bovis</i> (= ensamblaje E) (Monis <i>et al.</i> , 1999)	Ganado y gatos	Trofozoítos en forma de pera con cuerpo medio en forma de garra.	12-15/6-8
<i>G. simondi</i> (= ensamblaje G) (Monis <i>et al.,</i> 1999)	Ratas	Trofozoítos en forma de pera con cuerpo medio en forma de garra.	12-15/6-8
Ensamblaje H (Gaydos <i>et al.</i> , 2008; Lasek-Nesselquist <i>et al.</i> , 2010)	Focas y gaviotas	Trofozoítos en forma de pera con cuerpo medio en forma de garra.	12-15/6-8
<i>G. peramelis</i> (Hillman <i>et al.,</i> 2016)	Quenda (<i>Isoodon obesulus</i>)	Morfología basada en el quiste, el cual es morfológicamente igual al de <i>G. duodenalis</i> y <i>G. muris</i>	12.68/7.88
G. cricetidarum (Zhangxia <i>et al.</i> , 2018)	Hámsteres	Trofozoíto son generalmente más grande y robusto que las otras especies.	12-18/8-12

1.3.1 Ensamblajes genotípicos de G. intestinalis (syn. duodenalis, lamblia)

A medida que fueron avanzando las técnicas moleculares se detectó que muchos individuos morfológicamente idénticos a G. intestinalis y que en sus inicios se consideraron individuos de dicha especie con capacidad de infectar a diferentes hospederos, presentaban numerosas diferencias genotípicas. Las técnicas empleadas para determinar dichas diferencias fueron inicialmente la electroforesis enzimática o cromosómica y posteriormente se introdujo el uso de la PCR, empleando como dianas genes que codifican β -giardina (*bg*), triosa fosfato isomerasa (*tpi*), la subunidad pequeña de DNA ribosómico (ssu-DNAr), las regiones de transcripción interna (ITS1-2), la glutamato deshidrogenasa (gdh), el factor de elongación 1-alfa (ef-1), los genes GLORF-C4 y recientemente, la región espaciadora del RNAr intergenómico (Cacció et al., 2010; Thompson et al., 2011, 2016). El análisis génico de todas estas dianas moleculares ha llevado a identificar ocho genotipos distintos o ensamblajes, identificados con las letras A a la letra H (Tabla I) (Heyworth, 2016; Ortega-Pierres et al., 2018). Al realizarse análisis filogenético de los ocho ensamblajes, se observó que cada ensamblaje es un linaje genéticamente aislado, lo cual eliminó que la heterogeneidad entre las copias de genes o las variaciones intragenotípicas, sea la causa de las diferencias (Ortega-Pierres et al., 2018). Además, el hecho de que hay muy poca frecuencia de recombinación entre los ensamblajes, permitió establecer entonces a cada ensamblaje como especie diferente: G. duodenalis para el ensamblaje A, G. entérica para el ensamblaje B, G. canis para el ensamblaje C y D, el ensamblaje F para G. cati, G. simondi para el ensamblaje G y el ensamblaje E para G. bovis (Monis et al., 2009; Xu et al., 2012) (Tabla I). A través de la identificación de la variación genética intraespecífica también se ha puesto de manifiesto la existencia de subgenotipos, los cuales sólo se han identificado hasta el momento en G. duodenalis, subgenotipos AI, AII y AIII, y G. enterica: subgenotipos BIII y BIV (Monis et al., 2009). A pesar de los amplios esfuerzos, hasta la fecha no se ha identificado una correlación clara para asociar conjuntos específicos con diferencias clínicas, (Ortega-Pierres et al., 2018). Numerosas investigaciones en humanos asocian al ensamblaje B con manifestaciones clínicas evidentes de giardiasis y la presencia del ensamblaje A sin sintomatología (Gelanew et al., 2007; Puebla et al., 2014; Minetti et al., 2015; Faria et al., 2017; Ahmed et al., 2019; Wang et al., 2019), aunque contradictoriamente, estudios como los de Read *et al.*, 2002 y El-Basha *et al.*, 2016, establecen el ensamblaje A como más agresivo que el ensamblaje B (Read *et al.*, 2002; El-Basha *et al.*, 2016). A su vez, también se ha comprobado la prevalencia del ensamblaje B en niños menores a 12 años, y el ensamblaje A en adultos (Minetti *et al.*, 2015; El-Basha et al., 2016; Ahmed *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019), así como la presencia de posibles combinaciones de ambos ensamblajes en un mismo individuo, aunque este fenómeno es de poca incidencia (Singh *et al.*, 2009; Minetti *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2019; Correa *et al.*, 2020).

Aunque algunos ensamblajes de G. lamblia tengan una amplia gama de especificidad de hospedero que incluye a los humanos (ensamblaje A y B), mientras que otros parecen estar más restringidos en su rango de hospedero y pueden no presentar un riesgo de transmisión zoonótica (ensamblaje C-H), se ha reportado en humanos la presencia de aislados de G. duodenalis que tienen marcadores genéticos que no corresponden a los ensamblajes A o B, sino más bien a ensamblajes C (Soliman et al., 2011; Durigan et al., 2014, 2017), E (Foronda et al., 2008) o F (Gelanew et al., 2007), los cuales son considerados ensamblajes específicos de animales y que normalmente no infectan a los humanos (Sprong et al., 2009). También, los subensamblajes muestran determinada especificidad por el hospedero, de modo que el subensamblaje Al, abunda más en animales domésticos y salvajes que en el humano, lo contrario ocurre para el subensamblaje AII, mientras que el AIII, no se ha detectado en humanos hasta el momento, presente de mucho más frecuente en los animales salvajes (Sprong et al., 2009). Para los subensamblajes BIII y BIV, se encontró que han estado presentes en igual proporción en el humano, mientras que BIV es más frecuente en animales que BIII (Sprong et al., 2009). Por lo tanto, los subensamblajes AI, AII, BIII y BIV son potencialmente zoonóticos (Sprong et al., 2009).

1.4 Epidemiología

Giardia es uno de los patógenos más comunes asociados a brotes diarréicos (Huang *et al.,* 2006). La infección comienza con la ingestión del quiste, el cual, puede provenir tanto

de agua no tratada como alimentos contaminados (Prystajecky *et al.*, 2015; Koloren *et al.*, 2016; Abd El-Latif *et al.*, 2020), así como a través de contacto persona-persona por vía fecal-oral, especialmente a través de individuos con poca higiene (Huang *et al.*, 2006). Desde el inicio de siglo hasta el 2016, se han reportado más de 340 brotes de giardiasis solamente atribuidos a la ingesta de agua contaminada (Rosado-García *et al.*, 2017). También los animales son considerados un reservorio de la enfermedad (Hoque *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2008; García-Cervantes *et al.*, 2017; Rogawski *et al.*, 2017; Godínez-Galaz *et al.*, 2019). *G. intestinalis* destaca como una parasitosis preponderante en niños entre 1 y 12 años, los cuales, por sus hábitos de reconocimiento oral de objetos, son más propensos a adquirir el quiste y desarrollar la enfermedad (ECDC, Anual Epidemical Report; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Giardiasis Summary Report, United States).

Según los datos proporcionados por el centro europeo para el control de enfermedades (ECDC) para el año 2017, varios países de ese continente reportaron una disminución de los casos anuales de giardiasis, mientras que otros como Reino Unidos y España mostraban un aumento (ECDC, Anual Epidemical Report, 2017). En el caso del reporte del CDC de Estados Unidos, desde 1994 hasta el año 2018 se observa una disminución en general, con tendencia a la estabilización desde 2012 (Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Giardiasis Summary Report, United States). Aunque según los datos publicados en el sitio web de la Organización Mundial de la Salud, desde 1996 no se ha reportado un brote significativo de diarrea asociado a giardiasis (www.who.int), varios artículos refieren que aún esta enfermedad continúa causando estragos, particularmente en comunidades de bajos recursos y que carecen de condiciones adecuadas de higiene (Giraldo-Gómez et al., 2005; García-Cervantes et al., 2017; Squire et al., 2017; Rogawski et al., 2017; Ibáñez-Cervantes et al., 2018; Galván-Ramírez et al., 2019; Gutiérrez-Jiménez et al., 2019;). En estudios de zonas de bajos ingresos en México, las parasitosis son muy frecuentes, especialmente entre los infantes (Quihui-Cota et al., 2017; Ibáñez-Cervantes et al., 2018; Galván-Ramírez et al., 2019; Panti-May et al., 2019) aunque, reportes de la Secretaría de Salud indican un descenso en la incidencia de esta enfermedad en un estudio de 5 años desde 2013 hasta el año 2015.

se estima que las cifras pudieran ser mayores a las reportadas (Ibáñez-Cervantes *et al.,* 2018).

1.5 Manifestaciones clínicas

Los síntomas de la giardiasis aparecen, después de 7-12 días de la ingestión del quiste, tiempo en el cual ya los trofozoítos han parasitado el epitelio intestinal (Adam, 2001). Las manifestaciones clínicas más comunes son la diarrea, náusea, vómito y pérdida de peso, aunque algunos individuos pueden ser asintomáticos y vencen la infección en un período de 2-3 semanas (Halliez *et al.*, 2013), mientras que otros pueden desarrollar una infección crónica (Einarsson *et al.*, 2016). La giardiasis crónica puede asociarse a patologías gastrointestinales como el síndrome de colon irritable y enfermedades gastrointestinales funcionales (FGID), así como afectaciones extraintestinales a largo plazo, como artritis, afectaciones oculares, alergias y síndrome de fatiga crónica (Halliez *et al.*, 2013).

1.5.1 Anclaje a los enterocitos del hospedero

Una vez ingerido el quiste, este es estimulado a desenquistarse, proceso que inicia en el estómago y culmina en el duodeno. Una vez en el intestino, los trofozoítos generados por el desenquistamiento van a adherirse al epitelio intestinal. El proceso de adhesión ya sea a la superficie intestinal o superficies experimentales (vidrio, plástico u otras) se debe a la adhesión del disco ventral a los enterocitos. La fijación depende del metabolismo activo y se inhibe por temperaturas menores a 37°C, aumento de los niveles de oxígeno, concentraciones reducidas de cisteína (Adam, 2001), afectaciones en los microtúbulos del disco (McCabe *et al.*, 1991; Sousa *et al.*, 2001) o en algunas proteínas asociadas (Woessner *et al.*, 2012). En 1974 se propuso el primer modelo de adhesión, conocido como modelo hidrodinámico (Holberton, 1974). En este modelo se plantea que el movimiento sinusoidal de los flagelos ventrales desplaza el fluido bajo el disco, haciendo que este circule a través del surco marginal (Fig. 2) y el surco ventral (Fig. 2) hacia el medio circundante (Holberton, 1974). Esto genera una diferencia de presión entre el disco ventral y el exterior del organismo (Holberton, 1974) generando una succión y el

mantenimiento de la adhesión al sustrato (Holberton, 1974). Lenaghan y col. plantearon este modelo como necesario para que ocurra la fijación del parásito (Lenaghan et al., 2011); sin embargo, varios estudios reportan la inexistencia de relación entre el movimiento flagelar ventral y la generación de una presión de succión (Feely et al., 1982b; Ghosh et al., 2001; House et al., 2011). En estudios in vitro se ha reportado que el proceso de adhesión no es dependiente solamente del disco ventral. Se ha visto que al inicio del contacto trofozoíto-superficie de adhesión el reborde ventrolateral contacta con el sustrato (Sousa et al., 2001; Erlandsen et al., 2004; Nosala et al., 2018). Esta es una proyección de la membrana del parásito que rodea al disco ventral y se encuentra separada de éste por el surco marginal (Fig. 2) (Elmendorf et al., 2003). Se ha observado que esta estructura puede presentar en el momento de adhesión múltiples proyecciones que se adhieren al sustrato (Erlandsen *et al.*, 2004) siendo una estructura importante en este proceso al igual que la cresta lateral del disco (Fig. 2), la cual forma un sello con la superficie (Sousa et al., 2001; Erlandsen et al., 2004; House et al., 2011; Nosala et al., 2018). Daños físicos en la cresta lateral impiden la adhesión del trofozoíto al sustrato (Woessner *et al.*, 2012).



Figura 2. Esquema de un trofozoíto. A) Se observan las diferentes estructuras y regiones de la región ventral del trofozoíto. B) Vista lateral. rvl: reborde ventrolateral, sm: surco marginal, fa: flagelo anterior, fv: flagelo ventral, fpl: flagelo postero lateral, fc: flagelo caudal (House *et al.*, 2011, Elmendorf *et al.*, 2003).

En la actualidad se considera que el proceso de anclaje no es dependiente de interacciones específicas (Hansen et al., 2006), como mecanismos mediados por lectina (Sousa et al., 2001), sino que está basado en una adhesión a modo de ventosa del disco ventral sobre el sustrato (Woessner et al., 2012; Nosala et al., 2018), pudiéndose dividir en una fase inicial o temprana y una tardía (House et al., 2011). En la fase inicial o temprana del anclaje, el trofozoíto se posiciona paralelo a la superficie de adhesión, presuntamente gracias al movimiento de los flagelos ventrales (House et al., 2011). A continuación, aproximadamente 1 segundo después de posicionarse de forma correcta, interactúan la sección anterior del reborde ventrolateral y el disco ventral con la superficie; se forma un sello entre la cresta lateral y el sustrato de adhesión (Fig. 3) (House et al., 2011; Woessner et al., 2012; Nosala et al., 2018). El sello formado por la cresta lateral presumiblemente permite mantener una presión negativa por debajo del disco durante el anclaje (Hansen et al., 2006). Posteriormente, en la fase tardía, 12-15 segundos después de la formación del sello, se establece un contacto entre el escudo lateral y la zona desnuda del disco ventral sobre la superficie de adhesión (Fig. 3) (House et al., 2011; Woessner et al., 2012; Nosala et al., 2018). Durante el anclaje el disco ventral permanece en una conformación cóncava solamente contactando el sustrato de adhesión la región de la cresta lateral y la zona desnuda (Fig. 3) (Woessner et al., 2012). Esto resulta necesario para la adhesión, pues se ha visto que, en ausencia de esta concavidad, no se genera una presión negativa bajo el disco y por tanto se impide la adhesión (Hansen et al., 2006). Se ha propuesto que mecanismos basados en presión osmótica también pudieran generar succión (Woessner et al., 2012).



Figura 3. Esquema de las fases en las que ocurre el anclaje de *G. intestinalis* al sustrato de adhesión. Inicialmente la región anterior del reborde ventrolateral (rvl) y el disco ventral (DV) contactan con el sustrato, seguido de la formación de un sello continuo entre la cresta lateral (CL) y el sustrato de adhesión y la forma de domo que adquiere el disco ventral (t= 1-2 s.) (Fase inicial o temprana del anclaje). Posteriormente el escudo lateral y la zona desnuda del disco ventral contactan con la superficie de adhesión (t= 12-15 s) (Fase tardía del anclaje). Están representados los contactos entre el trofozoíto y el sustrato (rojo) y los presuntos estados conformacionales y movimientos (flecha) del disco ventral (azul) en cada fase del anclaje. SV: Surco ventral, FA: Flagelo anterior,

Por otra parte, el desanclaje, según House y col., inicia con la liberación del contacto entre la zona desnuda con la superficie de adhesión, seguido por la liberación del escudo lateral. A continuación, el sello del disco se vuelve discontinuo, específicamente en el labio posterior y finalmente las células se desanclan (House *et al.*, 2011).

1.5.2 Afectaciones intestinales al hospedero

Una vez que el parásito se ha unido a las células epiteliales intestinales (CEIs) del huésped, comienza el crecimiento del parasitario, sobrevive y causa daños graves con consecuencias a su hospedero. Se ha visto que durante la interacción *in vitro* trofozoítoscélulas epiteliales intestinales, el parásito regula algunos de sus genes, tanto positiva como negativamente (Ringqvist *et al.,* 2011; Ferella *et al.,* 2014), lo cual pudiera ser inducido por las secreciones de las células epiteliales (Emery *et al.,* 2016). Entre los genes regulados positivamente se encuentran diferentes proteínas de excreción-

secreción (ESPs) así como proteínas de membrana (ej: VSPs), las cuales son tanto especie específicas como comunes al género (Maayeh et al., 2017; Dubourg et al., 2018) y van a mediar la patogenicidad y supervivencia del parásito (Jiménez et al., 2000; Liu et al., 2018; Emery et al., 2016; Maayeh et al., 2017; Maayeh et al., 2018). De manera in vitro, las proteínas secretadas pueden unirse a la superficie de los enterocitos, o establecerse en el espacio intercelular, así como internalizarse dentro de las CEIs, pudiendo quizás, modular procesos celulares o señalización (Emery et al., 2016; Maayeh et al., 2017). La mayoría de las ESPs poseen funciones metabólicas como el metabolismo de proteínas, metabolismo de aminoácidos, glicólisis, la generación de metabolitos precursores y generación de energía. Por ejemplo: desiminasa de arginina, transferasa ornitina-carbamoilo y α-enolasa (Skarin et al., 2011; Maayeh et al., 2017). Algunas de estas enzimas van a emplear como sustrato, metabolitos producidos por las CEIs como arginina (principal fuente de energía para el trofozoíto) (Stadelmann et al., 2013) y glucosa, conduciendo a la disminución de estos recursos dentro de los enterocitos, inhibición de la proliferación celular, disminución de la producción de óxido nítrico (NO) y apoptosis (Chin et al., 2002; Stadelmann et al., 2013, Maayeh et al., 2017, 2018). Por otra parte, el parásito también regula genes de los enterocitos, induce la expresión de varios genes apoptóticos como bbc3, pmaip1, aen, tnfrsf10b y diablo) (Maayeh et al., 2018), promueve la activación in vitro, de caspasa-3, 8 y 9, y aumenta la expresión de la proteína proapoptótica Bax (Panaro et al., 2007). También regula negativamente genes antiapoptóticos (Allain et al., 2017; Maayeh et al., 2018) y disminuye la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Panaro et al., 2007). Se ha visto un arresto del ciclo celular de los enterocitos in vitro, asociado al parecer, por daños inducidos por el parásito al DNA de estas células (Yu et al; 2008; Maayeh et al., 2017; 2018). Aunque varios artículos no documentan la invasividad al epitelio intestinal (Chin et al., 2002; Buret, 2008; Serradell et al., 2018), otros sí lo han reportado, especialmente en individuos sintomáticos, visualizándose por microscopía trofozoítos en la capa submucosa (Brandborg et al., 1967; Martínez-Gordillo et al., 2014; Reynoso-Robles et al., 2015). Entre las ESPs existe una abundancia de proteinasas (Jiménez et al., 2000), particularmente las proteinasas similares a catepsina B (Maayeh et al., 2017), las cuales causan una reorganización y floculación de las proteínas que conforman las uniones estrechas y adherentes entre las

CEI, como ZO-1, ocludina, claudina-1, claudina-4 y E-cadherina (Maia-Brigagão *et al.*, 2012; Allain *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018), así como cambios en la localización de la F-actina y afectaciones de las proteínas de unión al citoesqueleto (Maia-Brigagão *et al.*, 2012; Maayeh *et al.*, 2017). También se ha detectado que el parásito conduce a una regulación negativa del gen *amot* el cual codifica la proteína angiomotina, responsable del mantenimiento de las uniones estrechas (Maayeh *et al.*, 2018). Como consecuencia de lo anterior, aumenta la permeabilidad en el epitelio intestinal (Maia-Brigagão *et al.*, 2012; Allain *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018; Maayeh *et al.*, 2018).

Giardia causa el acortamiento difuso de las microvellosidades del borde en cepillo de los enterocitos (Maia-Brigagão *et al.*, 2012; Serradell *et al.*, 2018), lo que reduce el área disponible para la absorción de agua, nutrientes y transporte de electrólitos (Allain *et al.*, 2017; Maayeh *et al.*, 2017; Serradell *et al.*, 2018), lo cual explica la deficiencia de vitamina A en el hospedero producto de la infección con *G. intestinalis*, fenómeno observado fundamentalmente en infantes (Quihui-Cota *et al.*, 2008), así como malabsorción de fructosa en adultos (Trelis *et al.*, 2019). Según Chin *et al.*, 2002 muchos de los daños inducidos a los enterocitos son dependientes de la cepa infectante (Chin *et al.*, 2002), y la coinfección de dos especies juntas como *G. intestinalis y G. enterica*, conlleva a una mayor disrupción del epitelio intestinal (Koh *et al.*, 2013).

Para lograr adherirse al epitelio intestinal, el parásito debe superar la barrera mucosa física, la cual constituye un impedimento para la adhesión de los trofozoítos a los enterocitos. Además de la natación, *G. intestinalis* produce proteinasas que afectan a MUC2 y le permiten atravesar un medio menos viscoso (Cotton *et al.*, 2015), lo cual también va a provocar afectaciones en el epitelio del intestino, al estar más expuesto a la acción mecánica de los alimentos y patógenos intestinales que pudieran invadir este epitelio (Serradell *et al.*, 2018). Como mecanismo compensatorio, las células caliciformes van a sobrexpresar *muc2*, produciendo más mucus para compensar el daño a esta barrera (Maayeh *et al.*, 2018). Por otra parte, se ha propuesto que la capa de moco puede ser protectora para los trofozoítos, al prevenir lesiones por exposición a productos luminales (Allain *et al.*, 2017).

Además del daño inducido al epitelio intestinal, causa disbiosis de la microbiota del hospedero, fenómeno que puede extenderse hacia el colon (Barash *et al.*, 2017) y un aumento de especies dañinas como *Escherichia coli* enteropatogénica, *Vibrio cholerae* y *Enterococcus* spp debido a la modulación de la respuesta inmune del hospedero que induce este parásito, lo cual va a permitir abundancia de estas especies (Ferella *et al.*, 2014; lebba *et al.*, 2016). También es capaz de activar genes de virulencia latentes en las bacterias comensales (Allain *et al.*, 2017). Por otra parte, se plantea que este parásito es capaz de disminuir los efectos patogénicos de determinados enteropatógenos, al encontrarse una reducción del riesgo de inflamación y diarrea en presencia de la infección por *Giardia* (Bartelt *et al.*, 2015). Por otra parte, la microbiota puede contribuir a la eliminación del parásito (Cahenzli *et al.*, 2013). Se ha visto en estudios con lactobacilos, que estos logran aumentar la respuesta inmune del hospedero y disminuir la duración de la infección (Bartelt *et al.*, 2015; Allain *et al.*, 2017), el mismo fenómeno se ha observado en coinfección de *G. intestinalis* con *Enterococcus faecium* y *Saccharomyces boulardii* (Benyacoub *et al.*, 2005; Franco *et al.*, 2013).

1.5.3 Inmunidad del hospedero en la infección por Giardia spp

El primer mecanismo para la erradicación del parásito una vez adquirida la infección, son los movimientos peristálticos del intestino del hospedero, seguido de la presencia de mucus y la microbiota intestinal, que como se mencionó anteriormente, ambas barreras van a influir en las capacidades de adherencia a los enterocitos y supervivencia en el lumen intestinal, respectivamente. Por otra parte, de modo *in vitro* se ha visto que los trofozoítos expuestos a la secreción de células intestinales presentan dificultades en el anclaje al epitelio (Emery *et al.*, 2016). Una vez efectuada la adhesión de los trofozoítos a las CEIs, se activan diferentes mecanismos giardiacidas. En estudios *in vitro* e *in vivo* se ha visto que las proteinasas secretadas por *Giardia* durante la infección promueven la expresión de péptidos antimicrobianos por parte de las células intestinales como HBD-2 y TFF3 (Cotton *et al.*, 2014; Manko *et al.*, 2017), lo cual impacta de manera diferente a

cada especie de Giardia (López-Romero et al., 2015). Aumenta la actividad y expresión del transportador de sodio-glucosa (SGLT-1) en las CEIs, aumentando la internalización de glucosa, lo cual inhibe la caspasa-3 y el daño al DNA, (Yu et al., 2008), contrarrestando así la apoptosis inducida por el trofozoíto. Durante la infección temprana y a lo largo de todo el proceso infeccioso los enterocitos van a producir especies reactivas de oxígeno (ROS) (Maayeh et al., 2018) y NO, el cual es liberado al lumen intestinal (Heyworth, 2014; Allain et al., 2017; Pacheco et al., 2019), inhibiendo la exquistación e induciendo un efecto citostático en los trofozoítos (López-Romero et al., 2015). Se ha visto que ROS y NO pueden actuar de una manera genotipo dependiente, al causar un mayor efecto en algunas especies que en otras (López-Romero et al., 2015). La producción de NO es contrarrestada por los trofozoítos mediante el consumo de la arginina de los enterocitos (Allain et al., 2017) y al parecer disminuyen el daño, mediante el aumento en la expresión de FIH-β (Stadelmann et al., 2013) y la activación de enzimas oxido-reductasas (ej: cisteína reductasa y disulfuro reductasa) para contrarrestar el daño causado por ROS (Raj et al., 2014; Maayeh et al., 2017). También, en la etapa temprana de la infección los enterocitos activan una respuesta inflamatoria mediada, principalmente, por los factores de transcripción AP-1 y NFkB, los cuales inducen la transcripción de genes proinflamatorios, principalmente los que codifican para las citocinas CXCL 1-3, CXCL-8, IL-1 α y β, CSF-1, CX3CL1, IL-12α, CLCF1, IL-11 y CCCRL-2 (Maayeh et al., 2018), así como niveles altos de TNF-α, IFN-c, IL-6, IL-12, IL-5, IL-4, IL-2, IL-13, IL-15, IL-17, IL-22 e IL-23 (Zhou et al., 2007; Grit et al., 2014; López-Romero et al., 2015), entre ellas, IL-6 es fundamental para la erradicación del parásito, pues su ausencia conduce a una parasitosis más prolongada (Zhou et al., 2007; Heyworth, 2014; Li et al., 2020a). También se regulan positivamente genes asociados a la inhibición de la activación del sistema del complemento (Maayeh et al., 2018). Las citocinas anteriores conducen un reclutamiento al sitio de infección de células del sistema inmune como células dendríticas (López-Romero et al., 2015) y mastocitos, estos últimos asociados a modelos murinos (Merluzzi et al., 2010; Li et al., 2020a), los cuales se ha visto que son fundamentales para eliminar la infección por G. intestinalis, al apreciar que ratones deficientes no podían eliminar al parásito (Zhou et al., 2007). Giardia es capaz de activar mecanismos antinflamatorios como estrategia de supervivencia, principalmente mediante la inhibición de la vía MAPK

atenuando la señal inflamatoria dada por la activación de NF κ B y AP-1 (Maayeh *et al.*, 2017, 2018) e induce la expresión de IL-10 y TGF- β , las cuales impiden el reclutamiento celular (Cotton *et al.*, 2014; López-Romero *et al.*, 2015; Dann *et al.*, 2018). Otro mecanismo antinflamatorio es la degradación por parte de las ESPs de citocinas/quimiocinas proinflamatorias como IL-8, CCL20, CXCL1 y TNF- α (Liu *et al.*, 2018). La modulación de la inflamación es dependiente de la cepa, por ejemplo, *G. intestinalis* tiene una acción antinflamatoria mayor en comparación con *G. enterica* (Cotton *et al.*, 2014; Maayeh *et al.*, 2018).

El rol de los anticuerpos en la erradicación de la enfermedad no está del todo esclarecido. Algunos estudios proponen a las IgA e IgG como determinantes en la erradicación del parásito (Li et al., 2004; Heyworth, 2014; Grit et al., 2014; Heyworth, 2014), ya que individuos hipogamaglobulinémicos tienden a presentar una infección prolongada (Langford et al., 2002; Serradell et al., 2018), así como dificultad una mayor para eliminar la enfermedad ante afectaciones en la producción de IgA (Bartelt et al., 2015). Otros estudios refieren que los anticuerpos no son esenciales para la erradicación del parásito, especialmente en la fase aguda de la infección (Singer et al., 2000; López-Romero et al., 2015). No obstante, en individuos infectados por G. intestinalis, se han detectado anticuerpos en suero capaz de reconocer proteínas invariantes del parásito (ej. α-giardinas, fructosa-1,6-bisphosphato aldolasa), enzimas involucradas en el metabolismo de arginina (ej: arginina deiminasa y ornitina carbamoil transferasa) (Heyworth, 2014), las proteínas de la pared del quiste (CWPs) (López-Romero et al., 2015) y proteínas de superficie variante-específicas (VSPs) (Nash et al., 2002; Rivero et al., 2010; Serradell et al., 2018), contribuyendo a la erradicación de la enfermedad (Heyworth, 2014).

La respuesta inmune mediada por células T también contribuye a la eliminación de la infección, donde se ha visto que los ratones deficientes de estas células son incapaces de erradicar el parásito (Singer *et al.,* 2000; López-Romero *et al.,* 2015). La respuesta ante *G. intestinalis* es de tipo Th1/Th2/Th17, (Li *et al.,* 2020a), existiendo un cambio de Th1 a Th2 al inicio de la infección (Abdul-Wahid *et al.,* 2008; Serradell *et al.,* 2018), presuntamente como mecanismo de protección por parte del parásito (Serradell *et al.,* 2018).

2018), para finalmente establecerse una respuesta Th17, la cual es fundamental en la eliminación de la infección, teniendo más peso que la Th1/Th2 (Dreesen et al., 2014; Grit et al., 2014; Dann et al., 2015). Como parte de la respuesta inmune celular clave para eliminar este parásito, también están las células TCD4+. En humanos y animales, una disminución en las poblaciones de estas células contribuye al desarrollo de giardiasis crónica (Eckmann, 2003; López-Romero et al., 2015), mientras que las TCD8+ y natural killers (NK), al parecer son de poca importancia en este proceso (Eckmann, 2003). No obstante, se ha visto que la respuesta inmune por células TCD8+ puede contribuir al acortamiento de los microvilli, en modelos murinos (Scott et al., 2002, 2004), evidenciándose que esta afectación en particular es dependiente tanto del parásito como de la inmunidad del hospedero. La respuesta inmune del hospedero hacia Giardia también varia en dependencia de la especie; al parecer G. enterica logra despertar una respuesta inmune más intensa que G. intestinalis (Hanevik et al., 2011; Lee et al., 2012). En poblaciones expuestas a Giradia spp, está confirmado que los individuos presentan anticuerpos en suero y células T (particularmente Th1) (Bartelt et al., 2015) que responden ante antígenos de Giardia, los cuales son más abundantes en niños que en adultos (Moss et al., 2014; Cotton et al., 2015), lo cual explicaría la ausencia o los síntomas clínicos leves asociados a esta parasitosis en individuos de áreas endémicas y un presunto establecimiento de Giardia spp como comensal dentro de la microbiota de estos individuos (Hanevik, 2016).

1.5.3.1 Proteínas de superficie variante-específicas

Un mecanismo fundamental en este parásito para la evasión del sistema inmune del hospedero es la variación de los antígenos de superficie. Los antígenos de superficie involucran en su mayoría a proteínas de superficie variante-específicas (VSPs), las cuales se encuentran distribuidas en toda la superficie del parásito, formando una cobertura densa (Pimenta *et al.,* 1991; Eckmann, 2003; Davids *et al.,* 2019) y se consideran altamente inmunogénicas (López-Romero *et al.,* 2015).

Sólo un tipo de VSP se expresa a la vez en la superficie de cada trofozoíto (Heyworth, 2014; Serradell et al., 2018;), aunque varios genes vsp se están transcribiendo en el mismo momento, pero sólo uno es capaz de traducirse a proteína, debido al silenciamiento postranscripcional asociado a RNAs de interferencia (RNAis) y al RNA pequeño (RNAs) (Prucca et al., 2008; Guo et al., 2014; Saraiya et al., 2014), aunque se desconoce exactamente las causas que llevan a que se silencien los transcritos en favor de sólo uno, se piensa que puede estar atribuido a diferencias en la concentración de los diferentes transcritos de vsp (Prucca et al., 2008). Se ha visto que antes que el sistema inmune del hospedero pueda crear una respuesta de anticuerpos específicos contra la VSP que se está expresando en la membrana del parásito (Nash et al., 2002; Serradell et al., 2018), este es capaz de cambiarla por otra (Serradell et al., 2018). Aunque se considera que este fenómeno se encuentra regulado por desacetilasas de histonas (Gargantini et al., 2016), las causas por las cuales se da este cambio previo a la generación de anticuerpos no están del todo esclarecidas. Se ha reportado que la exposición del trofozoíto a la secreción del epitelio intestinal puede ser un factor estimulante al cambio (Emery *et al.,* 2016), también la exposición a NO y ROS (Serradell et al., 2018), así como el estado nutricional de los trofozoítos, para cultivos in vitro (Gargantini et al., 2016). Este fenómeno de cambio de proteína VSP resulta fundamental para la supervivencia a través de la evasión del sistema inmune, pues los animales inoculados con trofozoítos capaces de expresar todo su repertorio de VSPs fueron capaces de evadir infecciones posteriores con el parásito gracias al desarrollo de inmunoglobulinas específicas contra estos antígenos, no así para la infección con trofozoítos que expresan una sola VSP a la vez (Rivero et al., 2010; Serradell et al., 2016, 2018).

1.6 Diagnóstico

Poder diagnosticar la giardiasis a tiempo y de manera correcta es esencial para establecer un tratamiento efectivo para el paciente. Una vez obtenida la muestra de heces humanas o animales, se procede a aislar el parásito del resto de los desechos. Esta separación puede ser tanto por método directo como por concentración. El método

directo se lleva a cabo mediante la suspensión de la muestra de heces en soluciones salinas fisiológicas (0.85 NaCl) o la fijación en formalina ácido acético-acetato de sodio (SAF), lo que permite preparar montajes húmedos con el fin de observar trofozoítos de Giardia spp en muestras de diarrea o muestras fecales pastosas. Debido a que el número de quistes puede ser bajo y su expulsión suele ser intermitente, se le solicita al paciente dos o más muestras en días consecutivos para así aumentar las probabilidades de detección (Hooshyar et al., 2019). Por otra parte, la concentración fecal es un procedimiento recomendado y rutinario que permite la detección de cantidades pequeñas de quistes de Giardia los cuales pudieran no ser detectados usando la técnica anterior (Koehler et al., 2014). La flotación y sedimentación son dos tipos de procedimientos de concentración que han sido usados en el laboratorio parasitológico. El método de flotación permite la separación de quistes a través del uso de un líquido con una gravedad altamente específica como NaCl, NaNO₃, ZnSO₄. El ZnSO₄ en este método, se ha recomendado en solución saturada, como la mejor para detectar quistes de Giardia (Smith et al., 2011). Los quistes flotan y son visibles en la superficie mientras que el exceso de heces se agrega en el fondo del tubo. Esta técnica puede emplearse con modificaciones, al agregar un paso de centrifugación luego de que las muestras emulsifiquen para así aumentar la eficiencia de la obtención de guistes. La sedimentación es el método de concentración más recomendado, pues es más fácil de llevar a cabo y menos propenso a errores técnicos (Smith et al., 2011). Varios métodos de sedimentación se usan en Giardia, como el de formalina-éter o formalina-etil acetato. Se ha planteado que la técnica con formalina-éter es más sensible en un 40% que el método directo (Elmi et al., 2017). Una vez aislado el parásito del resto de las heces se procede a su identificación. Para ello se emplea la microscopía de luz como el estándar de oro (Koehler et al., 2014; Hooshyar et al., 2019). Este es un método barato y rápido para el diagnóstico médico, pudiendo identificar tanto quistes como trofozoítos, aunque no permite distinguir especies dentro del género (Thompson et al., 2004).

Varias técnicas de tinción se pueden usar para teñir trofozoítos o quistes de *Giardia* previo a su visualización en el microscopio. El azul de metileno, iodina o solución de Lugol o Giemsa son las más empleadas (Koehler *et al.,* 2014). La hematoxilina de hierro y

tricromo también son colorantes empleados en la tinción de trofozoítos y quistes de *Giardia spp* o pueden ser observados sin teñir (Hooshyar *et al.*, 2019). En el caso de la identificación de los quistes a partir de muestras de agua se recomienda el uso de filtración, separación inmunomagnética (IMS) y la detección mediante microscopía de interferencia diferencial (DIC) (Hooshyar *et al.*, 2019).

En los últimos años se han empleado varios métodos de inmunodiagnóstico para giardiasis. Se basan en la detección de antígenos del parásito en las muestras de heces de los pacientes y generalmente son empleados como métodos complementarios cuando el diagnóstico por microscopía es incongruente (Hooshyar *et al.*, 2019). Estas pruebas de inmunodiagnóstico incluyen técnicas como ELISA, Western blot, DFA u otros inmunoensayos. Existen varios artículos acerca de la sensibilidad de estos métodos en comparación con la microscopía, los cuales concluyen en su mayoría que los inmunoensayos son más sensibles o tan sensibles como el examen microscópico (ampliamente reportado en Koehler *et al.*, 2014). Aunque otros refieren que la sensibilidad de la detección de antígenos puede ser más baja que la de microscopía (Johnston *et al.*, 2003). Estas diferencias pueden ser debido a reacciones cruzadas lo cual afecta la especificidad, la expulsión intermitente de quistes por parte del hospedero, los cambios en la expresión de antígenos de superficie de Giardia (VPSs) o el uso de formalina como fijador, aspectos que reducen la sensibilidad (Koehler *et al.*, 2014).

Los métodos moleculares no son usados en los laboratorios clínicos para la detección de este parásito, debido a su alto costo; más bien han sido empleados en la investigación y para la identificación de especies o ensamblajes dentro del género (Smith *et al.*, 2017; Hooshyar *et al.*, 2019). El método molecular más empleado es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), entre ellas la PCR basada en el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) (Koehler *et al.*, 2014) y la PCR en tiempo real. Algunos estudios muestran valores de sensibilidad y especificidad superiores a los de las técnicas mencionadas anteriormente (Laude *et al.*, 2016; Beyhan *et al.*, 2017; Hijjawi *et al.*, 2018). También se emplea la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), enfocándose más a la hibridación del RNA que del DNA (Koehler *et al.*, 2014).

1.7 Tratamiento

En los inicios del tratamiento de la giardiasis se empleó la quinacrina como único fármaco durante varios años. Aunque su comercialización original fue como agente antipalúdico, se mostró más de 90% de eficiencia como antigiárdico (Huang et al., 2006). Se argumenta que el mecanismo de acción de este fármaco interfiere con los componentes flavinas de Giardia, lo que conduce a una disminución en el consumo de oxígeno, también puede inhibir la síntesis de ácido nucleico del parásito mediante la unión al DNA y es capaz de reducir la exquistación y la viabilidad del quiste (Lalle, 2010). Tiene una vida media larga y se distribuye ampliamente en los tejidos. Debido a las reacciones adversas severas que induce (Tabla II), la quinacrina fue remplazado por el metronidazol en la década de los 1960s, el cual ha sido empleado hasta la actualidad como tratamiento primario contra la giardiasis. También otras drogas de los grupos 5-nitroimidazoles, al cual pertenece el metronidazol, y benzimidazoles son empleadas como tratamiento. La familia de los 5-nitroimidazoles (metronidazol, tinidazol, ornidazol y secnidazol) son las drogas más empleadas para el tratamiento de la giardiasis, debido a su alta efectividad como antiparasitarios, su bajo costo y fácil accesibilidad (Vivancos et al., 2018). Son compuestos con una estructura heterocíclica consistente de un núcleo de imidazol con un grupo nitro, NO₂, en posición 5. Esta familia de medicamentos fue introducida en 1959 por Rhone Poulenc para tartar la infección por Trichomonas y su actividad como antigiárdico fue probada por primera vez en 1962 (Lalle, 2010). El mecanismo de acción es mediante la reducción del grupo nitro, el cual acepta los electrones provenientes del transporte de electrones generado por las enzimas piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) y ferredoxina del parásito. PFOR es una proteína del transporte de electrones que convierte piruvato a acetil coenzima A, transfiriendo un electrón a la ferredoxina, lo cual, en presencia de un 5-nitroimidazol, reduce la unidad nitro del metronidazol, en vez de a la ferredoxina, conduciendo a la activación de la droga (Lalle, 2010). Dicha activación conduce a daños en el DNA con pérdida de la estructura helicoidal, deterioro de sus

funciones y consecuente muerte del trofozoíto, también puede producir radicales libres que reaccionan con componentes celulares esenciales (Huang *et al.,* 2006).

El más empleado de los 5-nitroimidazoles, en la giardiasis, es el metronidazol, erigiéndose en el tratamiento primario ante la enfermedad. La tasa de eficacia oscila entre el 60 y el 100% (Huang et al., 2006; Vivancos et al., 2018). Además, del efecto mencionado de los 5-nitroimidazoles, el metronidazol también inhibe la respiración del parásito (Vivancos et al., 2018) y es capaz de inhibir el enquistamiento en experimentación in vitro (Hausen et al., 2006). A pesar de ser el medicamento más empleado, los efectos secundarios son comunes (Tabla II) y existe ocurrencia de falla terapéutica debido a la aparición de resistencia, y la dificultad de dosificación correcta en los niños, a causa del sabor desagradable del ingrediente activo (Vivancos et al., 2018). En el caso del secnidazol, su absorción es muy lenta, tiene una vida media larga lo que permite que el fármaco permanezca más tiempo en el lumen intestinal mejorando la acción in situ contra los parásitos. La tasa de curación es de 80-98% (Vivancos et al., 2018) y se han reportado efectos adversos (Tabla II). Otro miembro de esta familia es el tinidazol, el cual se comercializó por primera vez en la década de los 1970s y en el 2004 fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el tratamiento de la giardiasis, tricomoniasis y amebiasis intestinal (Vivancos et al., 2018). La eficacia oscila entre 72 - 100% y generalmente es mejor tolerado que el metronidazol. Algunas autoridades consideran el tinidazol como terapia de primera línea para la giardiasis, ya que se puede ofrecer como un tratamiento de una sola dosis, y tiene poca frecuencia de efectos adversos (Tabla II) (Huang et al., 2006; Vivancos et al., 2018). Por otra parte, el ornidazol también es una buena alternativa en el tratamiento de la giardiasis. Tiene una eficacia entre 90%-100%, en ocasiones es mayor a la del metronidazol. La dosis única es posible debido a su larga vida media (13 h) (Vivancos et al., 2018) y presenta también pocos efectos adversos (Tabla II).

Otros medicamentos empleados ampliamente para el tratamiento de la giardiasis son los benzimidazoles, específicamente el albendazol y el mebendazol (Tabla II), los cuales se utilizan generalmente para tratar enfermedades helmínticas. Los benzimidazoles son
un derivado del 2-nitroimidazol que se utilizan para el tratamiento de Chagas y otras enfermedades parasitarias. Ejercen su efecto tóxico sobre el trofozoíto de Giardia spp uniéndose a la tubulina, lo que provoca la inhibición de la polimerización (Huang et al., 2006). También pueden actuar mediante otros mecanismos, incluida la alteración de la homeostasis del ATP, la descarga de protones transmembrana o la reducción de la captación de glucosa (Lalle, 2010). Se plantea que los benzimidazoles son más activos que metronidazol y quinacrina incluso a bajas concentraciones (Vivancos et al., 2018). El albendazol es eficaz en giardiasis, aunque su eficacia tiene alta variabilidad (25-90%) dependiendo de la dosis programada. Generalmente muestra una eficacia similar a metronidazol y menos efectos adversos (Tabla II), aunque tiene menor eficacia que el tinidazol (Escobedo et al., 2016). El albendazol se absorbe poco (5%) después de la administración oral. La vida media plasmática de albendazol es de 8.5 horas. Los quistes de G. duodenalis son insensibles al albendazol, ya que su formación y viabilidad en presencia del fármaco no resultan afectadas ni *in vivo* ni *in vitro* (Lalle, 2010); no obstante. se ha visto que este fármaco afecta el enquistamiento de manera negativa (impidiendo su ejecución) (Hausen et al., 2009) o de manera positiva (promoviendo el enquistamiento) (Pérez-Rangel et al., 2013).

Tabla II. Dosis, efectos adversos de diferentes drogas antigiárdicas y contraindicaciones en el embarazo. (Huang et al., 2006; Robertson et al., 2010 y Vivancos et al., 2018).

Droga	Dosis	Efectos adversos	Contraindicaciones en el embarazo
Quinacrina	100 mg tres veces al día x 5-7 días en adultos. 6 mg/kg tres veces al día x 5 - 7 días en niños.	Náuseas, vómitos, coloración amarillo-naranja de la piel, la esclerótica y la orina; pigmentación de uñas, dolor de cabeza, urticaria, dermatitis exfoliativa y alteraciones psiquiátricas.	Contraindicado, debido a su capacidad para atravesar la placenta lo cual podría resultar en algunos problemas fetales como la espina bífida enfermedad renal.
Metronidazol	250 mg tres veces al día x 5-7 días en adultos 15 mg/kg tres veces al día x 5-7 días en niños	Sabor metálico, náuseas, dolor de cabeza, orina oscurecida. Con menos frecuencia: pancreatitis, toxicidad en el sistema nervioso central, neutropenia reversible y/o periférica.	No recomendado, debido a su potencial teratogénico <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
Tinidazol	Dosis única de 2 g en adultos. Dosis única de 50-60 mg en niños	Baja frecuencia de efectos adversos. Puede producir sabor amargo, náuseas y erupción cutánea. Si la duración del tratamiento es superior a 7 días, pueden aparecer trastornos neurológicos como mareos, incoordinación y ataxia.	Por precaución no debe consumirse durante el embarazo pues, aunque parece no afectar el desarrollo fetal, es mutagénico en bacterias y cancerígeno en ratones,
Secnidazol	Dosis única de 2 g en adultos. Dosis única de 30 mg/kg en niños (No administrable para niños menores a 2 años)	Efectos secundarios leves como náuseas, vómitos y sabor amargo.	
Ornidazol	Dosis única de 2 g en adultos. Dosis única de 40-50 mg/kg en niños.	Baja frecuencia de efectos adversos. En algunos casos puede conducir a hepatitis o colangitis.	No recomendado debidos a la posibilidad de efectos genotóxicos y citotóxicos a partir de estudios <i>in vitro</i> .
Albendazol	400 mg diarios una vez al día x 5 días en adultos. 15 mg/kg diarios x 5-7 días en niños. (No recomendado en niños menores a 6 años)	Interacciones farmacológicas con Ampicilina, Ciclosporina y Clotrimazol. Los efectos adversos son más frecuentes en niños: malestar abdominal, náuseas, vómitos, dolor de cabeza, mareos y aumentos reversibles en las transaminasas hepáticas y anorexia.	Contraindicado, debido a los posibles efectos teratogénicos descritos en animales
Mebendazol	200-400 mg dos o tres veces al día x 1-5 días, tanto en adultos como en niños.	Dolor abdominal, diarrea, náuseas y vómitos. Mareos, dolor de cabeza y alopecia son raros. Los efectos adversos podrían ser más graves en pacientes con enfermedad hepática. En el tratamiento prolongado y la dosis alta podría aparecer aplasia de médula y hepatitis granulomatosa.	
Nitazoxanida	Dos dosis diarias de 500 mg x 3 días en adultos. 7.5 mg/kg dos veces al día x 3 días en niños.	Generalmente afectaciones gastrointestinales, principalmente diarrea y malestar abdominal los cuales parecen ser dosis dependientes. Puede ocasionar alteraciones del sistema nervioso, las cuales incluyen dolor de cabeza en la mayoría de los casos, pero también puede ocurrir mareos, somnolencia, insomnio e hipostesia.	
Paramomicina	500 mg tres veces al día x 5-10 días en adultos. 25-30 mg/kg/ tres veces al día x 5-10 días en niños.	Puede inducir ototoxicidad y nefrotoxicidad.	Por lo general es el medicamento recomendado para tratar la giardiasis durante el embarazo, principalmente durante el primer trimestre.
Furazolidona	400 mg tres o cuatro veces al día x 7-10 días en adultos. 2 mg/kg cuatro veces al día x 10 días en niños.	Náuseas, vómitos, dolor de cabeza, malestar general, reacciones de hipersensibilidad, hipotensión, erupción cutánea y urticaria. Se ha comprobado su carcinogénesis en roedores y mutagenicidad en bacterias.	

1.7.1 Resistencia y tratamientos alternativos

Debido al uso extendido de los medicamentos anteriormente mencionados, se ha generado una resistencia al tratamiento por parte del parásito. Aunque el mecanismo de resistencia en la giardiasis no está claro, se plantea que difiere en dependencia de la cepa (Vivancos et al., 2018). En particular, en G. duodenalis, los mecanismos moleculares de resistencia al metronidazol pueden ser clasificados como pasivos (regulación negativa de enzimas que reducen el metronidazol a intermediarios tóxicos) o activos (regulación positiva de enzimas que destoxifican el metronidazol directamente o controlan el daño inducido por éste) (Ansell et al., 2017). El mecanismo de resistencia pasiva más conocido es el que involucra a PFOR y su aceptor de electrones, la ferredoxina, donde la baja actividad o supresión de ambas enzimas está presente en líneas resistentes al metronidazol in vitro (Leitsch et al., 2011). Otro mecanismo de resistencia pasiva es la regulación negativa de la nitrorreductasa-1, la cual activa al metronidazol y se encuentra regulada negativamente en cepas resistentes al metronidazol (Müller et al., 2007, 2015). Un mecanismo de resistencia pasiva menos directo implica la regulación negativa de las enzimas de desintoxicación de oxígeno, lo que permite que el oxígeno intracelular se acumule e inactive al metronidazol a través de un ciclo redox fútil (Ansell et al., 2017). Como mecanismo activo tenemos la regulación positiva de la nitrorreductasa-2, un parálogo de la nitrorreductasa-1, la cual reduce el metronidazol a una amina inerte, evitando así los intermediarios reactivos (Müller et al., 2013, 2015). Por otra parte, las enzimas de la familia de las ferredoxinas, que se unen a los grupos hierro-azufre (Fe-S), están fuertemente implicadas en los mecanismos de resistencia tanto pasivos como activos. (Ansell et al., 2017). También se ha planteado el cambio en la expresión génica como un mecanismo de resistencia al metronidazol, a la nitazoxanida (Müller et al., 2008) y a los benzimidazoles (Argüello-García et al., 2009a), aunque esto no está del todo aceptado, pues se ha observado que trofozoítos resistentes a estas drogas exhiben niveles de expresión de mRNA similares a los de organismos no resistentes (Aguayo-Ortiz et al., 2013; Müller et al., 2018).

Por otra parte, la resistencia de *G. duodenalis* a los benzimidazoles se produce principalmente a través de mutaciones en la β -tubulina (Aguayo-Ortiz *et al.*, 2013). Se ha observado *in vitro* que la resistencia a esta familia de drogas está dada por mutaciones en el dominio ROD de giardina, un componente estructural del disco ventral (Lalle, 2010). También el parásito ha desarrollado estrategias ante el daño al DNA infligido por algunas drogas, al sobreexpresar Rad52, la cual es fundamental para el trabajo de las recombinasas y el alineamiento efectivo de los extremos dañados o rotos de la cadena de DNA, y así mejorar la eficiencia de la reparación de la cadena nucleotídica mediante recombinación homóloga (Martínez-Miguel *et al.*, 2017).

Hasta hace pocos años, la lucha contra la resistencia al tratamiento se basó en el aumento de la dosis de los medicamentos tradicionales o en el cambio del calendario de medicamentos. Sin embargo, hoy en día, se están llevando a cabo otras estrategias para lidiar con dicha resistencia, por ejemplo: medicamentos más antiguos, como la quinacrina, se ha rescatado como tratamiento contra *Giardia* (Requena-Méndez *et al.,* 2017), también se está empleando la combinación de varios fármacos antigiárdicos como secnidazol-albendazol como parte de estrategias efectivas para el tratamiento de la giardiasis (Escobedo *et al.,* 2018). Además, se recurre al uso de medicamentos alternativos y a la investigación *in vitro* e *in vivo* de nuevos compuestos como agentes antigiárdicos que pudieran ser empleados como tratamiento en el futuro.

Los medicamentos alternativos más empleados son la nitazoxanida, furazolidona y paramomicina, los cuales tienen una alta eficiencia. La nitazoxanida fue descrita por primera vez en 1980 como antihelmíntico, pero pronto se encontró que era eficaz contra una gama de parásitos intestinales mostrando actividad de amplio espectro. En 2004, fue aprobado para el tratamiento infantil de la giardiasis en los EE. UU. y tuvo éxito en el tratamiento de la giardiasis resistente al metronidazol (Vivancos *et al.,* 2018) y posteriormente fue aprobado para el tratamiento de adultos. Necesita ser reducido para ser activado y formar radicales tóxicos, tal y como ocurre con los fármacos 5-nitroimidazoles. El mecanismo de acción parece ser multifactorial ya que la nitazoxanida inhibe algunas enzimas importantes presentes en *Giardia* (nitrorreductasa, ferredoxina

oxidorreductasa y quinona reductasa). El fármaco interfiere con el metabolismo de la energía anaeróbica mediante la inhibición de la transferencia de electrones dependiente de la enzima PFOR (Huang *et al.,* 2006). Tiene un espectro más amplio y menor toxicidad que metronidazol, pero presenta menor eficacia (70-80%) que otros 5-nitroimidazoles y por supuesto presenta efectos adversos (Tabla II) (Vivancos *et al.,* 2018). Su absorción gastrointestinal es rápida y la vida media oscila entre 2-6 h (Vivancos *et al.,* 2018).

La furazolidona es un nitrofurano sintético, introducido en 1960 para el tratamiento de la giardiasis. También emplea la reducción del grupo nitro como mecanismo de activación de su función, pero su activación probablemente esté mediada por una NADH oxidasa. Las formas reducidas de furazolidona interfieren con el DNA y las proteínas, inhibiendo su síntesis y provocando también la detención del ciclo celular. Los efectos de la furazolidona sobre los trofozoítos de G. duodenalis incluyen cambios en la morfología como células redondeadas, disminución del contenido del citoplasma y extrusiones citoplasmáticas (Lalle, 2010). También es capaz de afectar el enquistamiento in vitro mucho más que el metronidazol (Hausen et al., 2006). Tiene una eficacia de 80% a 85% (Huang et al., 2006). Es bien absorbida después de la administración oral y metabolizada en tejidos, por lo que su concentración en suero y orina es muy baja. Las desventajas de esta droga son el gran volumen de dosificación y alto precio. (Vivancos et al., 2018). El perfil de efectos secundarios significativo se muestra en la Tabla II. También se han dado casos de resistencia a esta droga, la cual se ha correlacionado con una menor entrada del fármaco o con un aumento de los niveles de enzimas que pueden proteger de los radicales tóxicos (Huang et al., 2006). La paramomicina es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro producido por la bacteria Streptomyces rimosus y aislado en la década de 1950 (Lalle, 2010). Presenta una actividad antigiárdica in vitro e in vivo, pero su actividad es menor que la de los 5-nitroimidazoles, quinacrina y furazolidona y rara vez se utiliza en la práctica clínica, aun así, es considerado como el medicamento de excelencia para tratar esta parasitosis durante el embarazo. Presenta una eficacia del 60-70% contra la giardiasis (Lalle, 2010). Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas giárdicas (Vivancos et al., 2018), además afecta la disociación normal y el reciclaje de las subunidades ribosómicas (Scheunemann et al.,

2010). Se absorbe mal a nivel intestinal, lo cual resulta en altos niveles de drogas en el intestino que es una ventaja para este medicamento (Vivancos *et al.,* 2018). Sus efectos secundarios son escasos en comparación con los de otras drogas (Tabla II).

Otras drogas alternativas son la auranofina y el zinc de bacitracina. La auranofina fue aprobado por la FDA en 1985 y utilizada en el tratamiento de la artritis reumatoide, no obstante, exhibe actividad contra una variedad de parásitos, incluyendo *G. duodenalis*. Actúa inhibiendo la actividad de la enzima giárdica tiorredoxina oxidorreductasa (TrxR). Este medicamento es soluble en grasa y se absorbe por vía oral. La vida media es de 16.8 días. Se administra generalmente en una sola dosis de 6 mg o en dos de 3 mg cada una. Manifiesta efectos adversos significativos durante el tratamiento a largo plazo como diarrea y otros efectos secundarios gastrointestinales (Vivancos *et al., 2018*). Por su parte, el zinc de bacitracina interfiere con un paso de desfosforilación en la síntesis de la membrana celular y es eficiente de manera *in vitro*. Hay poca información sobre la dosis más eficaz de este medicamento. Tiene efectos secundarios limitados incluyendo alteraciones gastrointestinales. En la dosificación oral prolongada podría aparecer nefrotoxicidad, no obstante, se considera que debe estudiarse más su actividad antes de que pueda obtener una amplia aceptación como agente antigiárdico (Vivancos *et al., 2018*).

Por su parte, las citocalasinas B y D, también tienen actividad giardiacida, las cuales interactúan con el citoesqueleto de actina del trofozoíto, causan fragmentación del disco adhesivo, alargamiento vacuolar afectaciones flagelares, inhibición de la citocinesis y ondulaciones membranales (Correa *et al.*, 2006), también el aceite de girasol ozonizado (Oleozon) muestra una actividad citotóxica en trofozoítos de *G. duodenalis* cultivados *in vitro*, pues produce inactivación de estos, aunque dicha inactivación es dependiente de la dosis y de la densidad trofozoítica (Hernández *et al.*, 2009). Por otra parte, el Orlistat, un medicamento aprobado para tratar la obesidad fue reportado en el 2013 por Hahn y colaboradores como un potente giardiacida contra *G. duodenalis in vitro* a bajas concentraciones, al inhibir el crecimiento del parásito con una efectividad mayor a la del metronidazol, además condujo a alteraciones morfológicas en la membrana del parásito.

Todo esto mediante regímenes de tratamiento aprobados para la obesidad (Hahn *et al.,* 2013). También se ha comprobado la actividad antigiárdica del robenidino, una clase de aminoguanidina, la cual es capaz de causar daño membranal en los trofozoítos, esto evaluado en exámenes *in vitro* (Abraham *et al.,* 2019). También las bacteriocinas han atraído la atención como compuestos antimicrobianos potenciales; estas son una familia diversa de proteínas sintetizadas ribosómicamente, producidas por bacterias probióticas, las cuales han demostraron eficacia tanto *in vivo* como *in vitro* al causar una reducción de la densidad poblacional del parásito, afectar la membrana celular, el disco adhesivo y los componentes citoplasmáticos del trofozoíto, así como una disminución de la patología intestinal causada por el parásito en animales experimentales (Amer *et al.,* 2014).

En un estudio llevado a cabo por Soria-Arteche y colaboradores en el 2013 y Matadamas-Martínez y colaboradores en el 2016, compuestos híbridos basados en nitazoxanida y N-metilbencimidazol presentan una notable actividad antigiárdiasica (Soria-Arteche et al., 2013; Matadamas-Martínez et al., 2016). En otro estudio, se probaron *in vitro* nuevos híbridos de benzimidazoles con pentamidina, encontrándose una mejor actividad antigiárdiasica que el uso de pentamidina o metronidazol por sí solos (Torres-Gomez et al., 2008). Otro fármaco, el disulfiram, ha mostrado resultados alentadores en el tratamiento de la giardiasis en ratones al inhibir la enzima carbamato cinasa, lo cual lo convierte en un candidato prometedor en el tratamiento de este parásito (Galkin et al., 2014). Otro candidato es el inhibidor de la cisteína proteinasa de Giardia, E-64, en trofozoítos, el cual ha podido inhibir las tasas de crecimiento, adherencia y viabilidad en más del 50% (Carvalho et al., 2014). Por otra parte, un informe experimental in vivo e in vitro mostró la eliminación del parásito del intestino y la mejora de las alteraciones intestinales después de la administración oral de miltefosina (un agente antileishmanial), revelando que este fármaco es capaz de actuar a nivel de la membrana celular y del disco ventral produciendo alteraciones morfológicas (Eissa et al., 2012). Otra investigación encontró que el omeprazol, destinado al tratamiento de enfermedades estomacales de acidosis (úlceras, gastritis), es funcional contra la giardiasis, provocando la inactivación de la enzima triosafosfato isomerasa del parásito de manera dosisdependiente, sin afectar a la misma enzima presente en el ser humano (Reyes-Vivas *et al.,* 2014).

Las plantas medicinales han sido desde tiempos antiguos un método para el tratamiento de las parasitosis. Estudios como el de Birdi y colaboradores en el 2011 demostraron que los extractos acuosos a partir de las hojas de Psidium guajava tienen una actividad antigiárdiasica in vitro, pudiendo ser eficaces en el tratamiento de la giardiasis, específicamente contra G. duodenalis (Birdi et al., 2011). Del mismo modo, el kaempferol un compuesto obtenido de la raíz de Cuphea pinetorum, la cual ha sido empleada en la medicina tradicional para tratar la diarrea, presenta actividad antigiárdiasica (Calzada, 2005). También el uso de triterpenoides aislados de la corteza de la raíz de Hippocratea excelsa podría conducir a una actividad moderada a débil contra G. duodenalis (Mena-Rejón et al., 2007). Los extractos de la fruta de Sambucus ebulus y Terminalia ferdinandiana poseen actividad como inhibidores trofozoitarios de G. duodenalis (Rahimi-Esboei et al., 2013; Rayan et al., 2015). En un estudio in vivo, llevado a cabo por Mahmoud y col. en el 2014, se detectó que el jengibre y la canela fueron responsables de lesión estructural de los trofozoítos y mejoría del daño de la mucosa intestinal en ratas producido por la infección con G. duodenalis, y este efecto es mayor al exponer los animales experimentales al extracto de canela (Mahmoud et al., 2014). Por otra parte, el extracto de Mentha piperita también actúa sobre los trofozoítos de G. duodenalis, al provocar alteraciones en la superficie de la membrana plasmática e inhibición de la adhesión del parásito al intestino, sin mostrar efectos tóxicos sobre la línea intestinal empleada (Vidal et al., 2007). También se reportó la eficacia contra G. duodenalis de la fracción diclorometanóica obtenida de las hojas de Hovenia dulcis en ausencia de efectos citotóxicos en las líneas celulares empleadas (Gadelha et al., 2005).

Algunos estudios han hecho referencia a la posibilidad de desarrollar una vacuna contra *Giardia spp*, mediante el uso de trofozoítos mutados que expresan todo el repertorio de VSPs (Rivero *et al.*, 2010; Serradell *et al.*, 2016, 2018), o el empleo de otros antígenos de superficie como α -giardinas y CWP2 (Jenikova *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2016; Davids *et al.*, 2019). Estas inmunizaciones han logrado despertar en diversos

grupos animales una respuesta inmune (Faubert, 2000; Rivero *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2016; Davids *et al.*, 2019; Serradell *et al.*, 2018, 2019), capaz de disminuir la carga parasitaria en una segunda infección con el parásito (Faubert, 2000; Rivero *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2016; Serradell *et al.*, 2016, 2018; Davids *et al.*, 2019). Aunque el empleo de la inmunización con los antígenos de *Giardia* ha dado buenos resultados en animales ante una segunda infección con el parásito, hasta el momento no se ha probado en humanos.

1.8 Morfología de G. intestinalis

1.8.1 Quiste

Producto del proceso de enquistamiento se genera un quiste, el cual es considerado la forma infectante del parásito (Adam, 2001). Los quistes son expulsados a través de las heces de individuos infectados y se ha reportado que son capaces de permanecer viables por varias semanas a temperatura ambiente (Cernikova *et al.*, 2018). Después de la excreción, son capaces de infectar inmediatamente a un nuevo hospedero que lo ingiera, por lo que no requieren una maduración en el medio exterior (Plutzer *et al.*, 2010), siendo responsable del inicio de un nuevo ciclo infeccioso (Cernikova *et al.*, 2018). El quiste tiene una forma oval, mide aproximadamente 8-12 mm de largo y 7-10 mm de ancho (Benchimol *et al.*, 2011). Contiene en su interior dos trofozoítos que culminaron la cariocinesis, pero no la citocinesis, por lo que se caracteriza por presentar cuatro núcleos, además de otras estructuras como cuerpos basales, axonemas, flagelos contraídos y fragmentos del disco ventral (Fig. 4) (Adam, 2001; Benchimol *et al.*, 2011). Presenta una actividad metabólica baja, que corresponde al 10 - 20% de la encontrada en los trofozoítos (Adam, 2001; Lauwaet *et al.*, 2007a).



Figura 4. A) Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de un quiste de *G. intestinalis*. B) Diagrama de un quiste de *Giardia*. F: Flagelo, DF: Disco ventral fragmentado, Ax: Axonema de flagelos, N: Núcleo, V: vesícula, EP: Espacio peritrófico, PQ: Pared del quiste. Barra: 500 nm (Benchimol *et al.*, 2011).

El quiste se encuentra recubierto por una capa con grosor de 0.3 - 0.5 µm, la cual está formada por una capa o pared externa y una interna que a su vez, está constituida por dos membranas: la membrana exterior e interior; esta última constituye la membrana del trofozoíto (Erlandsen et al., 1989). Las dos membranas que componen la capa interna están separadas por un espacio peritrófico (Fig. 4B), el cual se forma producto de la migración de vacuolas a la periferia celular durante el enguistamiento y su crecimiento para formar dicho espacio (Chávez-Munguía et al., 2004). Posteriormente, la fractura de estas vacuolas pudiera conllevar a la formación de ambas membranas (Chávez-Munguía et al., 2004). La capa externa se ha visto que está conformada por el carbohidrato complejo N-acetilgalactosamina y varias proteínas (Chiu et al., 2010; Eligio-García et al., 2011) llamadas proteínas de la pared del quiste 1, 2 y 3 (CWPs 1, 2 y 3), ricas en repeticiones de leucina y la presencia de abundantes cisteínas en la región C-terminal (Carranza et al., 2010; Benchimol et al., 2011), proteínas quísticas invariables con alto contenido de cisteína (HCNCp) (Davids et al., 2006), y proteínas quísticas similares al factor de crecimiento epidermal (EGFCP1), ambas ricas en cisteína (Chiu et al., 2010). La N-acetilgalactosamina forma una red empaguetada de filamentos (Fig. 5) (Erlandsen et al., 1989; Chatterjee et al., 2010), a los cuales se unen en forma de complejo las CWPs (Fig. 5 C) (Chatterjee et al., 2010), teniendo una mayor unión las CWP1, seguido de CWP2 y CWP3 (Chatterjee *et al.,* 2010). Aunque se considera que la capa externa del quiste es impermeable, se ha visto que algunas moléculas logran penetrar esta barrera, a diferencia de la capa interna, la cual es totalmente impermeable (Chávez-Munguía *et al.,* 2004).



Figura 5. A) Microscopía electrónica de barrido de bajo voltaje (LVSEM)de un quiste de *G. intestinalis*. Se aprecia la estructura filamentosa de la pared externa del quiste, así como arreglos espirales que pueden adoptar estos filamentos (*). Barra: 0,5 µm. B) Amplificación de una sección de A). Barra: 1 µm. C) Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de una sección delgada de un quiste, teñido con rojo rutenio. Se puede apreciar la delgadez de la pared externa (flecha de doble punta, la flecha mide 0.4 µm de largo) y fibras de NAcGal recubiertas con los complejos protéicos (flechas) formados por CWPs. Barra: 100 nm (Erlandsen *et al.,*

1.8.2 Enquistamiento

La enquistación es el proceso en el que se forma un quiste maduro a partir de un trofozoíto. Las condiciones como la alcalinidad del medio (Adam, 2001), la escasez de colesterol (Carranza *et al.,* 2010) y la exposición a las secreciones biliares (las sales biliares son capaces de formar micelas con el colesterol inhibiendo su internalización por parte del trofozoíto) (Erlandsen *et al.,* 1996; Carranza *et al.,* 2010) conllevan a la inducción de la enquistación. Aunque se ha visto que los niveles de colesterol en el trofozoíto aumentan al inicio del enquistamiento (Mendez *et al.,* 2013), son solo necesarios para

cumplimentars el proceso (De Chatterjee *et al.,* 2015). También se ha propuesto que una escasez de nutrientes debido a una sobrepoblación en el intestino es un factor detonante (Pham *et al.*, 2017).

Se considera que el proceso de enquistamiento in vitro dura aproximadamente 16 h (Erlandsen et al., 1996), aunque es probable que pudiera ser diferente al tiempo in vivo (Midlej et al., 2009). Se han establecido dos fases, la fase temprana y la fase tardía. La primera consiste en la síntesis intracelular y el transporte de los componentes de la pared del quiste (Adam, 2001), fenómeno que dura aproximadamente 10 h (Erlandsen et al., 1996). En esta fase se comienzan a expresar los genes que codifican para las proteínas de la pared del quiste, que hasta este momento se encontraban inactivados en el trofozoíto (Adam, 2001; Einarsson et al., 2016). A medida que se generan las proteínas, se trasladan hacia el retículo endoplasmático (Argüello-García et al., 2009b). También se forman las vesículas de enquistamiento (ESVs), las cuales van a conducir a estas proteínas desde su sitio inicial de deposición en el retículo endoplasmático hacia la periferia del trofozoíto (Midlej et al., 2009; Bittencourt-Silvestre et al., 2010; Eligio-García et al., 2011; Cernikova et al., 2018). La NAcGal también se sintetiza en esta fase temprana (Argüello-García et al., 2009b). Se transportan, en pequeñas vesículas, diferentes a las ESVs, denominadas vesículas de carbohidratos de enquistamiento (ECVs) (Chatterjee et al., 2010, Midlej et al., 2009).

La fase tardía se caracteriza por el ensamblaje de la pared del quiste a partir de los componentes sintetizados y posicionados en la superficie celular durante la fase temprana. Lo anterior puede verse como deposiciones fibrilares en la superficie del parásito mediante microscopía electrónica de barrido (Fig. 6 D) (Midlej *et al.*, 2009). Durante todo este proceso el parásito cambia de la morfología periforme a ovoide, mediante el agrandamiento del reborde del trofozoíto, englobando el interior del parásito y la generación de una concavidad en la región ventral (Fig. 6 B-E) (Midlej *et al.*, 2009). A medida que avanzan los cambios morfológicos, se comienzan a retener los flagelos dentro del quiste en formación (Fig. 6). Los últimos en internalizarse son los flagelos caudales, pudiéndose apreciar en los momentos finales de la maduración del quiste, una

cola formada por estos dos flagelos (Fig. 17 G) (Erlandsen *et al.*, 1996; Midlej *et al.*, 2009). Según plantean Midlej y col., durante la enquistación o enquistamiento, y en el quiste maduro, los flagelos son mantenidos en vacuolas y pueden tener cierto movimiento (Midlej *et al.*, 2009). Por otra parte, el disco ventral comienza a abrirse desde la fase temprana de la enquistación y el parásito pierde la capacidad de adhesión (Palm *et al.*, 2005; Midlej *et al.*, 2009). Una vez formado el quiste, se puede observar esta estructura completamente fragmentada (Palm *et al.*, 2005; Midlej *et al.*, 2009). Durante el enquistamiento, los niveles de RNAm de los genes que codifican las proteínas del disco se regulan negativamente (Palm *et al.*, 2005; Jenkins *et al.*, 2012). También los mitosomas van a llevar a cabo divisiones, para dar lugar a un número mayor de estas estructuras en el quiste maduro (Voleman *et al.*, 2017), observándose una disminución del contenido de chaperonas en su interior (Midlej *et al.*, 2016). Finalmente, se cierra el opérculo que se genera durante el redondeo de la célula (Fig. 6 F y H) (Midlej *et al.*, 2009). El quiste completa su maduración con el desarrollo del espacio peritrófico y la adquisición de 4 núcleos, un proceso que requiere menos de 2 horas (Erlandsen *et al.*, 1996).

Durante todo el proceso de enquistamiento existe variabilidad en cuanto a la expresión de diversos genes, existiendo represión o sobreexpresión en determinados momentos (Cernikova *et al.*, 2018). Como se mencionó, los genes que codifican proteínas de la pared del quiste comienzan a sobrexpresarse desde la fase temprana, como *cwp2*, considerado un marcador de la enquistamiento (Eligio-García *et al.*, 2011), así como las enzimas que intervienen en la síntesis de NAcGal (Eligio-García *et al.*, 2011). También se regulan una gran cantidad de proteínas que intervienen en diversas funciones. Se sobrexpresan proteínas no plegadas, de unión a cofactores, de unión a nucleótidos, ATPasas, VSP/Furin *like*, EGF-*like* y EGF-*like*/laminina (Lauwaet *et al.*, 2007a; Morf *et al.*, 2010; Faso *et al.*, 2013; Emery *et al.*, 2015; Einarsson *et al.*, 2016). Posteriormente, la expresión de algunas de las proteínas anteriores disminuye hasta alcanzar un estado basal (Faso *et al.*, 2013). Por otra parte, desde el inicio se regulan negativamente otras como componentes del citoesqueleto, algunas histonas, proteínas integrales de membrana, proteínas que intervienen en la traducción y algunas de actividad catabólica

(Faso *et al.*, 2013; Emery *et al.*, 2015; Einarsson *et al.*, 2016). También las VSPs cambian su expresión durante el enquistamiento, mostrando un enlace entre enquistamiento y la variación antigénica de la superficie del parásito. (Emery *et al.*, 2015; Einarsson *et al.*, 2016).



Figura 6. Microscopía electrónica de barrido de trofozoítos de *G. intestinalis* en enquistamiento. Se puede observar cómo el alargamiento del reborde del trofozoíto y la concavidad adquirida en la región ventral (B-E) conlleva a un cambio en la morfología aplanada (A). La presencia de una cola es indicador de que el quiste aun esta en proceso de maduración (G). Finalmente, el cierre del opérculo (F y H) indica que se ha formado el quiste en su totalidad. Véase también la deposición del material fibrilar en la superficie del trofozoíto en enquistación (D), lo cual corresponde a la formación de la pared externa del quiste. Barras: 1 µm (Midlej *et al.*, 2009).

La regulación negativa o positiva de genes de *G. intestinalis* durante el enquistamiento está influenciada tanto por factores epigenéticos como desacetilasas de histonas, metiltransferasas de histonas, acetiltransferasas de histonas y la helicasa remodeladora de cromatina SNF2, los cuales cambian sus niveles de expresión durante este evento (Carranza *et al.,* 2016; Einarsson *et al.,* 2016; Salusso *et al.,* 2017), como por la sobreexpresión de varios factores de transcripción (Huang *et al.,* 2021). Uno de los más

estudiados ha sido Myb2, el cual se une específicamente a la secuencia C(T/A)ACAG río arriba del sitio Inr del promotor de los genes *cwp1-3*, de sí mismo (*myb2*) y del gen que codifica para la enzima G6PI-B, la primera en la ruta biosintética de NAcGal (Sun et al., 2002; Huang et al., 2008), actuando como un transactivador de estos genes (Sun et al., 2002; Huang et al., 2008), potenciando la generación de guistes (Huang et al., 2008). Otros factores de transcripción también contribuyen a la sobreexpresión de las proteínas de la pared del quiste. MBF1, PAX1 y PAX2 (Wang et al., 2010; Chuang et al., 2012; Huang et al., 2021) se unen a la región rica en AT del iniciador de los promotores de cwp1-3 y myb2 (Wang et al., 2010; Huang et al., 2021). Además, MBF1 interactúa con E2F1, Pax2, WRKY y Myb2 (Huang et al., 2021). ARID1 se une a esta región, pero su efecto transactivador solo se ha visto con cwp1 (Wang et al., 2007). También la topoisomerasa I de G. Intestinalis TOP3β se une a los promotores de cwp1-3, cuando la cadena de DNA está en forma simple, aumentando los niveles de mRNA de estas proteínas y también de Myb2 (Sun et al., 2020). El factor de leucemia mieloide (MLF) de este parásito parece influenciar en la generación de quistes, pues su sobrexpresión resulta en un incremento de CWP1 y MYB2, al igual que en un aumento de los mRNAs de *cwp1-3* y *myb2* (Lin *et al.*, 2019). E2F1 aumenta en la enquistación, principalmente en la fase tardía. Se puede unir al promotor de timidina cinasa, *cwp1-3*, *myb2* y a su propio promotor, actuando como transactivador en una región río arriba del sitio de iniciación (Su et al., 2011). De igual modo regula a más de 60 genes (Su et al., 2011). Por otra parte, se encuentra WRKY, el cual se une a los promotores de cwp1-3, myb2 y wrky, promoviendo su expresión (Pan et al., 2009). GLP1/2 actúa como factor de transcripción en el gen cwp1 (Sun et al., 2006). La enzima arginina desiminasa (ADI) es uno de los factores que inhiben la producción de las proteínas de la pared del quiste, una vez que esta estructura está completamente formada. Durante el enquistamiento se traslada al núcleo donde actúa como peptidil arginina desiminasa (PAD), induciendo la regulación negativa de los genes cwp, en el momento que ya la pared externa del guiste está formada, mediante un mecanismo desconocido (Vranych et al., 2014). También se ha visto que PI3K, tirosinas cinasas y el citoesqueleto de actina son importantes en el proceso de enquistamiento, tanto al inicio como en la regulación del proceso en general (Castillo-Romero et al., 2009; Bittencourt-Silvestre et al., 2010).

1.8.2.1. ESVs

Se plantea que las ESVs se originan en membranas especializadas del retículo endoplasmático, las membranas perinucleares del retículo endoplasmático (PNM) y los sitios de salida del retículo endoplasmático (ERES) (Touz *et al.*, 2017). La biogénesis puede ser a partir de la generación de varias vesículas ESVs inmaduras cubiertas con COPII en estos sitios de salida del retículo endoplasmático y su fusión para formar una ESV madura (Fig. 7) (Marti *et al.*, 2003). O a partir de cisternas agrandadas del retículo endoplasmático (Fig. 7) (Lanfredi-Rangel *et al.*, 2003).

Se cree que la forma de las ESVs cambia de irregular a esférica a medida que avanza la maduración de la carga (Stefanic *et al.*, 2006). Esta maduración implica un reclutamiento temprano de proteínas de la matriz periférica en las membranas de ESVs inmaduras, incluida la β'COP, un ortólogo de la proteína que interactúa con Ypt1p del transportador de GTPasa de levadura (YiP), Rab11, la proteína similar a la dinamina (DLP), y un reclutamiento tardío de otros como la cadena pesada de clatrina (CLH). Estas dos últimas son las más abundantes en las ESVs (Argüello-García *et al* 2009b). También se verifica el plegamiento correcto de las proteínas que trasladan las ESVs inmaduras. De encontrase proteínas mal plegadas, estas vesículas inmaduras son recubiertas por COP I y retornadas al retículo, donde ocurre el procesamiento por chaperonas (Fig. 7) (Marti *et al.*, 2003).



Figura 7. Diagrama de las posibles vías de tráfico de proteínas de la pared del quiste (CWPs). 1) Las CWPs se trasladan en pequeñas vesículas de enquistamiento (ESVs) inmaduras cubiertas de COPII desde los ERES del retículo endoplasmático (ER), para fusionarse dando lugar a una ESVs maduras. 2) Las ESVs se originan a partir de cisternas alargadas del ER. 3) Las vesículas inmaduras con determinadas afectaciones (ej: presencia de proteínas mal plegadas en su interior) pueden retroceder al ER, en un proceso dependiente de su recubrimiento con COPI. La deposición del contenido de las ESVs sobre la membrana plasmática puede ocurrir 4) mediante el transporte hacia las vesículas periféricas (PVs) lugar donde se ha visto que ocurre un procesamiento de CWP2, 5) la fusión de las ESVs con la membrana plasmática o 6) la fragmentación de las ESVs maduras en la periferia, y la exocitosis del contenido tras la fusión de las ESVs fragmentadas con la membrana plasmática. N: núcleo (Hehl *et al.*, 2004).

Las ESVs maduras pueden fusionarse directamente con la membrana plasmática del parásito, descargando su contenido (Fig. 7) (Hehl *et al.*, 2004). También pudieran fragmentarse en varias vesículas secretorias para fusionarse con la membrana plasmática y descargar su contenido (Fig. 7) (Marti *et al.*, 2003) o pudiesen fusionarse con las vesículas periféricas, lugar donde, al parecer, ocurre un procesamiento proteolítico de CWP2, y posteriormente una fusión con la membrana plasmática y la liberación del contenido (Fig. 7) (Lujan *et al.*, 2003). Varias proteínas parecen inducir o estar involucradas en la formación de las ESVs, tal es el caso de CWP1 (Ebneter *et al.*, 2016), CWP2 (Gottig *et al.*, 2006), TOP3β (Sung *et al.*, 2019) y la enzima gGlcT1, la cual permite la formación de ESVs más grandes (Mendez *et al.*, 2013). Rac contribuye a la maduración de estas vesículas y a la secreción de CWPs (Krtková *et al.*, 2016). También el colesterol internalizado al inicio del enquistamiento es necesario para la biogénesis de

estas vesículas y para la generación de quistes (De Chatterjee *et al.,* 2015). Una vez maduro, el quiste es expulsado en las heces del hospedero, siendo capaz de resistir las condiciones del medio exterior para infectar a otro individuo o animal que lo ingiera (Benchimol *et al.,* 2011).

1.8.3 Desenquistamiento

Una vez que el quiste es ingerido, su llegada al estómago desencadena el proceso de desenquistamiento, gracias a la acidez y la presencia de péptidos (Davids et al., 2011; Cernikova et al., 2018). Esta transformación del parásito no está del todo entendida a nivel celular y molecular (Benchimol et al., 2011). Según Erlandsen y col. (1996), es un proceso que, in vitro, ocurre en menos de 30 min. El medio ácido del estómago actúa fragilizando la pared externa del trofozoíto, para que una vez alcanzado el duodeno intestinal culmine el proceso de desenquistamiento (Allain et al., 2017). En el duodeno, las cisteína proteinasas del parásito facilitan la salida del exquizoíto tetranucleado del interior del quiste (Slavin et al., 2002; Rascón et al., 2013). Al parecer, las paredes del quiste se vuelven más suaves y deformables, y las proteinasas degradan las proteínas del quiste, mientras que las glicohidrolasas degradan las fibrillas de NAcGal (Chatterjee et al., 2010). Las proteasas se han localizado en vesículas dentro del quiste, las cuales liberan su contenido previo al desenquistamiento en el espacio periplásmico (Benchimol et al., 2011). Durante este proceso, los flagelos se dirigen hacia la región posterior del quiste y sobresalen a través de una apertura en la pared del quiste, permitiendo que el exquizoíto salga a través de esta abertura (Fig. 8) (McInally et al., 2016). Se ha propuesto que los flagelos pudieran tener un rol en la apertura del quiste (Bingham et al., 1979). Por otra parte, la región del opérculo pudiera ser estructuralmente más débil que el resto del quiste, favoreciendo el desenquistamiento en esta región (Benchimol et al., 2011). Una vez fuera, se pueden ver dos discos ventrales en el exquizoíto, formados a partir del reensamblaje de los fragmentos almacenados (Palm et al., 2005). El exquizoíto lleva a cabo dos divisiones celulares consecutivas para producir cuatro trofozoítos binucleados. Se considera que la división del exquizoíto, una vez liberado, es dependiente de eventos de fosforilación mediados por serina/treonina cinasas (Lauwaet *et al.,* 2007b; Alvarado *et al.,* 2010). La primera división sólo involucra citocinesis, pues la cariocinesis ya ocurrió durante el enquistamiento; la segunda presenta cariocinesis seguida de una citocinesis (McInally *et al.,* 2016).



Figura 8. Desenquistamiento de G. intestinalis. Barra: 1 µm (Benchimol et al., 2011).

Varias enzimas intervienen como reguladoras del proceso de desenquistamiento. Se ha visto que la señalización de la proteína cinasa A activa el desenquistamiento (Reiner *et al.*, 2003) y que al afectarse, se inhibe este proceso (Abel *et al.*, 2001). También la enolasa parece estar involucrada en el desenquistamiento, al afectarse este proceso en presencia de la enzima mutada o con deleción de determinados residuos (Castillo-Romero *et al.*, 2012). Se ha visto que una fosfatasa que actúa sobre CWP1 y 2 contribuye en el proceso de desenquistamiento al defosforilar estas dos proteínas y así exponerlas a las proteasas del parásito y del hospedero (Slavin *et al.*, 2002), mientras que la señalización por calcio es requerida posteriormente para la activación del exquizoíto (Reiner *et al.*, 2003).

1.8.4 Trofozoítos

El trofozoíto de *G. intestinalis* tiene un cuerpo característico en forma de pera con 12-15 mm de largo y 5-9 m de ancho y 1-2 mm de espesor. Posee dos núcleos con su respectiva envoltura nuclear, ubicados anteriormente y de manera simétrica con respecto a la línea longitudinal del cuerpo (Fig. 9), y varias estructuras citoesqueléticas compuestas principalmente de microtúbulos: cuatro pares de flagelos, el cuerpo medio, el funis y el disco ventral (Fig. 9) (Carranza *et al.*, 2010; Benchimol *et al.*, 2011). Estas estructuras son importantes para la fijación, el desplazamiento de los trofozoítos y son el blanco de algunos fármacos utilizados para tratar la infección. Otras estructuras incluyen las vesículas periféricas (Fig. 9), ribosomas, lisosomas y gránulos de glucógeno esparcidos en todo el citoplasma (Carranza *et al.*, 2010; Benchimol *et al.*, 2011). Presenta un retículo endoplasmático alrededor de los núcleos e irradia hacia la periferia celular. Carece de aparato de Golgi y de otros orgánelos eucariontes "típicos", como peroxisomas y mitocondriales: los mitosomas, los cuales se ubican en todo el citoplasma (Tovar *et al.*, 2003; Carranza *et al.*, 2010; Benchimol *et al.*, 2011).



Figura 9. Diagrama donde se observan las diferentes estructuras celulares en un trofozoíto de *G. duodenalis*. (N) Núcleo, (PV) Vesículas periféricas, (MB) Cuerpo medio, (D) Disco ventral, (AF) Flagelos anteriores, (F) Funis, (LF) Flagelos laterales, (VF) · Flagelos ventrales y (CF) Flagelos caudales. (Benchimol *et al.*, 2011).

El citoesqueleto de *G. intestinalis* se caracteriza por una abundancia de estructuras microtubulares (MTs), presencia de filamentos cortos de actina (ACT) (Paredez *et al.,*

2011) y una ausencia de filamentos intermedios (Adam, 2001). Dentro del genoma de G. *intestinalis* existen dos genes diferenciales para α tubulina y tres para β tubulina (Campanati et al., 2003). En un estudio se encontró que anticuerpos dirigidos contra tubulina de diferentes eucariontes son capaces de detectar la tubulina de G. intestinalis, mostrando que este parásito presenta similitud con otros eucariontes. Al parecer la estructura microtubular se presenta compuesta de diferente manera en varias regiones, al observarse patrones diferentes de detección con los diferentes anticuerpos usados (Campanati et al., 2003) y efecto diferente al usar albendazol y evaluar la desestabilización microtubular (Huang et al., 2006). La tubulina de G. intestinalis puede sufrir modificaciones postraduccionales como poliglisilación, poliglutamilación, fosforilación y tirosinación/destirosinación involucrando el residuo tirosina terminal (Elmendorf et al., 2003). Además, la lisina en la posición 40 está conservada y puede ser acetilada. La poliglisilación es la modificación dominante y comprende el 40% de la tubulina α modificada (Elmendorf *et al.*, 2003).

Los microtúbulos son la estructuras citoesqueléticas más abundantes de Giardia, presentes en los flagelos, el disco ventral, el funis y el cuerpo medio (Fig. 10) (Elmendorf et al., 2003), por lo que esta fracción del citoesqueleto está participando en procesos de adhesión, división celular, motilidad, enquistación y desenquistación, funciones celulares mediadas por estas estructuras, además de estar involucrados directamente en la morfología, la división de los cromosomas y presuntamente en el tráfico vesicular (Dawson et al., 2011). Los MTs de los flagelos están en el típico arreglo 9+2 de los flagelos eucariontes (Figs. 13 y 14) (Elmendorf et al., 2003). Los del disco están compuestos por 13 protofilamentos asociados a la membrana ventral (Figs. 10 y 18) (Kattenbach et al., 1996). Por su parte los MTs que forman parte del cuerpo medio se encuentran estrechamente empaquetados, y se presume que sean incorporados eventualmente al disco ventral, considerándose el cuerpo medio un centro de almacenamiento de microtúbulos (Dawson et al., 2011). En cuanto a las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), en la literatura sólo se ha hecho referencia a un gen que codifica para MAP215/Dis1 (Gard et al., 2004) y no se ha reportado la presencia de otras MAPs canónicas de eucariotes. No obstante, con los microtúbulos del disco ventral interactúan varias proteínas que se asocian a la región interna de esta estructura, así como las microcintas (Figs. 16 y 18), las cuales no están caracterizadas (Schwartz *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2016 Nosala *et al.*, 2020). Varias de estas proteínas que pueden interactuar con MTs carecen de homología a las MAPs canónicas (Morrison *et al.*, 2007). Los roles celulares de estas nuevas MAPs en modular la dinámica microtubular aún están por descubrirse (Nosala *et al.*, 2015). Por otra parte, sí se ha evidenciado la presencia de las proteínas motoras cinesina y dineína (Elmendorf et al., 2003). La cinesina 1 está involucrada en el transporte vesicular; las cinesinas 2 y 13 participan en el mecanismo de construcción del flagelo (Fig. 13) y la cinesina 3, la cual tiene un rol en el mantenimiento de la longitud del huso mitótico (Elmendorf *et al.*, 2003; Dawson *et al.*, 2011). Ambas proteínas motoras no se han reportado en el disco ventral (Dawson, 2010). Las dineínas se han visto solamente involucradas en el flagelo (Fig. 13) (Elmendorf *et al.*, 2003).





Figura 10. Organización del citoesqueleto de *G. intestinalis*. A) Microscopía de inmunofluorescencia donde se observa la distribución de actina (verde), tubulina (rojo) y el DNA (azul). B) Diagrama de un trofozoíto de *G. intestinalis* con las regiones asociadas a cada estructura citoesqueléticas marcada de acuerdo con lo obtenido en A. Los colores en B presentan el mismo significado descrito en A (Paredez *et al.*, 2014).

La actina en Giardia se presenta formando microfilamentos, los cuales son menos abundantes que los microtúbulos (Elmendorf et al., 2003). En *G. intestinalis* sólo existe un gen que codifica actina, el cual presenta aproximadamente un 69% de identidad al compararlo con el de otros eucariontes (www.ncbi.nlm.nih.gov). La actina se ha detectado en la periferia del disco ventral, el cuerpo medio, en la región nuclear, en relación con los brazos de dineína de los flagelos y alrededor de las vesículas de enquistamiento (ESVs) (Fig. 10) (Castillo-Romero *et al.*, 2009; Paredez *et al.*, 2011). Este citoesqueleto interviene en diferentes procesos como la morfología del parásito (Correa *et al.*, 2006; Castillo-Romero *et al.*, 2009), la adhesión (Feely *et al.*, 1982 a y b; Roskens *et al.*, 2002; Correa *et al.*, 2006), el enquistamiento (Castillo-Romero *et al.*, 2009), la endocitosis, específicamente de ceramidas (Hernández *et al.*, 2007), el crecimiento del trofozoíto y la muerte celular (Correa *et al.*, 2006; Castillo-Romero *et al.*, 2006; Castillo-Romero *et al.*, 2009). De manera que el citoesqueleto de actina es una estructura crítica para el desarrollo de funciones vitales en este microorganismo.

Las funciones del citoesqueleto de actina son llevadas a cabo aún en ausencia de la mayoría de las proteínas canónicas asociadas a actina (ABPs), entre ellas la miosina (Elmendorf *et al.*, 2003; Paredez *et al.*, 2011). Hasta el momento no se ha encontrado presencia de vinculina, tropomiosina (Elmendorf *et al.*, 2003), ARP2/3, cofilina, formina o gelsolina en *Giardia spp* (Paredez *et al.*, 2011). No obstante, se sabe que a la actina se unen varias proteínas no descritas (Paredez *et al.*, 2014; Rojas-Gutiérrez *et al.*, 2021), las cuales pudieran sustituir las funciones de las ABPs canónicas. Este parásito se distinge porque, durante la citocinesis, no se forma el anillo de constricción de actina (Paredez *et al.*, 2011). Otro aspecto interesante es que durante el enquistamiento, la actina, al igual que la tubulina, no se despolimerizan a su forma globular, sino que se rompen en fragmentos largos que quedan almacenados en el citoplasma del quiste para posteriormente reensamblarse durante el desenquistamento (Elmendorf *et al.*, 2003). El mecanismo de fragmentación y reensamblaje es desconocido, aunque al parecer varios motores citoesquéleticos no caracterizados pudieran contribuir a la generación de fuerza mecánica requerida para la reorganización subcelular (Elmendorf et al., 2003).

1..8.4.1.1 Flagelos

Los trofozoítos de Giardia spp presentan cuatro pares de flagelos dispuestos simétricamente, un par en la región anterior del cuerpo o anterolateral, un par en la región ventral, un par en la región posterior o posterolateral y un par en la región caudal (Fig. 9) (Benchimol et al., 2011). Cada flagelo presenta una región citoplasmática y otra que se proyecta fuera del cuerpo celular denominada región asociada a membrana, las cuales constituyen dos de las cinco regiones en que se divide el flagelo de eucariontes y las tres restantes son: el cuerpo basal (zona de nucleación del flagelo), la zona de transición y el poro flagelar (Fig. 11). A diferencia de varios flagelos de eucariotes, en G. intestinalis la zona de transición es una pequeña región próxima a los cuerpos basales, en lugar de toda la región citoplasmática del flagelo (Benchimol et al., 2011). La proporción entre la longitud de la región citoplasmática y la porción ligada a la membrana varía entre cada par flagelar. Por ejemplo, más de dos tercios de la longitud de los axonemas caudales se encuentra en la región citoplasmática, mientras que sólo un tercio del axonema anterior es citoplasmático (Hoeng et al., 2008). En la región donde cada flagelo se proyecta fuera del cuerpo celular existe material electrondenso, el cual está en las proximidades del poro flagelar (Fig. 11 f) (Hoeng et al., 2008).



Figura 11. A. Esquema de las regiones de un flagelo de *G. intestinalis*. B y C. Microscopía electrónica de transmisión de un flagelo de *G. intestinalis*. B. Se pueden ver las diferentes regiones (OD: Dobletes externos de microtúbulos, CP: Par central de microtúbulos, BB: Cuerpo basal, TZ: Zona de transición). C. Transición desde la región citoplasmática a la región asociada a la membrana en el axonema caudal, se puede observar el material electrondenso en la membrana plasmática (pm). D. 50 Microscopía electrónica de barridode un flagelo de *G. intestinalis* (fp: Poro flagelar). Escala: 200 nm (Hoeng *et al.,* 2008).

Los cuatro pares de flagelos están compuestos de microtúbulos, cuya estructura es igual a la de otras células eucariontes, el axonema constituido por un par central de microtúbulos y nueve dobletes concéntricos (9 + 2) (Benchimol *et al.*, 2011), cada uno de los ocho axonemas en *Giardia* tiene una organización fija con estructuras radiales que se extienden a la periferia, y otra móvil por el deslisamiento de los brazos de dineína (Benchimol *et al.*, 2011). Cada flagelo se construye a partir de cuerpos basales ubicados en la región anterior del trofozoíto, entre ambos núcleos. Los cuerpos basales de los flagelos anteriores se orientan hacia el extremo anterior de la célula, mientras que los cuerpos basales que nuclean los axonemas ventrales, caudales y posterolaterales se localizan el la parte posterior debajo de los dos cuerpos basales anteriores y están orientados hacia la parte posterior de la célula (Fig. 12) (McInally *et al.*, 2016).



Figura 12. Ubicación de los cuerpos basales y flagelos de *Giardia*. a) Esquema del arreglo de los cuerpos basales y su asociación específica con cada axonema flagelar (A/A': anterior, C/C': caudal, P/P': posterior; V/V': ventral, N: núcleo). b) Micrografía electrónca de transmisión de la región anterior de un trofozoíto de *Giardia*, donde se observa la organización de los cuerpos basales y sus axonemas flagelares asociados (Abb/A'bb: Cuerpo basal anterior, Cbb/C'bb: Cuerpo basal caudal, Pbb: Cuerpo basal posterolateral, AAX: Axonemas anteriores, vd: Disco ventral, CFL: Flagelo caudal. c) Microscopía electrónica de transmisión de *Giardia* donde se muestran los núcleos (N), el disco ventral (D), retículo endoplasmático (ER), las vesículas periféricas (P), los axonemas flagelares (A), flagelos (F) y los mitosomas (M) (Benchimol *et al.*, 2011; McInally *et al.*, 2016).

Los axonemas anteriores cruzan la espiral del disco ventral antes de salir en los lados derecho e izquierdo de la región anterior de la célula (McInally *et al.*, 2016). La distancia desde el punto de salida desde el cuerpo de la célula hasta la punta de los flagelos es de aproximadamente 12 µm. Los dos axonemas caudales salen del cuerpo de la célula y se extienden aproximadamente 7 µm en el extremo posterior; de 8 flagelos, éste es el par más pequeño. Los axonemas ventrales salen y se extienden alrededor de 14 µm en el lado ventral en la región de posterior al disco ventral. Los axonemas posterolaterales se inclinan hacia afuera en el tercio inferior del cuerpo celular, extendiéndose a unos 8 µm del cuerpo celular (McInally *et al.*, 2016).

1.8.4.1.1.1 Mecanismo de construcción del flagelo

Al igual que en muchos otros protozoos flagelados, los axonemas de Giardia se ensamblan generalmente por extensión y alargamiento, en la punta distal, mediante el transporte de las subunidades de tubulina hacia dicho extremo. El transporte intraflagelar (IFT) garantiza la entrega de las subunidades de tubulina desde el cuerpo celular hasta las puntas de los flagelos, a través del movimiento continuo y bidireccional de grandes balsas protéicas (Fig. 13) (Briggs et al., 2004). El complejo heterotrimérico de cinesina 2 a y b impulsa el movimiento anterógrado del complejo IFT (A y B) asociado a tubulina a lo largo del doblete exterior de los axonemas, hacia la punta flagelar (Fig. 13), mientras que el movimiento retrógrado de los complejos IFT hacia el cuerpo celular está mediado por la dineína 1b citoplasmática (Fig. 13). El cambio de transporte anterógrado a retrógrado ocurre en la punta distal. (Dawson, 2010). Durante algún tiempo se pensó que la región del cuerpo basal y la zona de transición pudieran ser el sitio de acoplamiento para la organización de partículas IFT, como sucede en Trypanosoma spp y mamíferos; sin embargo, en la actualidad se conoce que tanto los complejos IFT A y B como los motores de cinesina 2 probablemente se acoplan en porciones citoplasmáticas de los axonemas, y se acumulan en las regiones de poros flagelares (Fig. 13), detectándose también cierta acumulación en los extremos distales del flagelo (Hoeng et al., 2008; McInally et al., 2019), por lo que es posible que los poros flagelares y las regiones de punta distal de los axonemas giardiales representen el comienzo y los puntos finales respectivos de las vías IFT (Hoeng *et al.,* 2008). Si bien las regiones unidas a la membrana se ensamblan utilizando mecanismos mediados por IFT, las regiones citoplasmáticas de cada axonema pueden ensamblarse de una manera independiente de IFT, dado al hecho que estas regiones no se afecta su longitud del axonema al afectar a la cinesina 2 (Hoeng *et al.,* 2008; Carpenter *et al.,* 2009). En estas regiones también se detecta la falta de transporte activo de proteínas IFT (McInally *et al.,* 2019).

Como en otros organismos, el BBSoma, complejo responsable del transporte de vesículas intracelulares hasta la base del flagelo que juega un rol importante en su función giardial, puede estar involucrado en la unión de los IFT A y B, y las proteínas asociadas al complejo B de IFT pueden facilitar el ensamblaje o el acoplamiento en los poros flagelares. Las regiones citoplasmáticas de los axonemas pueden ensamblarse mediante mecanismos independientes de IFT.

En otros organismos flagelados como clamidomonas, la longitud del flagelo es el factor limitante para que continúe la polimerización de éste; sin embargo, en *Giardia spp* la longitud del flagelo es el detonante del proceso de despolimerización en la punta flagelar, sin mediar efecto en el proceso de ensamblaje flagelar. La proteína encargada de la despolimerización es la cinesina 13, la cual está localizada en el extremo distal de cada flagelo (Dawson *et al.,* 2007; Dawson, 2010). En el trabajo desarrollado por McInally y col. (2019) se encontró que la cinesina13 se ubica diferencial y dinámicamente en el extremo de cada par flagelar, en los axonemas caudales más cortos, contienen mayor concentración de esta proteína motora, sin que el proceso de ensamblaje de estos flagelos sea diferente al resto.

Aunque no está del todo esclarecido, la cinesina 13 pudiera ser reclutada hacia el extremo distal de cada flagelo por acción de EB1, una proteína conservada evolutivamente que se une al extremo + de los microtúbulos y que puede modular la dinámica microtubular. En este extremo distal también se encuentra una cinasa aurora

like, la cual puede regular el desensamblaje del axonema a través de su acción regulatoria sobre la cinesina 13 (Dawson *et al.,* 2007; 2010).



Figura 13. Mecanismos putativos de ensamblaje flagelar y mantenimiento, dependientes e independientes de IFT. Homólogos giardiales de IFT, BBSoma o proteínas asociadas al complejo B de IFT están indicadas (Dawson, 2010).

La arquitectura de los flagelos en *Giardia* también se define por la presencia de estructuras que están asociadas a cada par flagelar y por lo tanto, les confieren una identidad estructural única, a la vez que los distinguen. Estas estructuras incluyen la placa marginal, una estructura en forma de bumerán, formada por filamentos que le dan apariencia de red y que se encuentra asociada a los axonemas anteriores (Fig. 14) (Maia-Brigagão *et al.,* 2013). Se plantea que la placa marginal puede ser funcional en la

motilidad y anclaje del parásito a los enterocitos (Maia-Brigagão *et al.*, 2013). Las fibras estriadas asociadas a las regiones citoplasmáticas de los axonemas anteriores son estructuras repetitivas que conectan la placa marginal y los flagelos anteriores (Fig. 14). Estas fibras se consideran elementos flexibles, pero de función desconocida. También justo debajo de los flagelos anteriores se ubican unas estructuras denominadas barras densas (Fig. 14) (Maia-Brigagão *et al.*, 2013). Asociado a los axonemas ventrales se encuentran unas estructuras similares a aletas, las cuales se extienden desde esta región, el material electrondenso asociado con los axonemas posterolaterales y los microtúbulos del "complejo caudal" o "funis", que rodean y se extienden desde los axonemas caudales hacia la periferia celular (Fig. 16). Se cree que el funis modula el movimiento de los axonemas caudales, dando como resultado la flexión dorsal/lateral de la cola (Dawson, 2010; Benchimol *et al.*, 2011).





Figura 14. Estructuras asociadas a los axonemas de *Giardia*. Los paneles A y D muestran micrografías electrónicas de transmisión de la placa marginal (MP), varillas densas (DR) y fibras estriadas (flechas) ambas asociadas con los flagelos anteriores (AA) (vd: Disco ventral, cbb: cuerpo basal caudal, abb: cuerpo basal anterior, fp: poro flagelar). En B, se muestra que los cuerpos basales del axonema caudal (cbb) nuclean las dos matrices espirales del disco ventral (B). Estructuras densas de electrones, es decir, "aletas" (flechas negras) asociadas con las porciones unidas a la membrana de los flagelos ventrales (C). En el panel E, los microtúbulos y las fibras de los funis (fn) se muestran irradiando desde los axonemas caudales hacia la periferia celular (vfl = flagelos ventrales) (N: Núcleo, mb: Cuerpo medio) (Dawson., 2010; Maia-Brigagão *et al.*, 2013).

1.8.4.1.1.2 Motilidad flagelar y nado

Durante el proceso natatorio de *G. intestinalis*, cada par flagelar se comporta de manera diferente (Benchimol *et al.*, 2011). No todos los pares flagelares tienen formas de onda flagelar característica, como las observadas en otros flagelos eucariónticos (Lenaghan *et al.*, 2011). Sin embargo, el movimiento coordinado y diferencial de los ocho flagelos móviles da como resultado movimientos complejos que son esenciales para el nado, la división celular y posiblemente el anclaje (esto último asociado al par ventral) del parásito (Ghosh *et al.*, 2001; Dawson, 2010).

Según Campanati y col. (2002), en G. intestinalis existen dos tipos de movimientos, los flagelares y los independientes de flagelos. Al parecer, sólo el par flagelar anterior y ventral son capaces de generar ondas mótiles (Campanati et al., 2002), aunque también se ha detectado motilidad en el par posterolateral (Lenaghan et al., 2011). Una cuestión para resaltar es que al estar el par ventral restringido por el surco ventral y a su vez posicionado en el eje longitudinal del cuerpo, su movimiento conlleva a un desplazamiento del trofozoíto hacia adelante (Lenaghan et al., 2011). Por su parte, el movimiento independiente de flagelos hace referencia al movimiento de la región caudal, la cual presenta flexión lateral (derecha e izquierda) y dorsoventral, involucrando 22.5 ± 3.7 µm² del área caudal para dicha flexión (Lenaghan *et al.,* 2011). Al parecer ambos tipos de movimientos no son independientes entre sí, ya que se ha planteado que la flexión de la región caudal ocurre en asociación con el movimiento de los flagelos caudales, ya que al estar estos próximos al funis, la energía y el movimiento generados por los axonemas se transfieren a éste y a su vez, el funis lo transfiere a las zonas de la membrana celular próximas, lo que resulta en la luxación de la región caudal, no debido a la presencia de proteínas contáctiles, como se llegó a pensar en algún momento (Campanati et al., 2002; Carvalho et al., 2004; Lenaghan et al., 2011).

Aunque tanto los movimientos flagelares como caudales, pueden ejecutarse en un trofozoíto de libre nado o en un trofozoíto anclado a su sustrato, llevando el cambio de la dirección natatoria y desprendimiento del sustrato, respectivamente (Campanati et al.,

2002; Carvalho *et al.,* 2004), la fuerza de propulsión de los flagelos activos es insignificante en comparación con la fuerza propulsora que ejerce la región caudal (Lenaghan *et al.,* 2011).

1.8.4.1.2 Cuerpo medio

El cuerpo medio es una estructura formada principalmente por microtúbulos. Se encuentra ubicado transversalmente al eje mayor de la célula (Fig. 9) (Benchimol et al., 2011) Su función es desconocida, aunque se ha propuesto como almacén de tubulina polimerizada para el ensamblaje del disco ventral (Feely et al., 1990) y de husos extranucleares durante la división celular (Benchimol et al., 2011). Además, se ha propuesto su participación en la flexión vertical de la región caudal del trofozoíto debido a la presencia de proteínas contráctiles (Piva et al., 2004). Se ha usado como herramienta taxonómica para distinguir especies de *Giardia spp*, ya que presentan ligeras variaciones en cuanto a posición y forma (Filice, 1952; McRoberts et al., 1996). Aunque Erlandsen y colaboradores (1987, 1990) plantearon que no debe establecerse como único criterio de especiación. Sus dimensiones son 0.2 - 2 µm de diámetro y 0.8 - 8 µm de largo (Piva et *al.*, 2004). Además de la tubulina, presenta otras proteínas como β -giardinas (Piva *et al.*, 2004), cinesina 13 (Dawson *et al.*, 2007), EB1 (Kim *et al.*, 2008), la anexina E1(Vahrmann et al., 2008) y la ANX21, la cual se asocia con fosfolípidos en presencia de Ca2+ (Szkodowska et al., 2002), la proteína reticulante CLP259 (Rojas-Gutiérrez et al., 2021), la enzima de fosforilación ERK1 (Ellis et al., 2003), una proteína implicada en la agrupación de microtúbulos (Benchimol et al., 2011), y proteínas contráctiles como la centrina, la cual presenta una actividad contráctil sensible a calcio (Correa et al., 2004). Al parecer se enlaza con la membrana plasmática y presenta conexiones con los microtúbulos del disco ventral y funis.

1.8.4.1.3 Funis

El funis es una estructura compuesta por láminas de microtúbulos que se extienden desde la región anterior de los axonemas de los flagelos caudales, cerca de los cuerpos basales, hasta la región caudal del trofozoíto (Fig. 9) (Kulda *et al.*, 1995; Benchimol *et al.*, 2004). Las láminas de microtúbulos asociadas a cada uno de los flagelos caudales se extienden hacia el flagelo posterolateral opuesto, interactuando con las varillas fibrosas (barras densas) de éstos (Fig. 15), formándose un arreglo bien estructurado. Ambos flagelos están unidos por esta estructura (Benchimol *et al.*, 2004, 2011). Se ha planteado que su función es la estabilidad de la región caudal durante el movimiento natatorio del parásito (Benchimol *et al.*, 2004). No se ha obtenido evidencia de la presencia de actina en esta estructura, lo que sugiere que su participación en los movimientos celulares podría deberse a la polimerización/despolimerización de microtúbulos o a la presencia de la proteína contráctil centrina (Correa *et al.*, 2004; Benchimol *et al.*, 2011).



Figura 15. Diagrama de la region ventral de *G. intestinalis*. A) Muestra la célula estática. En verde y violeta se aprecia el funis (Fn) que se extienden a partir de cada flagelo caudal ($C_1 y C_2$) hacia los flagelos posterolaterales ($P_1 y P_2$). Se puede observar que el funis se ancla a las barras densas (en rojo) de los flagelos posterolaterales y a la vez están interconectados por puentes filamentosos (naranja y señalados por una flecha). En la region periférica de la zona caudal, el funis se ancla al epiplasma. DV: Disci ventral, VP: Vesículas periféricas (Benchimol *et al.,* 2004).

1.8.4.1.4 Disco ventral

El disco ventral es una estructura única del género Giardia que es cóncavo y cubre la mitad anterior del lado ventral del trofozoíto (Carranza et al., 2010). Se ha reportado que, entre las diferentes especies dentro del género, la estructura exacta del disco varía, aunque no está claro cuánto de esta variación se debe a los métodos de preservación estructural en diferentes laboratorios (Adam, 2001). La principal función del disco ventral es la de ventosa, ya que el parásito se adhiere a las microvellosidades de las células epiteliales del intestino delgado superior, evadiendo así la peristalsis intestinal y para llevar a cabo sus vida parasitaria (anclaje in vivo) o se adhiere a sustratos inertes como plástico o vidrio (anclaje in vitro) (Dawson, 2010). También se ha propuesto su participación en la división celular (Palm et al., 2005). Se compone de tres elementos principales: (i) una matriz espiral dextrógira de microtúbulos; (ii) microcintas y iii) puentes cruzados, estructuras que unen horizontalmente las microcintas (Figs. 16 y 17) (Holberton et al., 1973; Holberton, 1981; Schwartz et al., 2012; Brown et al., 2016). Los microtúbulos del disco ventral están constituidos por 13 protofilamentos (Fig. 18), con 250 – 300 nm de separación. Presentan en su mayoría el extremo "-" en la zona de nucleación y el extremo "+" en el margen del disco (Schwartz et al., 2012). Sólo los microtúbulos que forman parte de la matriz supernumeraria presentan el extremo "+" en el cuerpo del disco (Schwartz et al., 2012). Las microcintas tienen un espesor de 25 nm y están formadas por tres láminas: eje, interna y margen (Schwartz et al., 2012; Brown et al., 2016). Cada lámina se une perpendicularmente a los protofilamentos 7, 8 y 9 de cada microtúbulo, respectivamente, y se extienden dorsalmente en el citoplasma unos 150 - 400 nm (Fig. 18). Se ha visto que una subestructura llamada carril lateral se une a la lámina axial de las microcintas mediante otra estructura denominada puente (Fig. 18). Las microcintas, los puentes cruzados, el carril lateral y el puente son de estructura y función desconocidas (Schwartz et al., 2012).



Figura 16. Estructura del citoesqueleto y el disco ventral en *Giardia*. A) Microscopía electrónica de barrido donde se aprecian las diferentes regiones del disco ventral de *G. lamblia*, vd: disco ventral, vlf: flagelo ventrolateral, lc: cresta lateral, oz: zona de solapamiento, ba: zona desnuda. Escala: 2 µm. B) Esquema del disco ventral, donde se observa el arreglo microtubular del disco ventral y las diferentes zonas en que se divide (Hagen *et al.*, 2011; Nosala *et al.*, 2018).



Figura 17. A) Corte transversal de la región del disco ventral de *G. lamblia* donde se observan los microtúbulos inmediatamente subyacentes a la membrana ventral (vm), asociado a cada microtúbulo se observan las microcintas (rib) y dos "sidearms" (x, y). B) Esquema de los elementos estructurales del disco ventral de *G. intestinalis*, donde se observan los microtúbulos en asociación con las microcintas y los puentes cruzados que conectan las microcintas entre sí (Holberton *et al.*, 1973; Haegen *et al.*, 2011)



Figura 18. Vista a lo largo del eje de un microtúbulo. Cada protofilamento está numerado en el sentido de las manecillas del reloj. Se pueden apreciar las tres láminas que componen la microcinta . El puente cruzado se puede ver asociado a la lámina marginal de la microcinta. Se pueden apreciar el carril lateral conectado a la lámina eje mediante el Puente; así como varias proteínas asociadas a la región interna del microtúbulo de *Giardia* (gMIPs), específicamente en los protofilamentos 5, 7 y 8 (gMIP5, gMIP7 y gMIP8), así como otras proteínas asociadas a la pared externa del microtúbulo (gMAPs) específicamente a los protofilamentos 1, 2 y 3 (gMAP1, gMAP2 y gMAP3) Se aprecia el brazo lateral que abarca del protofilamento 9-12 y se asocia con la aleta la cual se conecta al protofilamento 13. Barra: 5 nm. (Schwartz *et al.,* 2012).

Dentro del disco ventral se pueden detectar varias zonas (Brown *et al.*, 2016). La zona central, la cual carece de microtúbulos y se denomina zona desnuda (Fig. 16), contiene numerosas vacuolas unidas a la membrana (Holberton *et al.*, 1973; 1981a). Cercano a esta zona central, se encuentra la zona de bandas densas de nucleación de microtúbulos, donde se originan el 59% de todos los microtúbulos del disco (Fig. 16). A su vez, esta zona se divide en dos áreas, una que nuclea los microtúbulos que componen el cuerpo del disco y la otra que se encarga de nuclear los microtúbulos supernumerarios (Fig. 19). En esta zona no hay microcintas (Brown *et al.*, 2016). Enseguida se encuentra la zona de solapamiento o superposición de microtúbulos, los microtúbulos se encuentra negión ventral y dorsal (Fig. 16). En la región dorsal, los microtúbulos se encuentran estrechamente empaquetados, con presencia de microcintas cortas. La región ventral se encuentra entre la zona de solapamiento dorsal y la membrana ventral y carece de la estrechez característica de la región dorsal (Brown *et al.*, 2016). En algunas especies,

incluyendo *G. intestinalis*, se observa comúnmente una muesca en el extremo posterior del disco denominada surco ventral (Fig. 16) (Adam, 2001). Por último, se encuentran la zona del margen del disco y la cresta lateral (Fig. 16), la primera se caracteriza por presentar las microcintas dobladas hacia el centro del disco (Brown *et al.*, 2016); la segunda carece de la estructura microtúbulos-microcintas los cuales al parecer son sustituidos por una estructura fibrosa (Holberton *et al.*, 1973), A esta región se le han atribuido funciones contráctiles (Feely *et al.*, 1982a) y de fijación (House *et al.*, 2011). Por otra parte, resalta la presencia de una estructura microtubular denominada matriz supernumeraria (Fig. 16 y 19), la cual es levógira y recae tanto dorsal o ventral a la estructura principal del disco ventral y también puede poseer microcintas parcialmente formadas (Holberton *et al.*, 1973). Se desconoce la función de esta matriz supernumeraria.



Figura 19. Tomografía de tinción negative de la zona de las bandas densas del disco ventral. Panel A) y B) muestran corte tomográfico de los microtúbulos del disco y B) los microtúbulos supernumerarios (snMT). Se pueden apreciar dos grupos de bandas densas (BD) trilaminares. Uno de ellos nuclea una porción de los microtúbulos del disco ventral (cuadro azul en A) y láminas azules en D)); el otro nuclea los microtúbulos supernumerarios (cuadro rojo en B) y láminas rojas en D)). Las cajas B1-B3 muestran proyecciones de las regiones marcadas. B1 y B3 muestran el plano xy, 3.1 nm; B2 muestra el plano xz, 15.5 nm. Barra: 50 nm. (Brown *et al., 2*016).
El disco ventral de G. lamblia se encuentra formado por diferentes proteínas asociadas al disco (DAPs). Además de la presencia de α - y β -tubulina como principales componentes estructurales (Holberton et al., 1981, Palm et al., 2005; Lourenco et al., 2012), también se localizan a nivel de las microcintas tres familias de giardinas, las cuales se consideran componentes únicos de esta estructura: i) anexinas (α -giardinas), (ii) ensamblinas de fibras estriadas (SF-ensamblinas), por ejemplo β -giardina y δ -giardina y SALP-1, y iii) γ-giardina (Palm *et al.*, 2005; Dawson, 2010; Hagen *et al.*, 2011; Lourenco *et al.*, 2012). Se ha informado que la δ -giardina está implicada en la unión de trofozoítos de *Giardia* al epitelio intestinal (Jenkins *et al.*, 2009) y la γ-giardina participa en el proceso de formación de las microcintas durante la morfogénesis (Kim et al., 2019). También se han detectado otros componentes proteicos, ya sea péptidos individuales o formando complejos multiprotéicos (Hagen et al., 2011; Schwartz et al., 2012; Nosala et al., 2018, 2020). Actualmente se consideran que existen 87 DAPs en total, las cuales se distribuyen diferencialmente en cada zona del disco y se asocian a protofilamentos específicos dentro de cada microtúbulo (Schwartz et al., 2012; Nosala et al., 2020). Algunas DAPs intervienen en el mantenimiento y función del disco ventral, mientras que otras se desconoce su estructura y función (Nosala et al., 2018; 2020). No se han localizado en esta estructura proteínas canónicas de interacción con microtúbulos, como proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) o motores de microtúbulos, por ejemplo, cinesinas o dineínas (Dawson, 2010). Además de las DAPs, a los microtúbulos se asocian dos subestructuras, los brazos laterales y la aleta. Ambas se unen al margen externo de cada microtúbulo, los brazos laterales se unen a los protofilamentos 9-12 y la aleta al protofilamento 13 (Schwartz et al., 2012; Nosala et al., 2018). Ambas son estructuras electrondensas y se desconoce la composición y función (Holberton et al., 1973; Schwartz et al., 2012). Por otra parte, varios reportes han indicado la presencia de actina en el disco ventral (Elmendorf et al., 2003; Morrison et al., 2007; Castillo-Romero et al., 2009); sin embargo, este es aún un tema contradictorio debido, principalmente, al uso de anticuerpos heterólogos para dicha detección (Castillo-Romero et al., 2009).

2. ANTECEDENTES

Un aspecto notable de este parásito es la ausencia de muchas de las proteínas canónicas de eucariontes, lo cual va desde la ausencia de filamina y por tanto, la ausencia del citoesqueleto de filamentos intermedios (Adam, 2001), hasta la carencia de otros péptidos canónicos en eucariontes, entre ellos las proteínas de unión a actina (ABPs) (Paredez et al., 2011). Muchas de las vías que en otros eucariontes son dependientes de las ABPs, en Giardia aún en ausencia de estas proteínas son ejecutadas con total éxito. Lo que conduce a pensar que este microorganismo presenta sustitución de estas proteínas por péptidos no ortólogos aún sin describir. Numerosos artículos reflejan el continuo descubrimiento de nuevos péptidos dentro de este microorganismo (Birkeland et al., 2010; Faso et al., 2013; Paredez et al., 2014; Martincová et al., 2015; Einarsson et al., 2016; Emery et al., 2016; Zumthor et al., 2016; Evans-Oses et al., 2017; Nosala et al., 2018, 2020; Müller et al., 2020; Rojas-Gutiérrez et al., 2021). Estas proteínas no se encuentran descritas dentro del proteoma de Giardia, desconociéndose, por tanto, su función y pudiendo ser muchas de ellas sustitutas de proteínas canónicas de eucariontes superiores. Entre estas proteínas destaca CLP259 reportada recientemente por nuestro grupo de trabajo, en la búsqueda de proteínas con función de puente entre los componentes del citoesqueleto de G. intestinalis (Rojas-Gutiérrez et al., 2021). Experimentalmente se evidenció que CLP259 logra unirse a los componentes del citoesqueleto (actina y tubulina), así como a varias proteínas de diferente estructura y función (Rojas-Gutiérrez et al., 2021). Al parecer tiene una mayor interacción con actina, al evidenciarse una alteración de esta estructura después del silenciamiento de CLP259 (Rojas, 2021). Sus descubridores plantearon que es probable que presente repetidos de anquirina, así como una región homóloga a proteínas de mantenimiento estructural del cromosoma (SMCs), aunque estas regiones no fueron caracterizadas en la proteína (Rojas-Gutiérrez et al., 2021).

Fuera del artículo de Rojas-Gutiérrez y col. (2021), no existen publicaciones, al menos para *Giardia*, donde se haga referencia a una posible existencia de proteínas SMCs con presencia de repetidos de anquirina. Todo lo anterior nos condujo a determinar, mediante

programas bioinformáticos, si CLP259 es una SMC y confirmar los motivos de anquirina, así como poder detectar la existencia de más proteínas con estas características, más allá de CLP259. Al tener una presunta interacción más fuerte CLP259 con el citoesqueleto de actina (Rojas-Gutiérrez *et al.*, 2021) y ya que se ha visto que varias proteínas pueden interactuar con actina directa o indirectamente (Mounier *et al.*, 2002; Unsworth *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2015; Krtková *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020) decidimos averiguar a través de redes de interacción, si dicha asociación podría ser directa o mediada por proteínas de interconección.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar, desde el punto de vista bioinformático, las características estructurales de CLP259 y de su interacción con actina, así como detectar proteínas similares a CLP259 aún no reportadas en la literatura.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la ubicación específica de los repetidos de anquirina y la región SMC de CLP259.
- 2. Determinar las características de otras regiones dentro de CLP259 diferentes a los repetidos de anquirina y SMC
- 3. Buscar dentro del proteoma de *G. intestinalis* proteínas similares (presencia de los mismos motivos y dominios) a CLP259.
- 4. Identificar posibles proteínas intermediarias entre la unión CLP259-actina

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Caracterización de CLP259

Con el fin de conocer la similitud de CLP259 con otras proteínas, se analizó su secuencia aminoacídica mediante el programa Blastp, dentro de la plataforma del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Se insertó la secuencia de referencia de CLP259 dentro del NCBI (XP_001706381.2) y se escogió que el programa mostrara proteínas de secuencias no redundantes y mostrara un máximo de 100 proteínas en los resultados.

Para detectar motivos y/o dominios dentro de CLP259, corroborar la presencia de repeticiones de anquirina, así como regiones homólogas a SMCs, la secuencia en formato FASTA de CLP 259 o su código de identificación (A8BKY9) fueron insertados en diferentes programas bioinformáticos: InterPro (www.ebi.ac.uk), SMART (smart.emblheidelberg.de). PredictProtein (https://predictprotein.org). En NCBL (www.ncbi.nlm.nih.gov) se analizó la proteína mediante la opción de Identificación de Dominios Conservados. En el caso de SwissModel (https://swissmodel.expasy.org), se seleccionó la opción de construir el modelo de CLP259 para a partir de las opciones de modelado que nos brinde la plataforma poder conocer posibles dominios o motivos dentro de la proteína. En DisEMBL (http://dis.embl.de) se insertó la secuencia para determinar regiones de desorden. Finalmente, empleando ScanProsite (https://prosite.expasy.org) y el programa AntheProt se determinaron las regiones de posibles modificaciones postraduccionales.

4.2 Proteínas de *G. intestinalis* con motivos de anquirina y homología a proteínas SMCs.

Para conocer la presencia de otras proteínas que pudieran presentar repetidos de anquirina y ser homólogas a proteínas SMCs, se empleó la sección Genome Data Viewer del NCBI. En este apartado se identificaron cada uno de los genes con repetidos de anquirina y homólogos a SMCs de esta especie analizada, a la vez que se identificaron genes que codificaban proteínas con ambas características.

Posteriormente, para poder clasificar cada una de las proteínas previamente seleccionadas en cuanto a posibles grupos polipeptídicos de acuerdo con su función, el identificador (ID) de cada uno de estos genes fue insertado en la base de datos Panther (http://pantherdb.org/), donde se seleccionó la especie de nuestro interés y la opción de análisis a partir de clasificación funcional.

4.3 Alineamiento de secuencias de los motivos de anquirina.

Posterior a la identificación de genes de proteínas con repetidos de anquirina y regiones SMCs, se llevó a cabo el alineamiento de los repetidos de anquirina lo cual se ejecutó en la plataforma WebLogos 3 (http://weblogo.threeplusone.com), previa identificación en SMART de los *E-values* de cada repetido. De acuerdo con estos valores obtenidos, se decidió incorporar en el análisis de alineamientos sólo aquellos repetidos con valores \leq 0.01, pues este fue el valor promedio encontrado en el total de repetidos. Cada repetido de anquirina fue incorporado en la plataforma de alineamiento en formato FASTA.

4.4 Análisis de interacciones.

Con el fin de conocer posibles interacciones entre las proteínas con repetidos de anquirina y regiones SMCs, así como presuntas proteínas mediadoras entre la interacción actina-CLP259, se realizó una red de interacción en la plataforma STRING (https://string-db.org). Para ello se insertó el identificador de los genes de las proteínas con repetidos de anquirina y SMCs para obtener su red de interacción y, posteriormente, los correspondientes al gen de actina de *G. intestinalis*, CLP259 y las proteínas que experimentalmente interactúan con CLP259 según lo reportado por Rojas-Gutiérrez *et al.* (2021).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterización de CLP259

Con el fin de conocer la similitud de CLP259 con otras proteínas, se analizó su secuencia aminoacídica mediante Blastp en NCBI. Se encontró que los valores más significativos de homología correspondieron a una proteína de mantenimiento estructural de cromosomas (SMC, por sus siglas en inglés), involucrada en la segregación de las cromátidas durante la división celular de *G. intestinalis (E-value* de 0.0, con un 99.24% de identidad y 100% de cobertura en el alineamiento) y con una proteína *coiled-coil* de la cepa P15 de *G. intestinalis (E-value* de 0.0, con un 88.46% de identidad y 100% de cobertura en el alineamiento). Por otra parte, no se detectó similitud significativa con otras proteínas fuera de la especie *G. intestinalis*. Aunque el sistema arrojó cierta homología con una proteína con repeticiones de anquirina en *G. muris* (Fig.20), sus valores estadísticos son despreciables en comparación a las restantes proteínas. La proteína 3 con repetidos de anquirina es CLP259.

Sec	quences producing significant alignments	Download Y New Select columns Y Show 100 V							
	select all 7 sequences selected	GenPept Graphics D	Distance	e tree (of resu	lts <u>Mu</u>	iltiple alig	nment	New MSA Viewer
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
	Ankyrin repeat protein 3 [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis		4854	100%	0.0	100.00%	2380	<u>XP_001706381.2</u>
	Chromosome segregation protein SMC [Giardia intestinalis]	<u>Giardia intestinalis</u>	4809	4809	100%	0.0	99.24%	2393	ESU36945.1
	Coiled-coil protein [Giardia lamblia P15]	Giardia lamblia P15	4301	4301	99%	0.0	88.46%	2392	EF065315.1
	Chromosome segregation protein SMC/ coiled-coil protein [Giardia intestinalis assemblag	Giardia intestinalis assem	3772	3772	99%	0.0	78.43%	2402	KWX14267.1
	Coiled-coil protein [Giardia intestinalis ATCC 50581]	Giardia intestinalis ATCC 5	3712	3712	98%	0.0	78.52%	2350	EET01739.1
	Chromosome segregation protein SMC [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	2615	2615	69%	0.0	78.50%	1665	ESU43447.1
~	Ankyrin repeat protein 3 [Giardia muris]	<u>Giardia muris</u>	193	435	38%	5e-45	30.36%	1491	TNJ27557.1

Figura 20. Resultados del Blstp de CLP259.

Para detectar motivos y/o dominios dentro de CLP259, corroborar la presencia de repeticiones de anquirina reportadas previamente (Rojas-Gutiérrez y col., 2021), así como regiones con similitud a las SMCs, también reportadas por estos autores, se emplearon cuatro plataformas bioinformáticas de detección de dominios protéicos: InterPro, SMART, PredictProtein y NCBI. De igual manera se empleó SWISS-MODEL. Las tres repeticiones de anquirina reportadas en el extremo N-terminal de CLP259 (Rojas-Gutiérrez et al., 2021), fueron confirmadas. De acuerdo con los análisis con InterPro y SMART, la primera repetición de anguirina abarca los aminoácidos 33-63, seguido por la repetición en los aa 64-93 y la tercera se localizó en los aa 126-154. Se detectaron también varias regiones "coiled-coil", cuatro en InterPro y ocho en SMART, y regiones de desorden distribuidas en toda la proteína: 12 según lo predicho por InterPro, más de 30 según PredictProtein y 26 según DisEMBL. El análisis en NCBI mostró que CLP259 tiene dos regiones con similitud a SMCs de eucariontes (Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces cerevisiae y Encephalitozoon cuniculi). Una abarca la región 584-1402 aa (E-value = 1.33×10^{-5}) mientras que la otra 1264-1838 aa (E-value = 3.54×10^{-5}) 10⁻¹⁵). Por otra parte, SWISS-MODEL muestra la región 1324-1550 aa, también con similitud a una SMC de S. cerevisiae, y 1304-1542 aa a SMC de Pyrococcus yayanosii, perteneciente a Archaea. Además, la región 1349-1548 mostró similitud con la secuencia de la cadena 1α de la tropomiosina (Tabla III). Por otra parte, la plataforma InterPro arrojó una similitud entre la región de los aa 121-2376 de CLP259 y la proteína Lin 5 del huso mitótico de C. elegans. En todas las plataformas, la región SMC de CLP259 se detectó en la porción media de la proteína, cercana al extremo C-terminal.

Al analizar la secuencia de CLP259 en PredictProtein se encontró que esta proteína presenta varias regiones de unión al DNA distribuidas en toda su extensión; así como una región de unión al RNA en la posición de los aa 837-840. Según InterPro el resultado de ontología de genes de esta proteína, su presunta función es la de unión a proteínas.

CLP259 también se analizó en la plataforma ScanProsite de Expasy y en el programa

AntheProt, con el fin de determinar posibles modificaciones postraduccionales. Empleando ambas herramientas se detectó que CLP259 puede sufrir varias modificaciones postraduccionales, las cuales se muestran en la Tabla IV.

Región en CLP259	Homólogo	Q-MEAN
<u>1304-1542</u>	SMC (Pyrococcus yayanosii)	0,38
<u>1349-1548</u>	Cadena 1 α de la tropomiosina (filamento cardiaco)	-0,73
<u>1324-1550</u>	SMC (S. cerevisiae)	1,86
<u>1208-1480</u>	Cadena 1 α de la tropomiosina (músculo de vuelo de insecto)	-1,14

Tabla III. Regiones de CLP259 homólogas a SMC según lo detectado en el programa SWISS-MODEL.

Tabla IV. Modificaciones postraduccionales obtenidas en AntheProt para CLP259.

Proteína cinasa C	64-66 (SSR), 119-121 (SRK), 285-287 (SAR), 324-326 (SYR), 337-339 (TYK), 385-387 (SEK),
	451-453 (SQR), 509-511 (SMK), 536-538 (SAR), 542-544 (SKR), 554-556 (SLK), 587-589 (SVR),
	619-621 (SNR), 658-660 (TSR), 710-712 (SRR), 836-838 (SSR), 837-839 (SRK), 840-842 (SVK),
	868-870 (TGK), 878-880 (SRR), 970-972 (SLK), 1032-1034 (SLK), 1114-1116 (SKK), 1134-1136
	(SER), 1206-1208 (TPK), 1219-1221 (SEK), 1223-1225 (SPK), 1241-1243 (SGK), 1267-1269
	(SHK), 1340-1342 (SSK), 1358-1360 (TAK), 1411-1413 (TRK), 1418-1420 (STK), 1419-1421
	(TKR), 1512-1514 (SSK), 1519-1521 (SKK), 15361538 (TNK), 1593-1595 (TKK), 1672-1674
	(SLR), 1678-1680 (SVK), 1703-1705 (SLR), 1737-1739 (SMK), 1813-1815 (TNK), 1914-1916
	(SVK), 1965-1967 (TIR), 20150-2152 (THK), 2205-2207 (TAR), 2263-2265 (SPR), 2289-2291
	(SPR), 2303-2305 (SQR)
Proteína cinasa	120-123 (RKAS), 397-400 (KKGT), 711-714 (RRES), 879-882 (RRVS)
dependiente de cAMP y	
cGMP	
Tirosina cinasa	66-72 (RMKDLRY), 331-338 (RKAEAATY), 1181-1188 (RQVAEQPY), 369-377 (KNVREFEKY)

5.2 Proteínas de *G. intestinalis* con motivos de anquirina y homología a proteínas SMCs.

Se realizó una búsqueda en el genoma de *G. intestinalis* para detectar genes que codifican otras proteínas estructuralmente similares. Se empleó la plataforma NCBI. Se obtuvo que en cada uno de los cromosomas de este organismo se encuentran genes que codifican proteínas con repeticiones de anquirina (Fig. 22) y SMC (Fig. 21). Los genes que dan lugar a proteínas con repetidos de anquirina fueron un total de 434 (6.7%) de los 6470 descritos para esta especie (Morrison *et al.*, 2007). Son más abundantes en el cromosoma 5 y entre ellos hay varias cinasas (100, aproximadamente) y proteínas 21.1 (213, aproximadamente), además de muchísimas proteínas no descritas. Cada uno de los motivos de anquirina están compuestos por 29-32 aa. De igual manera, en cada cromosoma existen varios genes que codifican para proteínas SMC y representan un total de 225 (3.4%). De todos los genes analizados se detectaron 47 que codifican para proteínas que presentan tanto repeticiones de anquirina como regiones SMCs (Tabla V). De estos 47 genes, se encontró que las repeticiones de anquirina podían preceder la región SMC, tal como en el caso de CLP259, pueden estar a ambos lados de esta región o pueden estar precedidas por ésta (Tabla V). De manera interesante, muchas de las

proteínas analizadas presentaron regiones homólogas a SMCs de eucariontes, de procariontes y de arqueas (Tabla V). Los repetidos de anquirina en el extremo N-terminal variaban entre 2-9 repetidos, siendo más abundantes la presencia de 4 repeticiones y en menor medida 3.



cyclidd

I

Proteínas pertenecientes a la familia de SMCs

Proteínas conocidas (ej.: quinasas, SNARE-1)

Proteínas desconocidas

Figura 21: Esquema representativo de la ubicación de genes que codifican para proteínas con homología a SMC o que pertenecen a esta familia de proteínas en los cromosomas de *G. intestinalis*. Tomado de NCBI.



Proteínas conocidas (quinesinas)

Proteínas desconocidas

Figura 22: Esquema representativo de la ubicación de genes que codifican para proteínas con repetidos de anquirina en los cromosomas de *G. intestinalis* (Tomado de NCBI).

Acceso	Cromosoma	Posición	Tamaño	Repeticiones de	SMC (ubicación)	
				anquirina		
GL50803_41212	1	266,678 - 271,540	1620 aa	5 en posición N-terminal	342-1006 ^{a, f}	
GL50803_61564	1	271,716 - 277,214	1832 aa	6 en posición N terminal	850-1695 ^{a, f}	
GL50803_14745	1	237,214 - 239,073	619 aa	4 en posición N-terminal	202-451 ^{a, f}	
GL50803_16435	1	856,443 - 858,530	695 aa	7 en posición N-terminal	263-414 ^{a, f}	
GL50803_10219	1	899,665 - 903,957	1430 aa	4 en posición N-terminal y	690-1011 ^{b, f}	
				6 en posición C-terminal	364-1062 ^{b, d}	
GL50803_113622	1	890,363 - 894,877	1504 aa	4 en posición N-terminal y	296-422 ^{b, d}	
				6 en posición C-terminal	533-1024 ^{b, f}	
GL50803_11493	2	181,413 - 185,291	1292 aa	3 en posición N-terminal y	540-802 ^{b, f}	
				6 en posición C-terminal		
GL50803_17402	2	1,226,619 -	998 aa	3 en posición N terminal y	208-442 ^{b, f}	
		1,229,615		13 en posición C-terminal		
GL50803_6007	2	1,376,805 -	1015 aa	7 en posición C-terminal	313-477 ^{c, f}	
		1,379,852				

Tabla V. Genes que codifican proteínas con repeticiones de anquirina y regiones similares a SMC en el genoma de G. intestinalis.

GL50803_14433	2	1,068,352 - 1,070,325	657 aa	5 en posición N-terminal	290-536 ^{a, f}
GL50803_93011	2	162,554 - 165,682	1042 aa	3 en posición N-terminal 6 en posición C-terminal	259-862 ^{b, f}
GL50803_5879	2	173,755 - 177,582	1275 aa	3 en posición N-terminal y 8 en posición C-terminal	457-615 ^{b, f}
GL50803_6542	3	1,278,359 - 1,281,175	938 aa	3 en posición N-terminal	278-504 ^{a, f}
GL50803_13766	3	600,642 - 603,101	819 aa	4 en posición N-terminal	353-687 ^{a, d}
GL50803_17096	3	1,766,685 - 1,768,967	760 aa	3 en posición N-terminal	184-395 ^{a, f}
GL50803_17097	3	1,769,154 - 1,773,470	1436 aa	5 en posición N-terminal y 16 en posición C-terminal	221-870 ^{a, f}
GL50803_27925	4	550,568 - 552,928	786 aa	4 en posición N-terminal y 3 en posición C-terminal	236-510 ^{b, f}
GL50803_40014	4	1,465,556 - 1,470,385	1609 aa	6 en posición C terminal	815-1080 ^{c, e} 929-1266 ^{c, f}
GL50803_6082	4	2,006,477 - 2,014,453	2658 aa	7 en posición N-terminal	866-1746 ^{a, f} 424-1142 ^{a, f} 1619-2443 ^{a, f}
GL50803_4383	4	2,150,471 - 2,152,828	785 aa	3 en posición N-terminal y 5 en posición C-terminal	237-480 ^{b, f}
GL50803_3762	4	1,303,343 - 1,305,604	753 aa	5 en posición N-terminal 1 en medio	494-699 ^{a, d}
GL50803_13735	4	1,500,073 - 1,503,414	1113 aa	3 en posición N-terminal y 7 en posición C-terminal	309-649 ^{b, d}
GL50803_15456	4	1,931,311 - 1,933,743	810 aa	2 en posición N-terminal y 6 en posición C-terminal	419-536 ^{b, e}
GL50803_115479	4	2,021,993 - 2,024,212	739 aa	9 en posición N-terminal	418-668 ^{a, d}
GL50803_6081	4	2,014,480 - 2,018,055	1191 aa	8 en posición N-terminal	485-1180 ^{a, d}
GL50803_115478	4	2,001,956 - 2,004,175	739 aa	9 en posición N-terminal	418-668 ^{a, d}
GL50803_17551	4	2,154,111 - 2,157,335	1074 aa	4 en posición N-terminal y 3 en posición C-terminal	539-840 ^{b, d} 363-658 ^{b, d}
GL50803_8174	5	1,300,720 - 1,303,224	834 aa	4 en posición N-terminal y 5 en posición C-terminal	206-533 ^{b, f}
GL50803_93294	5	1,759,914 - 1,769,828	3304 aa	3 en posición C-terminal	1012-1851 ^{c, f} 2036-2875 ^{c, f} 514-133 ^{c, f}
GL50803_16532	5	1,704,428 - 1,706,872	814 aa	4 en posición N-terminal	356-724 ^{a, d}
GL50803_17288	5	1,752,791 -	1822 aa	4 en posición N-terminal y	844-1160 ^{b, f}

		1,758,259		6 en posición C-terminal	268-489 ^{b, f}
					771-1426 ^{b, d}
GL50803_16534	5	1,698,178 -	1028 aa	4 en posición N-terminal y	586-724 ^{b, f}
		1,701,264		3 en posición C-terminal	403-702 ^{b, d}
GL50803_103810	5	1,517,854 -	1873 aa	3 en posición N-terminal y	551-1257 ^{b, f}
		1,523,475		3 en posición C-terminal	
GL50803_103807	5	1,532,429 -	946 aa	6 en posición C-terminal	305-630 ^{c, f}
		1,535,269			
GL50803_11107	5	1,593,363 -	819 aa	4 en posición N-terminal	228-496 ^{a, f}
		1,595,822			
GL50803_9720	5	1,749,546 -	1024 aa	4 en posición N-terminal y	189-455 ^{b, f}
		1,752,620		4 en posición C-terminal	
GL50803_14859	5	1,780,675 -	925 aa	4 en posición N-terminal y	345-565 ^{b, f}
		1,783,452		4 en posición C-terminal	
GL50803_23235	5	1,895,086 -	952 aa	4 en posición N-terminal	261-653 ^{a, f}
		1,897,944			
GL50803_33660	5	1,915,688 -	934 aa	5 en posición N-terminal	610-875 ^{a, f}
		1,918,492			
GL50803_40390	5	2,398,604 -	1254 aa	4 en posición N-terminal	788-909 ^{a, f}
		2,402,368			
GL50803_15232	5	3,844,014 -	847 aa	4 en posición N-terminal	280-388 ^{b, f}
		3,846,557		y 1 en el centro	
				3 en posición C-terminal	
GL50803_102023	5	3,909,296 -	837 aa	4 en posición N-terminal y	157-419 ^{b, f}
		3,911,809		11 en posición C-terminal	
GL50803_24590	5	3,911,841 -	970 aa	3 en posición N-terminal y	240-539 ^{b, f}
		3,914,753		8 en posición C-terminal	
GL50803_12139	5	3,926,246 -	681 aa	4 en posición N-terminal y	238-442 ^{b, f}
		3,928,291		5 en posición C-terminal	
GL50803_11099	5	1,576,792 -	886 aa	2 en posición C-terminal	210-440 ^{c, e}
		1,579,452			
GL50803_6920	5	1,718,363 -	1660 aa	2 en posición N-terminal y	952-1515 ^{b, f}
		1,723,345		2 en posición C-terminal	153-1080 ^{b, d}
GL50803_137684	5	3,176,529 -	1336 aa	4 en posición N-terminal y	665-915 ^{b, f}
		3,180,539		6 en posición C-terminal	

a: Región SMC precedida por repetidos de anquirina, b: región SMC bordeada por repeticiones de anquirina a ambos lados, c: Región SMC precede los repetidos de anquirina, d: SMC homólogo a SMCs de bacterias, e: SMC homólogo a SMCs de arqueas y algunas bacterias, f: SMC homólogo a SMCs de otros eucariotes.

Las proteínas recogidas en la Tabla V fueron analizadas en la base de datos Panther para conocer si podían ser clasificadas en algunas familias o subfamilias de proteínas, así como su presunta función. Sólo se obtuvo resultados para la proteína codificada por el gen *GL50803_6920*, la cual parece estar relacionada a la proteína 58 de cilios y flagelos (CFAP58).

5.3 Alineamiento de motivos de anquirina.

Aunque las secuencias de un motivo de anquirina son divergentes, se consideran que algunos residuos están bien conservados (Sedgwick *et al.*, 1999; Mosavi *et al.*, 2004; Elmendorf *et al.*, 2005). Lo que nos llevó a buscar una secuencia consenso existente entre los motivos de anquirina de *G. intestinalis*. Para ello se empleó la plataforma WebLogos 3. Se escogieron los motivos de anquirina que según la plataforma SMART, su E-value se encontrara lo más cercano a cero (≤ 0.01). Se hizo el alineamiento de un total de 202 motivos de anquirina. La Fig. 23 muestra el resultado del alineamiento. Aunque por los resultados obtenidos no se puede hablar de una conservación de residuos estricta, sí se puede apreciar la posible secuencia consenso x-G-x-[T-A]-[A-L]-[L-M]-[M-L-X-Y]-[V-L-A]-A-[A-x]-x-x-[G-N]-[H-N]-x-[E-D]-[C-V-I-A]-[V-A-L]-[R-K]-[L-I]-[L-x]-[L-x]-x-[K-R-H]-[E-A]-[A-x]-x-x[M-x]-x-



Figura 23. Alineamiento de los motivos de ankirina de *G. intestinalis*. Los colores muestran los grupos de cada aminoácidos, verde: básicos, negro: hidrofóbicos y azul: hidrofílicos.

5.4 Análisis de redes de interacción.

Puesto que las proteínas con repeticiones de anguirina son capaces de interactuar con un amplio número de proteínas, se realizó un análisis en STRING con las proteínas recogidas en la Tabla V (ya que presentan regiones similares a CLP259), incluida CLP259, para poder detectar en la base de datos las posibles proteínas con las que pueden interactuar. El resultado obtenido fue nulo, sin detección de interacción. Probablemente influenciado por el hecho de que estas proteínas no están descritas aún. Dado que CLP259 interactúa con actina (Rojas-Gutiérrez et al., 2021) y con el fin de determinar si esta interacción pudiera ser directa o no, se realizó un análisis en la plataforma STRING para detectar de las proteínas reportadas por Rojas-Gutiérrez y col. (2021) que interactúan con CLP259, cuáles de ellas también interactúan con actina de G. intestinalis. Las siguientes secuencias fueron las introducidas en el programa: GL50803 11654, GL50803 14551, GL50803 114787, GL50803 114119, GL50803 11683, GL50803 17230, GL50803 4812, GL50803 17153, GL50803 86676, GL50803_137716, GL50803 4410, GL50803_16202, GL50803 16745, GL50803 103676, GL50803 101291, GL50803 40817, GL50803 5744, GL50803 103713, GL50803 9413, GL50803 17121, GL50803 8917, GL50803 21423, GL50803 14373, GL50803 12216, GL50803 112681, GL50803 114776, GL50803 9558, GL50803 6430, GL50803 88765, GL50803 17249, GL50803 15591, GL50803 40831 (CLP259), GL50803 9515, GL50803 113677, GL50803 17060, GL50803 9030, GL50803 13584, GL50803 11164, GL50803 4767, GL50803 27925, GL50803 40016, GL50803 12139, GL50803 102813, GL50803 32778, GL50803 14859 y ACT-GIAIN (actina).

Como se puede apreciar en la Fig. 24, existe una fuerte evidencia de la interacción entre actina y la chaperona Hsp70 citosólica (GL50803_88765), 14-3-3 (GL50803_6430), Bip (GL50803_17121), la subunidad β de la ATP sintasa vacuolar (GL50803_12216) y la dinamina (GL50803_14373). Estos resultados nos indican que la interacción CLP259-actina parece estar mediada por alguna de estas proteínas como intermediarias. De manera interesante, el programa también reportó interacción entre actina y tubulina (GL50803_103676 y GL50803_101291).

78



Figura 24. Análisis de interacciones entre las proteínas que experimentalmente interactúan con CLP259, CLP259 y actina de G. intestinalis.

6 DISCUSIÓN

G. intestinalis es una de las especies del género Giardia capaz de afectar al ser humano. Es causante de varias epidemias de giardiasis a nivel mundial (Adam, 2001). Los organismos dentro de este género son considerados primitivos, ya que carece de muchas de las estructuras y proteínas presentes en eucariotas (Adam, 2001). Entre las proteínas ausentes se encuentran varias proteínas de unión a actina (ABPs); sin embargo, las funciones dependientes de estas proteínas se siguen ejecutando (Paredez et al., 2011). En un estudio se identificaron varias proteínas de unión a actina, entre las cuales abundaban proteínas no descritas, que probablemente estén haciendo la función de ABPs en este parásito (Paredez et al., 2014). Recientemente se reportó una nueva proteína de unión al citoesqueleto denominada CLP259 y otras proteínas de Giardia (Rojas-Gutiérrez y col., 2021). CLP259 se propuso entonces que pudiera presentar repetidos de anquirina y otras con homología a SMCs, lo cual se evidenció en este trabajo. El motivo de anquirina es un motivo de 33 residuos de aminoácidos (Li et al., 2006), encontrado inicialmente en proteínas de levadura y Drosophila melanogaster (Breeden et al., 1987) y posteriormente detectado en abundancia en otras proteínas eucariónticas con diferentes funciones como regulación de la transcripción, regulación del ciclo celular, integridad citoesquelética, transporte de iones, señalización celular (Li et al., 2006; Mosavi et al., 2004), resistencia a enfermedades (Zhang et al., 2010) y estrés (Zhao et al., 2020; Zhang et al., 2021). Está presente generalmente en tándems, los cuales van desde dos a 20 repeticiones sucesivas (Andrade et al., 2001). La principal función de estas repeticiones de anquirina es mediar la interacción específica proteínaproteína (Li et al., 2006). Cada repetición se pliega en una estructura hélice-lazo-hélice a modo de ganchillo (Fig. 25). A diferencia de otros dominios protéicos, las repeticiones de anguirina no reconocen un motivo o secuencia de aminoácidos específica en la proteína de unión (Mosavi et al., 2002), pudiendo unirse a múltiples dianas (Mosavi et al., 2004; Li et al., 2006).



Figura 25. Estructura de las repeticiones de anquirina de varias proteínas representativas. A) p16, B) p18, C) Gankirina (Li *et al.*, 2006).

A pesar de que este tipo de repetidos abundan en eucariontes, la literatura referente a su existencia y participación en protozoarios es escasa. En Toxoplasma gondii el metabolismo de cardiolipinas es altamente dependiente de una proteína que presenta motivos de anguirina (TgACBP2) (Fu et al., 2018). Por otra parte, la integridad morfológica del conoide, la motilidad del parásito e invasividad están mediadas por la interacción de diferentes proteínas con dos repeticiones de anguirina de la proteína CPH1 (Long et al., 2017). Las proteínas con presencia de dominios de anquirina en el eritrocito humano, ante la infección con *Plasmodium falciparum*, permiten la expresión de determinados ligandos en la membrana del eritrocito infectado y que de esta manera, éste se pueda unir a las células endoteliales vasculares (Magowan et al., 2000). Hasta la actualidad no se han encontrado artículos que refieran la presencia de este motivo en protozoarios dentro del mismo phyla (Metamonada) de Giardia. En el género Giardia existen pocos reportes referentes a la presencia de estas repeticiones de anguirina, aunque en los pocos artículos publicados (Elmendorf et al., 2005; Hagen et al., 2011; Nosala et al., 2018, 2020) se menciona que en la especie G. intestinalis existen una gran variedad de proteínas con este motivo, lo cual fue avalado por este trabajo, donde fueron encontrados más de 400 genes que codifican este tipo de proteínas. Según varios autores, este tipo de proteínas parecen estar en abundancia en el disco ventral (Hagen et al., 2011; Nosala et al., 2018, 2020) y en menor medida en la región de los axonemas de los flagelos anteriores (Elmendorf et al., 2005). Nosala y colaboradores recientemente observaron que una proteína con repeticiones de anquirina es esencial para la estabilidad estructural del disco ventral, funcionando probablemente como una proteína asociada a microtúbulos (MAP, por sus siglas en inglés) canónica (Nosala *et al.*, 2020), las cuales están ausentes en *Giardia spp*. Dado que los repetidos de anquirina permiten la unión a otras proteínas, probablemente sean los que medien la interacción de CLP259 a actina, microtúbulos y otras proteínas reportadas por Rojas-Gutiérrez *et al.*, 2021. Esto explicaría la abundancia de proteínas detectadas en interacción con CLP259 por Rojas-Gutiérrez y col, particularmente en la región N- terminal, donde se encuentran dichos repetidos en esta proteína. Aunque se detectó que los repetidos de anquirina de CLP259 presentan homología a los de otras proteínas, no podemos decir que presentan una estructura terciaria similar, pues se ha reportado que la presencia de otros dominios dentro de cada proteína, el número de motivos y/o la posición, afectan la conformación espacial (Li *et al.*, 2006), haciéndose poco efectivo un modelado proteíno a partir de proteínas homólogas no idénticas.

Una peculiaridad encontrada en el análisis bioinformático de CLP259, fue la presencia de sitios de unión a proteínas, más allá de la región N-terminal, por lo que es probable que CLP259 presente más dominios de interacción, los cuales carecen de homología a dominios conocidos en otros eucariontes o procariontes. Otra explicación de lo anterior es la detección de múltiples regiones de desorden dentro de CLP259, de modo que esta proteína pudiera adquirir una forma conformacional específica al unirse a determinadas proteínas diana, lo cual se ha visto en otras proteínas que presentan regiones desordenadas (Linding *et al.,* 2003). Este cambio conformacional pudiera permitir el acceso a otras proteínas y de este modo, CLP259 podría interactuar con múltiples proteínas de función variada, como fue evidenciado experimentalmente (Rojas-Gutiérrez y col. 2021).

En este trabajo, al igual que lo reportado por Rojas-Gutiérrez y col. (2021), se encontraron varias regiones homólogas a proteínas SMCs dentro de CLP259. Dentro de estas regiones, la que abarca los aminoácidos 1,264-1,838 presentó un E-value bastante significativo (E-value de 3.54×10^{-15}) por lo que es probable que sea esta región la que prevalezca en CLP259 por lo pudiera ser parte de esta familia de proteínas. Las proteínas

SMCs son elementos claves en la condensación de los cromosomas durante la división celular, formando parte del complejo de la condensina, en la cohesión de las cromátidas hermanas como parte del complejo de la cohesina (Cobbe et al., 2004), la reparación del DNA (Lehmann et al., 1995; Jessberger et al., 1996) y presumiblemente tengan un rol fuera de la célula (Cobbe et al., 2000). Se han detectado en la mayoría de los eucariontes, procariontes y arqueas. Su función se ha mantenido conservada en los diferentes organismos (Cobbe et al., 2004). Las SMCs contienen 5 dominios: 1) un dominio globular N-terminal, 2) un primer dominio "coiled-coil" (3) dos dominios globulares, que se piensa funcionan como bisagras, (4) un segundo dominio "coiled-coil" y (5) un dominio globular C-terminal (Fig. 1) (Cobbe et al., 2000). Mientras que los procariontes tienen sólo un gen que codifica a esta proteína, en eucariontes encontramos seis parálogos, en donde la proteína forma, generalmente, al menos tres heterodímeros, a través de sus regiones coiled-coil: complejo SMC1-SMC3 (parte del complejo de la cohesina), complejo SMC2-SMC4 (parte del complejo de condensina) y SMC5-SMC6 (parte de un complejo involucrado en la reparación del DNA) (Cobbe et al., 2004). Los dominios globulares N y C-terminal unen ATP porque en estos dominios se encuentran un motivo Walker A (lazo P) y Walker B (caja DA), respectivamente (Fig. 26). Se propone que el motivo Walker B tenga actividad de ATPasa, la cual se ha podido comprobar en algunas de ellas (Soppa, 2001). Las SMC, además de unirse a la proteína del complejo del cual forman parte, se ha visto que también se unen al DNA (Cobbe et al., 2004).



Figura 26. A) Estructura de una proteína SMC. B) Alternativas de interacción entre dos proteínas SMC (Cobbe *et al.*, 2003).

En cuanto a la presencia de SMCs en parásitos protozoarios, la literatura es escasa, solamente se ha publicado acerca de su presencia en la familia Tripanosomatidae, donde existen 4 ortólogos de SMCs en los genomas T. brucei y L. major relacionados a SMC1, SMC2, SMC3 y SMC4, pero no están presentes SMC5 y SMC6 (Gluenz et al., 2008). En los protozoos restantes, no hay referencias publicadas sobre el tema. En Giardia se conoce que existe una ATPasa de esta familia SMC denominada Rad50, la cual al igual que en otros eucariontes, interviene en la reparación del DNA de doble cadena (Sandoval-Cabrera et al., 2015). También se detectaron varias regiones de unión al DNA y una de unión al RNA, además de una región similar a la proteína LIN-5 de C. elegans. La proteína LIN-5 se ha reportado que forma parte del aparato mitótico una vez que se inicia la división celular, encontrándose en el uso mitótico, el centrosoma y el cinetocoro (Lorson et al., 2000), posible evidencia de que la función de CLP259 pudiera ser participar durante la división celular del parásito, quizás orientando el huso mitótico, promoviendo su elongación u otras. De hecho, se ha comprobado que el silenciamiento de CLP259 conlleva a un desarreglo nuclear y presencia de contenido nuclear en el citoplasma de trofozoítos de G. intestinalis (Rojas, 2021).

Lo que resulta de interés es la dualidad de CLP259, ya que se sugiere una posible función nuclear y otra citoplasmática. Rojas-Gutiérrez *et al.* (2021) reportaron la proteína en la región del citoplasma del trofozoíto, sin detectar su presencia en el núcleo. De ser CLP259 parte de la familia de SMCs, también debe presentar una localización nuclear. El hecho de que sus descubridores no la detectaran en el núcleo, pudiera deberse a una variación en su concentración en este orgánulo, dependiente de la etapa en que se encuentre el trofozoíto o quizás a que los anticuerpos generados durante la experimentación no logran reconocer la proteína nuclear, quizá porque en esta región CLP259 adopta una conformación diferente. Es probable que durante el enquistamiento aumente su concentración en este orgánulo lo cual no fue examinado por los autores, al

buscar su ubicación celular solamente en el trofozoíto maduro. Para corroborar esta suposición es necesario realizar más análisis experimentales.

En la búsqueda de posibles modificaciones postraduccionales de CLP259 encontramos que esta presenta varios sitios potenciales de glicosilación, miristoilación y fosforilación. Todas estas modificaciones tienen diferente efectos para cada proteína en la que ocurren (Alberts et al., 2015), y al no estar caracterizadas las proteínas similares a CLP259, es difícil asegurar el efecto de dichas modificaciones en esta proteína. Aunque escasos, existen reportes de varias de estas modificaciones postraduccionales en proteínas de G. intestinalis. En el caso de la glicosilación se ha visto que para la proteína 14-3-3 está correlacionada a su localización intracelular y tiene efecto en su actividad reguladora, al igual que la fosforilación (Alvarado et al., 2010; Lalle et al., 2006). Por otra parte, la afectación en la fosforilación en la proteína de unión final 1 de G. intestinalis (GIEB1) afecta negativamente la división celular, al no ejercer su función de modulación de la distribución de MTs durante la citocinesis (Kim *et al.,* 2017). La presencia de sitios de fosforilación puede ser un indicador de una posible participación de CLP259 en alguna vía de señalización intracelular. En el caso de la miristoilación, dentro del genoma de G. intestinalis existe un gen que codifica par un ortólogo de la enzima N-miristoil transferasa (NMT) (Šarić et al., 2009). Se sabe que esta modificación postraduccional ocurre generalmente en proteínas que tienen una localización membranal (Johnson et al., 1994; Martin *et al.*, 2011), lo cual se evidenció para la giardina 19- α de *G. intestinalis*, que presenta un sitio de miristoilación en el extremo N-terminal y está asociada a la membrana del flagelo ventral, pudiendo actuar como ancla entre el citoesqueleto de MT y la membrana de este flagelo o en el transporte intracelular de proteínas a su sitio funcional (Saric et al., 2009). Sin embargo, los descubridores no realizaron experimentos para determinar si, además de su ubicación citoplasmática, CLP259 pudiera asociarse a membrana en algún momento. Todas estas cuestiones deben ser analizadas y comprobadas experimentalmente.

Al analizar el genoma de *G. intestinalis*, se detectaron más de 30 genes que codifican varias proteínas que presentan regiones SMCs y motivos de anquirina. En muchas de

estas proteínas su región SMC es similar a proteínas SMCs de procariontes o argueas, en algunas de ellas se encontraron combinaciones de homología con SMCs de eucariontes y procariontes. Esto pudiera ser considerado como una referencia más de la posición evolutiva de Giardia dentro del árbol filogenético. Una de estas proteínas fue asociada por la plataforma Panther DB como relacionada a la proteína CFAP58. Según los datos proporcionados por esta misma base de datos, en G. intestinalis existen dos proteínas que entran también dentro de esta clasificación. Ambas son proteínas SMC pero no presentan repetidos de anquirina en su secuencia. Este aspecto resulta de interés ya que dentro del genoma de Giardia no se han reportado, ni en la literatura, este tipo de proteínas. Se conoce que la CFAP58 es una proteína conservada evolutivamente, la cual presenta dominios "coiled-coil", se encuentra localizada a todo lo largo del flagelo de humanos y ratones, y su función es la de mantener la estabilidad morfológica del flagelo espermático en estas especies (He et al., 2020); también es considerada esencial para el ensamblaje de cilios y flagelos (Li et al., 2020b). En Leishmania major, Trichomonas vaginalis y Trypanosoma brucei también existen proteínas flagelares relacionadas con CFAP58 (pantherdb.org), todas sin caracterizar, excepto la proteína 1 de la zona de anclaje flagelar de T. brucei (pantherdb.org), cuyo silenciaminto conlleva a afectaciones del flagelo (Vaughan et al., 2008). Lo anterior pudiera ser reflejo de la función de estas proteínas dentro de G. intestinalis.

Se ha establecido una secuencia consenso para los repetidos de anquirina de eucariotas: - G – TPLHLA - - - G - - -VV – LLL - - GADVNA (Sedgwick *et al.*, 1999), donde las Glicinas son las encargadas de terminar la hoja β y cada hélice, mientras que la región TPLHLA inicia la primera hélice, por lo que al parecer estos residuos son necesarios para el plegamiento correcto de la proteína en esta región. En 2005 Elmendorf propuso para los tres repetidos de anquirina de la proteína GASP180, de *G. intestinalis*, la secuencia consenso – G – TALM – AAE – G – TD – VK – L– YE - - - - - (Elmendorf *et al.*, 2005) Al comparar ambas secuencias con nuestros resultados vemos que existe cierta tendencia a la conservación de determinados aminoácidos: - G-TALM – A--- G - --- V - - L - - - E - - - - - Aunque las similitudes mayores se encuentran en los primeros aminoácidos y existe una gran variabilidad en los aminoácidos posteriores, lo cual es algo

usual en los motivos de anquirina (Sedgwick *et al.*, 1999); reiteramos que a partir de los datos obtenidos en nuestro análisis, no podemos hablar de una secuencia consenso como tal dentro de los motivos de anquirina de *G. intestinalis*. Aunque las dos publicaciones anteriores dan por hecho estas secuencias como consenso, en ninguna de las dos los autores mencionan los datos estadísticos bajo los cuales se rigen para establecer este criterio, del mismo modo la secuencia establecida por Sedgwick emplea como marco sólo 41 repetidos de anquirina, lo cual consideramos un número escaso para establecer un consenso dentro de los repetidos de anquirina de mamíferos. No obstante, ambos estudios pueden ser empleados como referencias por lo escaso de análisis de este tipo en la literatura.

El análisis de interacciones mediante STRING mostró que varias de las proteínas que interactúan con CLP259 también lo hacen con actina, ya sea que se unan físicamente o tengan una función compartida. Resultó de interés la interacción entre actina y tubulina arrojada por la plataforma. Una revisión exhaustiva de la literatura publicada en acceso, no mostró evidencias de una interacción directa entre actina y tubulina, tal y como propone la plataforma, solamente la mediada por las MAPs capaces de actuar como puentes entre ambas estructuras citoesqueléticas (Shimo-Oka *et al.*, 1980; Selden *et al.*, 1986; Sider *et al.*, 1999; Alberts *et al.*, 2015; Zarrouk *et al.*, 2015). De igual modo, en el caso de *Giardia*, ninguna publicación ha hecho referencia a algún tipo de interacción directa actina-tubulina.

La proteína de unión a inmunoglobulinas (Bip) de *Giardia*, es una chaperona ubicada en el retículo endoplasmático de este organismo y al igual que Hsp70, intervienen en el plegamiento de las proteínas recién sintetizadas. Aunque hasta el momento estas chaperonas no intervienen en el plegamiento de proteínas del citoesqueleto, de lo cual se encarga el complejo TCP-1 (Liang *et al.*, 1997). Algunos estudios mencionan una posible interacción funcional entre Hsp70 y el citoesqueleto de actina. Se ha visto que un miembro de la familia de Hsp70 de *Plasmodium knowlesi* pudiera estar involucrada en la polimerización de actina durante la invasión del eritrocito, teniendo una actividad de capping (Tardieux *et al.*, 1998). Otro estudio refiere que la proteína homologa vírica

Hsp70h del virus de la remolacha amarilla es capaz de interactuar con actina, específicamente con el sistema de motilidad actomiosínico, pudiendo participar en el movimiento del virus a través de la planta que infecta (Prokhnevsky *et al.*, 2005). También se menciona una interacción directa entre Hsp70 y actina en mesoangioblastos de ratón (Turturici *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha visto que algunas Hsps como las proteínas de choque térmico más pequeñas (sHsp) interactúan con el citoesqueleto de actina, permitiendo su estabilización durante un estrés (Mounier *et al.*, 2002; Seit-Nebi *et al.*, 2013), pudiendo interactuar de manera directa con los filamentos, haciendo función de proteínas de "capping" (Mounier *et al.*, 2002). En el caso de *G. intestinalis*, se ha visto mediante cromatografía de afinidad e inmunoprecipitación que Hsp70 interactúa con actina (Paredez *et al.*, 2014), pero hasta el momento no se ha descrito como pudiera ser esta interacción ni su función dentro del parásito.

La dinamina es una proteína que funciona en la contractilidad de la vesícula endocítica para su desprendimiento de la membrana celular (Alberts *et al.*, 2015). En cuanto a una posible interacción dinamina-actina, varios reportes han comprobado este hecho, existiendo una interacción mediada por ABPs (Schafer *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004; Unsworth *et al.*, 2007), como de manera directa (Gu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2020). Esta interacción permite la organización del citoesqueleto (Yu *et al.*, 2004), la estabilización de los paquetes de actina en filopodios (Yamada *et al.*, 2013, 2016), así como la estimulación de la polimerización de actina (Unsworth *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2020). Una de las funciones de la dinamina en esta interacción puede ser reclutar la maquinaria de ensamblaje de actina, llevando a cabo una remodelación de esta estructura, pudiera estabilizar y organizar la actina asociada a membrana (Schafer *et al.*, 2004). En *Giardia* esta proteína se ha detectado en interacción con actina, aunque este hecho no se pudo comprobar empleando otras técnicas de detección de interacción (Paredez *et al.*, 2014). Al igual que se mencionó anteriormente, no existen reportes del impacto de esta posible interacción en las funciones celulares del parásito.

Las proteínas 14-3-3 son una familia de proteínas abundantes entre los eucariontes, capaces de unirse a variadas proteínas y regular algunas vías de señalización (Alberts *et*

al., 2015). Algunos estudios hablan acerca de su interacción con actina. En *Arabidopsis thaliana* se ha visto que interactúa con el citoesqueleto de actina me diante la interacción con el factor 1 despolimerizante de actina (ADF1), inhibiendo su fosforilación, para regular la estabilidad y dinámica de esta estructura (Zhao *et al.*, 2015). En *Physarum polycephalum* se vio que existen regiones específicas de 14-3-3 capaces de interactuar directamente con actina (Luo *et al.*, 2011). En *Giardia* también se ha evidenciado la interacción actina-proteína 14-3-3 (Paredez *et al.*, 2014; Krtková *et al.*, 2017). La actina de *Giardia* contiene dos sitios de unión a 14-3-3; sin embargo, no existe interacción directa, sino mediada por proteínas intermediarias (Krtková *et al.*, 2017). Esta asociación al parecer es con la actina globular, fosforilada o no, lo cual permite que 14-3-3 regule la organización del citoesqueleto de actina, al controlar su polimerización y probablemente el mantenimiento de las pozas de actina en el parásito (Krtková *et al.*, 2017).

Las ATPasas vacuolares (V-ATPasa), son enzimas eucariónticas y procariónticas que acidifican varios organelos como fagosomas, endosomas tempranos, lisosomas vesículas recubiertas de clatrina y vacuolas vegetales a través del transporte de protones. Están compuestas de varias subunidades. Dos de sus subunidades son capaces de unirse a actina, entre ellas la subunidad B. En el caso de los osteoclastos, al parecer esta interacción permite la llegada de las V-ATPasas a la membrana festoneada de estas células y participar en algún proceso celular general (Zuo et al., 2006). En A. thaliana ésta subunidad se une a los extremos barbados de actina, impidiendo la unión de más subunidades, funcionando como estabilizadora de filamentos (Ma et al., 2012). Otros estudios también avalan la unión a F-actina (Chen et al., 2004; Zuo et al., 2008). También se ha planteado que es la región N-terminal de esta subunidad, al menos en mamíferos, la encargada de la unión a actina (Holliday et al., 2000). En el caso de Giardia el sistema endocítico y lisosomal están fusionados en las vesículas periféricas (Benchimol et al., 2011). Es en estas vesículas donde se ha especulado que se encuentre esta ATPasa dentro del trofozoíto, así como en las vesículas de enquistación (Hilario et al., 1998). Sin embargo, solamente dos estudios hacen referencia a la presencia del gen que codifica para V-ATPasa (Hilario et al., 1995, 1998), así como su expresión durante la enquistación (Kim et al., 2009). Pero hasta el momento no se ha estudiado la localización directa de

esta enzima, así como su rol fisiológico. La ejecución de métodos experimentales en el futuro nos permitirá profundizar en estas asociaciones entre las proteínas mencionadas y actina de *G. intestinalis*, las cuales se han podido caracterizar en otros organismos pero que hasta el momento se encuentran poco o no reportadas.

Dentro de G. intestinalis existen numerosas proteínas estructurales y funcionales. Sin embargo, gran parte de estas proteínas aún no están caracterizadas, pudiendo cumplir el mismo rol que aquéllas canónicas en eucariontes y ausentes en este parásito. El descubrimiento reciente de CLP259, así como los reportes anteriores de proteínas no ortólogas a eucariontes han abierto las puertas al estudio del proteoma dentro del trofozoíto de Giardia. Esto nos permitirá entender mejor el comportamiento y las funciones del parásito, así como la evolución o sustitución de determinados componentes dentro del dominio Eukarya. El uso de las herramientas bioinformáticas, aunque no sustituyen el trabajo experimental, sí complementan y permiten direccionar las investigaciones futuras. En este trabajo nos brindó evidencias notorias acerca de la posible ubicación de CLP259 en la familia de proteínas SMCs, así como la presencia de repetidos de anquirina y múltiples regiones coiled-coil y de desorden. Permitiendo, lo anterior, establecer inferencias funcionales de CLP259. Detectamos un número considerable de proteínas que presentan algunas características en común con CLP259 y que no se encuentran caracterizadas. Aunque Giardia es considerado un organismo primitivo, aún nos queda mucho por descubrir de sus componentes moleculares y presuntas funciones dentro del parásito haciendo de su estudio una amplia rama de investigación poco abordada hasta el momento en las publicaciones científicas.

7 CONCLUSIONES

- Dentro del genoma de *G. intestinalis* existen 434 genes que codifican proteínas con repetidos de anquirina y 225 proteínas de mantenimiento estructural de cromosomas (SMC), así como 47 que codifican proteínas con ambas características.
- Dentro de los repetidos de anquirina de *G. intestinalis* se puede considerar que los aminoácidos G,T,A,L,M,A,G,V,L y E son preferenciales en las posiciones 2, 4, 5, 6, 7, 9, 13, 18, 21 y 25, respectivamente.
- Debido a la homología de CLP259 con proteínas SMCs, pudiera tener una localización nuclear.
- La unión entre CLP259 y actina pudiera ser mediada por intermediarios, algunos de los cuales no están del todo caracterizados en su unión a este componente del citoesqueleto.

8 PERSPECTIVAS

- Determinar mediante experimentación la ubicación celular y función de CLP259 en el enquistamiento y las 47 proteínas similares.
- Determinar experimentalmente una asociación mediada por proteínas intermediarias entre la actina de *G. intestinalis* y CLP259.
- Profundizar en el estudio del genoma y el proteoma de Giardia spp.

9 **BIBLIOGRAFÍA**

- Abd El-Latif, N. F., *et al.* (2020). Molecular Characterization of *Giardia intestinalis* Detected in Humans and Water Samples in Egypt. Acta Parasitol. 65(2):482-489 pp.
- Abdul-Wahid A. y Faubert G. (2008). Characterization of the local immune response to cyst antigens during the acute and elimination phases of primary murine giardiasis. Int J Parasitol 38(6):691–703 pp.
- Abel, E. S., *et al.* (2001). Possible roles of protein kinase A in cell motility and excystation of the early diverging eukaryote *Giardia lamblia*. J Biol Chem. 276(13): 10320-10329 pp.
- 4. Abraham, R. J., *et al.* (2019). Aminoguanidines: new leads for treatment of *Giardia duodenalis* infection. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 10: 38-44 pp.
- Adam, R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev.14(3): 447-475 pp.
- Aguayo-Ortiz, R. *et al.* (2013). Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel β-tubulin binding site model. J Mol Graph Model. 45:26-37 pp.
- 7. Ahmed, D. A., *et al.* (2019). Giardiasis pattern among different age categories: childhood assemblage B proclaim endemicity. Iran J Parasitol. 14(4): 614-622 pp.
- Alberts, B., *et al.* (2015): Molecular Biology of the Cell. Garland Science. New York.
 1465 pp.
- 9. Allain, T., *et al.* (2017). Interactions of *Giardia* sp. with the intestinal barrier: Epithelium, mucus, and microbiota. Tissue Barriers 5(1): e1274354.
- Alvarado, M. E. y M. Wasserman (2010). Analysis of phosphorylated proteins and inhibition of kinase activity during *Giardia intestinalis* excystation. Parasitol Int. 59(1): 54-61.
- 11. Amer, E. I., *et al.* (2014). Therapeutic enhancement of newly derived bacteriocins against *Giardia lamblia*. Exp Parasitol. 146:52-63 pp.
- Andrade, M. A., *et al.* (2001). Protein repeats: structures, functions, and evolution.
 J Struct Biol. 134(2-3):117-131 pp.

- Ansell, B. R., *et al.* (2017). Transcriptomics indicates active and passive metronidazole resistance mechanisms in three seminal Giardia lines. Front Microbiol. 8:398 pp.
- Argüello-García, R. *et al.* (2009) a. *In vitro* resistance to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in *Giardia duodenalis*: variability and variation in gene expression. Infect. Genet. Evol. 9:1057-1064 pp.
- Argüello-García, R., *et al.* (2009) b. Encystation commitment in *Giardia duodenalis*: a long and winding road. Parasite 16(4):247-258 pp.
- 16. Barash, N. R., *et al.* (2017). Giardia alters commensal microbial diversity throughout the murine gut. Infect Immun. 85(6): e00948-16.
- 17. Bartelt, L. A. y R. B. Sartor (2015). Advances in understanding Giardia: determinants and mechanisms of chronic sequelae. F1000Prime Rep. 7:62 pp.
- Benchimol B. et al (2004). Visualization of the funis of Giardia lamblia by highresolution field emission scanning electron microscopy – new insights. J Struct Biol 147: 102–115 pp.
- 19. Benchimol, M. y W. De Souza (2011). The ultrastructure of giardia during growth and differentiation. Giardia, Springer: 141-160 pp.
- 20. Benyacoub J. *et al.* (2005). *Enterococcus faecium* enhances the immune response to *Giardia intestinalis* in mice. J Nutr. 135(5):1171-6 pp.
- Beyhan Y. E. *et al.* (2017) Comparison of microscopy, ELISA, and real-time PCR for detection of *Giardia intestinalis* in human stool specimens. Turk J Med Sci. 47:1295-9 pp.
- Bingham A.K. *et al.* (1979) *Giardia* sp.: Physical factors of excystation *in vitro*, and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. Exp Parasitol 47: 284–291 pp.
- 23. Birdi, T.J. *et al.* (2011). *In vitro* antigiardial and antirotaviral activity of *Psidium guajava* L. leaves. Indian J. Pharmacol. 43, 616-617 pp.
- 24. Birkeland, S. R., *et al.* (2010). Transcriptome analyses of the *Giardia lamblia* life cycle. Mol Biochem Parasitol. 174(1): 62-65 pp.
- 25. Bittencourt-Silvestre, J., *et al.* (2010). Encystation process of *Giardia lamblia*: morphological and regulatory aspects. Arch Microbiol. 192(4): 259-265 pp.

- 26. Brandborg, L. L., *et al.* (1967). Histological demonstration of mucosal invasion by *Giardia lamblia* in man. Gastroenterology 52(2): 143-150 pp.
- Breeden, L. y K. Nasmyth (1987). Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of Drosophila. Nature 329(6140): 651-654 pp.
- 28. Briggs, L. J., *et al.* (2004). More than one way to build a flagellum: comparative genomics of parasitic protozoa. Current Biology 14(15): 611-612 pp.
- 29. Brown, J. R., *et al.* (2016). A detailed look at the cytoskeletal architecture of the *Giardia lamblia* ventral disc. J Struct Biol. 194(1): 38-48 pp.
- Buret, A. G. (2008). Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*.
 Parasite. 15, 261–265 pp.
- Cacciò, S. M. y H. Sprong (2010). *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. Exp Parasitol.124(1): 107-112 pp.
- 32. Cahenzli J. *et al.* (2013). Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term levels. Cell Host Microbe. 14(5):559-70 pp.
- Calzada, F. (2005) Additional antiprotozoal constituents from *Cuphea pinetorum*, a plant used in Mayan traditional medicine to treat diarrhoea. Phytother. Res. 19:725-727 pp.
- Campanati, L., *et al.* (2002). Video-microscopy observations of fast dynamic processes in the protozoon *Giardia lamblia*. Cell Motil Cytoskeleton 51(4): 213-224 pp.
- 35. Campanati, L., *et al.* (2003). Tubulin diversity in trophozoites of *Giardia lamblia*.
 Histochem Cell Biol. 119(4): 323-331 pp.
- 36. Carpenter M. L. y W. Z. Cande. Using morpholinos for gene knockdown in *Giardia intestinalis.* Eukaryot Cell. 8:916–919 pp.
- Carranza, P. G. y H. D. Lujan (2010). New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. Microbes Infect. 12(1): 71-80 pp.
- Carranza, P. G., *et al.* (2016). Specific histone modifications play critical roles in the control of encystation and antigenic variation in the early-branching eukaryote *Giardia lamblia*. Int J Biochem Cell Biol. 81: 32-43 pp.

- 39. Carvalho, K. P. y L. H. Monteiro-Leal (2004). The caudal complex of *Giardia lamblia* and its relation to motility. Exp Parasitol.108(3-4): 154-162 pp.
- 40. Carvalho, T. B. *et al.* (2014) *In vitro* antigiardial activity of the cysteine protease inhibitor E-64. Rev. do Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 56:43-47 pp.
- 41. Castillo-Romero, A., *et al.* (2009). Participation of actin on *Giardia lamblia* growth and encystation. PloS One 4(9): e7156.
- 42. Castillo-Romero, A., *et al.* (2010). Rab11 and Actin Cytoskeleton Participate in *Giardia lamblia*. PLoS Negl Trop Dis. 4(6): e697.
- Castillo-Romero, A., *et al.* (2012). Importance of enolase in *Giardia lamblia* differentiation. Mol Biochem Parasitol. 184(2): 122-125 pp.
- 44. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Giardiasis Summary Report National Notifiable Diseases Surveillance System, United States, 2018. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2019.
- 45. Cernikova, L., *et al.* (2018). Five facts about *Giardia lamblia*. PLoS pathogens 14(9): e1007250.
- 46. Chatterjee, A., *et al.* (2010). Giardia cyst wall protein 1 is a lectin that binds to curled fibrils of the GalNAc homopolymer. PLoS Pathog 6(8): e1001059.
- 47. Chávez-Munguía, B., *et al.* (2004). The ultrastructure of the cyst wall of *Giardia lamblia*. J Eukaryot Microbiol. 51(2): 220-226 pp.
- Chen, S.-H., *et al.* (2004). Vacuolar H+-ATPase binding to microfilaments: regulation in response to phosphatidylinositol 3-kinase activity and detailed characterization of the actin-binding site in subunit B. J Biol Chem. 279(9): 7988-7998 pp.
- 49. Chin, A. C., *et al.* (2002). Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. Infect Immun 70(7): 3673-3680 pp.
- 50. Chiu, P. W., *et al.* (2010). A novel family of cyst proteins with epidermal growth factor repeats in *Giardia lamblia*. PLoS Negl Trop Dis 4(5): e677.
- Chuang, S. F., *et al.* (2012). Functional redundancy of two Pax-like proteins in transcriptional activation of cyst wall protein genes in *Giardia lamblia*. PloS One 7(2): e30614.

- 52. Cobbe, N. y M. M. Heck (2000). SMCs in the world of chromosome biology—from prokaryotes to higher eukaryotes. J Struct Biol. 129(2-3): 123-143 pp.
- 53. Cobbe, N. y M. M. Heck (2004). The evolution of SMC proteins: phylogenetic analysis and structural implications. Mol Biol Evol. 21(2): 332-347 pp.
- Correa, C. R. T., *et al.* (2020). Genetic analysis of *Giardia duodenalis* isolates from children of low-income families living in an economically successful region in Southeastern Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 62:e20.
- 55. Correa, G. y M. Benchimol (2006). *Giardia lamblia* behavior under cytochalasins treatment. Parasitol Res. 98(3): 250-256 pp.
- Correa, G., *et al.* (2004). Centrin in *Giardia lamblia*—ultrastructural localization.
 FEMS Microbiol Lett. 233(1): 91-96 pp.
- 57. Cotton J. A. *et al.* (2015). Disruptions of host immunity and inflammation by giardia duodenalis: potential consequences for co-infections in the gastro-intestinal tract. Pathogens. 4(4):764-92 pp.
- 58. Cotton, J. A., *et al.* (2014). *Giardia duodenalis* infection reduces granulocyte infiltration in an in vivo model of bacterial toxin-induced colitis and attenuates inflammation in human intestinal tissue. PloS One 9(10): e109087.
- 59. Dann S. M. *et al.* (2015). IL-17A promotes protective IgA responses and expression of other potential effectors against the lumen-dwelling enteric parasite Giardia. Exp Parasitol 156: 68 –78 pp.
- 60. Dann, S. M., *et al.* (2018). Giardia infection of the small intestine induces chronic colitis in genetically susceptible hosts. J Immunol. 201(2): 548-559 pp.
- 61. Davids B.J. *et al.* (2006) A new family of giardial cysteine-rich non-VSP protein genes and a novel cyst protein. PloS One 1: e44.
- 62. Davids, B. J., *et al.* (2019). Identification of conserved candidate vaccine antigens in the surface proteome of *Giardia lamblia*. Infect Immun 87(6): e00219.
- 63. Davids, B., *et al.* (2011). An atypical proprotein convertase in *Giardia lamblia* differentiation. Mol Biochem Parasitol.175(2): 169-180 pp.
- 64. Dawson, S. C. (2010). An insider's guide to the microtubule cytoskeleton of *Giardia*.Cell Microbiol. 12(5): 588-598 pp.

- Dawson, S. C. (2011). Primary microtubule structures in Giardia. Giardia, Springer: 275-299 pp.
- 66. Dawson, S. C., *et al.* (2007). Kinesin-13 regulates flagellar, interphase, and mitotic microtubule dynamics in *Giardia intestinalis*. Eukaryot Cell. 6(12): 2354-2364 pp.
- 67. De Chatterjee, A., *et al.* (2015). The assembly of GM1 glycolipid-and cholesterolenriched raft-like membrane microdomains is important for giardial encystation. Infect Immun. 83(5): 2030-2042 pp.
- 68. Dobell, C. (1920). The discovery of the intestinal protozoa of man. Proc R Soc Med.13(Sect Hist Med): 1-15 pp.
- 69. Dreesen L., *et al.* (2014). *Giardia muris* infection in mice is associated with a protective interleukin 17A response and induction of peroxisome proliferatoractivated receptor alpha. Infect Immun. 82:3333–3340 pp.
- 70. Dubourg, A., *et al.* (2018). Giardia secretome highlights secreted tenascins as a key component of pathogenesis. Gigascience 7(3): 1-13 pp.
- 71. Durigan, M., *et al.* (2014). Genetic diversity of *Giardia duodenalis*: multilocus genotyping reveals zoonotic potential between clinical and environmental sources in a metropolitan region of Brazil. PloS One. 9(12): e115489.
- 72. Durigan, M., *et al.* (2017). Population genetic analysis of *Giardia duodenalis*: genetic diversity and haplotype sharing between clinical and environmental sources. Microbiologyopen 6(2): e00424.
- 73. Ebneter, J. A., *et al.* (2016). Cyst-Wall-Protein-1 is fundamental for Golgi-like organelle neogenesis and cyst-wall biosynthesis in *Giardia lamblia*. Nature communications 7(1): 1-10 pp.
- 74. Eckmann, L. (2003). Mucosal defences against Giardia. Parasite Immunol. 25(5): 259-270.
- 75. Einarsson, E., *et al.* (2016). Coordinated changes in gene expression throughout encystation of *Giardia intestinalis*. PLoS Negl Trop Dis. 10(3): e0004571.
- Eissa, M. M. y E. I. Amer (2012). *Giardia lamblia*: a new target for miltefosine. Int J Parasitol. 42(5): 443-452 pp.
- 77. El-Basha, N. R., *et al.* (2016). Giardia assemblages A and B in diarrheic patients: a comparative study in Egyptian children and adults. J Parasitol. 102(1): 69-74 pp.
- 78. Eligio-García, L., *et al.* (2011). *Giardia intestinalis*: expression of ubiquitin, glucosamine-6-phosphate and cyst wall protein genes during the encystment process. Exp Parasitol.127(2): 382-386 pp.
- 79. Ellis IV, J. G., *et al.* (2003). Potential involvement of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in encystation of a primitive eukaryote, *Giardia lamblia*: stage-specific activation and intracellular localization. J Biol Chem. 278(3): 1936-1945 pp.
- 80. Elmendorf, H. G., *et al.* (2003). The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. Int J Parasitol.33(1): 3-28 pp.
- 81. Elmendorf, H. G., *et al.* (2005). Examination of a novel head-stalk protein family in *Giardia lamblia* characterised by the pairing of ankyrin repeats and coiled-coil domains. Int J Parasitol. 35(9): 1001-1011 pp.
- Elmi T. *et al.* (2017) Comparison of sensitivity of sucrose gradient, wet mount and formalin – ether in detecting protozoan giardia lamblia in stool specimens of BALB/c mice. J Pure Applied Microbiol. 11:105-109 pp.
- Emery, S. J., *et al.* (2015). The generation gap: Proteome changes and strain variation during encystation in *Giardia duodenalis*. Mol Biochem Parasitol. 201(1): 47-56 pp.
- 84. Emery, S. J., *et al.* (2016). Induction of virulence factors in *Giardia duodenalis* independent of host attachment. Sci Rep. 6(1): 1-16 pp.
- 85. Erlandsen, S. L. y W. J. Bemrick (1987). SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. J Parasitol. 73(3): 623-629 pp.
- 86. Erlandsen, S. L., *et al.* (1989). High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. J Parasitol. 75(5): 787-797 pp.
- 87. Erlandsen, S. L., *et al.* (1990). Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). J Parasitol. 76(5): 717-724 pp.
- Erlandsen, S. L., *et al.* (1996). Formation of the Giardia cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. J Eukaryot Microbiol.43(5): 416-430 pp.

- 89. Erlandsen, S. L., *et al.* (2004). Evidence for adhesive activity of the ventrolateral flange in *Giardia lamblia*. J Eukaryot Microbiol.51(1): 73-80 pp.
- Escobedo, A. A., *et al.* (2016). A meta-analysis of the efficacy of albendazole compared with tinidazole as treatments for Giardia infections in children. Acta Trop.153: 120-127 pp.
- 91. Escobedo, A. A., *et al.* (2018). Treatment of refractory paediatric giardiasis using secnidazole plus albendazole: a case series. Infez. Med 26: 379-384 pp.
- 92. European Centre for Disease Prevention and Control. Giardiasis (lambliasis). In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019.
- 93. Faria, C. P., *et al.* (2017). Associations of *Giardia lamblia* assemblages with HIV infections and symptomatology: HIV virus and assemblage B were they born to each other? Acta Trop.172: 80-85 pp.
- 94. Faso, C., *et al.* (2013). The proteome landscape of Giardia lamblia encystation. PloS One 8(12): e83207.
- 95. Faubert, G. (2000). Immune response to *Giardia duodenalis*. Clin Microbiol Rev.13(1): 35-54 pp.
- 96. Feely D. E. *et al.* (1982) a. *Giardia spp*.: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. Exp Parasitol 53: 145–154 pp.
- 97. Feely, D. E. y S. L. Erlandsen (1982) b. Effect of cytochalasin-B, low Ca++ concentration, iodoacetic acid, and quinacrine-HCl on the attachment of Giardia trophozoites *in vitro*. J Parasitol.: 869-873 pp.
- 98. Feely, D.E. *et al* (1990). The biology of Giardia. In: Meyer, E.A. (Ed.), Giardiasis. Elsevier, Amsterdam, 11–49pp.
- 99. Feng, X.-M., *et al.* (2016). Vaccination with bivalent DNA vaccine of α1-Giardin and CWP2 delivered by attenuated Salmonella typhimurium reduces trophozoites and cysts in the feces of mice infected with Giardia lamblia. PLoS One 11(6): e0157872.
- 100. Ferella, M., *et al.* (2014). Gene expression changes during Giardia–host cell interactions in serum-free medium. Mol Biochem Parasitol. 197(1-2): 21-23 pp.
- 101. Filice, F.P., 1952. Studies on the cytology and life history of a Giardia from the laboratory rat. Univ. Calif. Public. Zool. 57:53–146 pp.

- 102. Foronda, P., *et al.* (2008). Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. Parasitol Res.103(5): 1177-1181 pp.
- 103. Franco M. C. *et al* (2013). Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection. J Med Microbiol. 62(Pt 12):1815-22 pp.
- 104. Fu, Y., *et al.* (2018). Comprehensive characterization of toxoplasma acyl coenzyme A-binding protein TgACBP2 and its critical role in parasite cardiolipin metabolism. MBio 9(5): e01597-18.
- Gadelha, A.P.R. *et al.* (2005): Susceptibility of *Giardia lamblia* to Hovenia dulcis extracts. Parasitol Res. 97: 399–407 pp.
- 106. Galkin, A. *et al.* (2014) Structural basis for inactivation of *Giardia lamblia* carbamate kinase by disulfiram. J. Biol. Chem. 289, 10502-10509 pp.
- 107. Galván-Ramírez, M. *et al.* (2019). Enteroparasitism and Risk Factors Associated with Clinical Manifestations in Children and Adults of Jalisco State in Western Mexico. PHRP. 10(1): 39 pp.
- García-Cervantes, P. C., *et al.* (2017). *Giardia duodenalis* genotypes among schoolchildren and their families and pets in urban and rural areas of Sinaloa, Mexico. Jour Infect Develop Countr. 11(02): 180-187 pp.
- 109. Gard, D. L., *et al.* (2004). MAPping the eukaryotic tree of life: structure, function, and evolution of the MAP215/Dis1 family of microtubule-associated proteins. Int Rev Cytol 239: 179-272 pp.
- 110. Gargantini, P. R., *et al.* (2016). Antigenic variation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. Curr Opin Microbiol. 32: 52-58 pp.
- Gelanew, T., *et al.* (2007). Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. Acta Trop. 102(2): 92-99 pp.
- 112. Ghosh, S., *et al.* (2001). How Giardia swim and divide. Infect Immun. 69(12): 7866-7872 pp.
- 113. Giraldo-Gómez, J. M., F. Lora, L. H. Henao, S. Mejía *et al.* (2005). Prevalencia de giardiasis y parásitos intestinales en preescolares de hogares atendidos en un programa estatal en Armenia, Colombia. Rev. Salud Pública 7: 327-338 pp.

- 114. Gluenz, E., *et al.* (2008). Functional characterization of cohesin subunit SCC1 in *Trypanosoma brucei* and dissection of mutant phenotypes in two life cycle stages. Mol Microbiol. 69(3): 666-680 pp.
- 115. Godínez-Galaz, E. M., *et al.* (2019). Prevalence and Zoonotic Potential of *Giardia intestinalis* in Dogs of the Central Region of Mexico. Animals 9(6): 325 pp.
- Gottig, N., *et al.* (2006). Active and passive mechanisms drive secretory granule biogenesis during differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. J Biol Chem. 281(26): 18156-18166 pp.
- 117. Grit, G., *et al.* (2014). Evaluation of cellular and humoral systemic immune response against *Giardia duodenalis* infection in cattle. Vet Parasitol. 202(3-4): 145-155 pp.
- 118. Gu, C., *et al.* (2010). Direct dynamin–actin interactions regulate the actin cytoskeleton. EMBO J. 29(21): 3593-3606 pp.
- Guo, J., *et al.* (2014). Coexistence of sense and anti-sense mRNAs of variant surface protein in *Giardia lamblia* trophozoites. Biochem. Biophys Res Commun. 444(3): 439-444 pp.
- 120. Gutiérrez-Jiménez, J., *et al.* (2019). Children from a rural region in The Chiapas Highlands, Mexico, show an increased risk of stunting and intestinal parasitoses when compared with urban children. Bol Med Hosp Infant Mex. 76(1): 18-26 pp.
- 121. Hagen, K. D., *et al.* (2011). Novel structural components of the ventral disc and lateral crest in *Giardia intestinalis*. PLoS Negl Trop Dis 5(12): e1442.
- 122. Hahn, J., *et al.* (2013). High sensitivity of *Giardia duodenalis* to tetrahydrolipstatin (orlistat) *in vitro*. PLoS One 8(8): e71597.
- 123. Halliez, M. C. y A. G. Buret (2013). Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. World J Gastroenterol. 19(47): 74-89 pp.
- 124. Hanevik, K., *et al.* (2011). Human cellular immune response against *Giardia lamblia* 5 years after acute giardiasis. J Infect Dis. 204(11): 1779-1786 pp.
- 125. Hanevik, K. (2016). Editorial commentary: giardia lamblia-pathogen or commensal?. Clin Onfect Dis. 63(6):798-9 pp.
- 126. Hansen, W., *et al.* (2006). *Giardia lamblia* attachment force is insensitive to surface treatments. Eukaryotic cell 5(4): 781-783 pp.

- Hausen, M. A., *et al.* (2006). The effects of metronidazole and furazolidone during Giardia differentiation into cysts. Exp Parasitol.113(3): 135-141pp.
- 128. Hausen, M. A., *et al.* (2009). *Giardia lamblia*: a report of drug effects under cell differentiation. Parasitol Res.105(3): 789 pp.
- 129. He, X., et al. (2020). Bi-allelic Loss-of-function Variants in CFAP58 Cause Flagellar Axoneme and Mitochondrial Sheath Defects and Asthenoteratozoospermia in Humans and Mice. Am J Hum Gen. 107(3): 514-526 pp.
- 130. Hehl, A. B. y M. Marti (2004). Secretory protein trafficking in *Giardia intestinalis*. Mol Microbiol.53(1): 19-28 pp.
- 131. Hernández, F., *et al.* (2009). Giardia duodenalis: Effects of an ozonized sunflower oil product (Oleozon®) on in vitro trophozoites. Exp Parasitol.121(3): 208-212 pp.
- 132. Hernandez, Y., et al. (2007). Clathrin-dependent pathways and the cytoskeleton network are involved in ceramide endocytosis by a parasitic protozoan, *Giardia lamblia*. Int J Parasitol.37(1): 21-32 pp.
- 133. Heyworth, M. F. (2014). Immunological aspects of Giardia infections. Parasite 21: 55 pp.
- 134. Heyworth, M. F. (2016). *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. Parasite 23:13 pp.
- 135. Hijjawi N. *et al.* (2018) Comparison of ELISA, nested PCR and sequencing and a novel qPCR for detection of giardia isolates from Jordan. Exp Parasitol. 185:23-8 pp.
- 136. Hilario, E. y J. P. Gogarten (1995). The V-ATPase A subunit gene (vma-1 from *Giardia lamblia*. Biochim Biophys Acta. 1238(1): 94-98 pp.
- 137. Hilario, E. y J. P. Gogarten (1998). The prokaryote-to-eukaryote transition reflected in the evolution of the V/F/A-ATPase catalytic and proteolipid subunits. J Mol Evol. 46(6): 703-715 pp.
- 138. Hoeng, J., *et al.* (2008). High-resolution crystal structure and in vivo function of a kinesin-2 homologue in *Giardia intestinalis*. Mol Biol Cell19(7): 3124-3137 pp.
- 139. Holberton, D. (1973). Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. J Cell Sci. 13(1): 11-41 pp.

- 140. Holberton, D. (1974). Attachment of Giardia-a hydrodynamic model based on flagellar activity. J Exp Biol. 60(1): 207-221 pp.
- 141. Holberton, D. (1981) Arrangement of subunits in microribbons from Giardia. J Cell Sci. 47(1): 167-185 pp.
- 142. Holberton, D. y A. Ward (1981). Isolation of the cytoskeleton from Giardia. Tubulin and a low-molecular-weight protein associated with microribbon structures. J Cell Sci. 47(1): 139-166 pp.
- 143. Holliday, L. S., *et al.* (2000). The amino-terminal domain of the B subunit of vacuolar H+-ATPase contains a filamentous actin binding site. J Biol Chem. 275(41): 32331-32337 pp.
- 144. Hooshyar, H., *et al.* (2019). *Giardia lamblia* infection: review of current diagnostic strategies. Gastroentero Hepat Bed Bench. 12(1): 3-12 pp.
- 145. Hoque, M. E., *et al.* (2002). Risk of giardiasis in Aucklanders: a case-control study.Int. J. Infect. Dis. 6:191–197 pp.
- 146. House S. A. *et al.* (2011) Giardia flagellar motility is not directly required to maintain attachment to surfaces. PLoS Pathog. 7: e1002167.
- 147. Huang, D. B. y A. C. White (2006). An updated review on Cryptosporidium and Giardia. Gastroenterol Clini. 35(2): 291-314 pp.
- 148. Huang, S.-W., *et al.* (2021). A Novel Multiprotein Bridging Factor 1-Like Protein Induces Cyst Wall Protein Gene Expression and Cyst Differentiation in *Giardia lamblia*. Int J Mol Sci. 22(3): 1370 pp.
- 149. Huang, Y.-C., *et al.* (2008). Regulation of cyst wall protein promoters by Myb2 in *Giardia lamblia*. J Biol Chem. 283(45): 31021-31029 pp.
- Ibáñez-Cervantes, G., G. León–Ávila, J. M. Bello–López, A. Pérez–Rangel *et al.* (2018). Changes in the incidence of intestinal giardiosis in Mexican population during five years (2011–2015). Acta Parasitol 63(1): 40-47 pp.
- 151. lebba V. et al (2016) Gut microbiota related to Giardia duodenalis, Entamoeba spp. and Blastocystis hominis infections in humans from cote d'ivoire. J Infect Dev Countries. 10(9):1035-41 pp.

- 152. Jenikova, G., *et al.* (2011). α1-giardin based live heterologous vaccine protects against *Giardia lamblia* infection in a murine model. Vaccine. 29(51): 9529-9537 pp.
- 153. Jenkins M. C. *et al.* (2009) Antibodies to the ventral disc protein delta-giardin prevent *in vitro* binding of *Giardia lamblia* trophozoites. J Parasitol. 95: 895–9 pp.
- 154. Jenkins, M., *et al.* (2012). Analysis of giardin expression during encystation of *Giardia lamblia*. J Parasitol. 98(6): 1266-1270 pp.
- 155. Jessberger, R., *et al.* (1996). SMC proteins constitute two subunits of the mammalian recombination complex RC 1. EMBO J. 15(15): 4061-4068 pp.
- 156. Jiménez, J., et al. (2000). Identification and partial characterization of excretory/secretory products with proteolytic activity in *Giardia intestinalis*. J Parasitol. 86(4): 859-862 pp.
- 157. Johnson, D. R., *et al.* (1994). Genetic and biochemical studies of protein Nmyristoylation. Annu Rev Biochem. 63(1): 869-914 pp.
- Johnston S. P. *et al* (2003) Evaluation of three commercial assays for detection of Giardia and Cryptosporidium organisms in fecal specimens. J Clin Microbiol. 41:623–6 pp.
- 159. Kattenbach, W. M., *et al.* (1996). A deep-etch study of the cytoskeleton of *Giardia duodenalis*. Biol. Cell. 86(2-3): 161-166 pp.
- 160. Kim J. *et al* (2008). *Giardia lamblia* EB1 is a functional homolog of yeast Bim1p that binds to microtubules. Parasitol Int 57: 465–471 pp.
- 161. Kim, J. y S.J. Park (2019). Role of gamma-giardin in ventral disc formation of *Giardia lamblia*. Parasit Vectors. 12(1): 1-15 pp.
- 162. Kim, J., *et al.* (2009). Comparative proteomic analysis of trophozoites versus cysts of *Giardia lamblia*. Parasitol Res.104(2): 475-479 pp.
- 163. Kim, J., *et al.* (2017). Phosphorylation of serine 148 in *Giardia lamblia* end binding
 1 protein is important for cell division. J Eukaryot Microbiol.64(4): 464-480 pp.
- 164. Koehler, A. V., *et al.* (2014). Giardia/giardiasis—A perspective on diagnostic and analytical tools. Biotechnol Adv. 32(2): 280-289 pp.

- 165. Koh, W. H., et al. (2013). Giardia duodenalis assemblage-specific induction of apoptosis and tight junction disruption in human intestinal epithelial cells: effects of mixed infections. J Parasitol. 99(2): 353-358 pp.
- 166. Koloren, Z., *et al.* (2016). Occurency of *Giardia duodenalis* assemblages in river water sources of Black Sea, Turkey. Acta Trop.164: 337-344 pp.
- 167. Krtková, J., *et al.* (2016). Rac regulates *Giardia lamblia* encystation by coordinating cyst wall protein trafficking and secretion. MBio 7(4): e01003-16.
- 168. Krtková, J., *et al.* (2017). 14-3-3 regulates actin filament formation in the deepbranching eukaryote *Giardia lamblia*. Msphere 2(5): e00248-17.
- 169. Kulda J. y Nohýnková E. (1995) Giardia in humans and animals. In: Parasitic protozoa (J.P. Kreier, ed.). Academic Press, San Diego. 225–422 pp.
- 170. Lalle, M. (2010). Giardiasis in the post genomic era: treatment, drug resistance and novel therapeutic perspectives. Infect Disord Drug Targets. 10(4): 283-294 pp.
- 171. Lalle, M., *et al.* (2006). The *Giardia duodenalis* 14-3-3 protein is post-translationally modified by phosphorylation and polyglycylation of the C-terminal tail. J Biol Chem. 281(8): 5137-5148 pp.
- 172. Lanfredi-Rangel, A., *et al.* (2003). Fine structure of the biogenesis of *Giardia lamblia* encystation secretory vesicles. J Struct Biol. 143(2): 153-163 pp.
- 173. Langford T. D. *et al* (2002). Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia spp*. Infect Immun. 70:11–18 pp.
- 174. Laude A. *et al.* (2016). Is real-time PCR-based diagnosis similar in performance to routine parasitological examination for the identification of *Giardia intestinalis*, cryptosporidium parvum/cryptosporidium hominis and entamoeba histolytica from stool samples? evaluation of a new commercial multiplex PCR assay and literature review. Clin Microbiol Inf. 22:190e1-8.
- 175. Lauwaet, T., *et al.* (2007) a. Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. Curr Opin Microbiol.10(6): 554-559 pp.
- Lauwaet, T., *et al.* (2007) b. Protein phosphatase 2A plays a crucial role in *Giardia lamblia* differentiation. Mol Biochem Parasitol. 152(1): 80-89 pp.

- 177. Lee, H. Y., *et al.* (2012). Excretory–secretory products of *Giardia lamblia* induce interleukin 8 production in human colonic cells via activation of p38, ERK1/2, NF κB and AP 1. Parasite Immunol.34(4): 183-198 pp.
- 178. Lehmann, A., et al. (1995). The rad18 gene of Schizosaccharomyces pombe defines a new subgroup of the SMC superfamily involved in DNA repair. Mol Cell Biol. 15(12): 7067-7080 pp.
- Leitsch, D. *et al.* (2011) Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thioredoxin reductase are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-nitroimidazole resistance in *Giardia lamblia*. J. Antimicrob. Chemother. 66, 1756-1765 pp.
- Lenaghan, S. C., *et al.* (2011). High-speed microscopic imaging of flagella motility and swimming in *Giardia lamblia* trophozoites. Proc Nat Acad Sci. 108(34): E550-E558.
- Li E., *et al* (2004). Mast cell-dependent control of Giardia lamblia infections in mice. Infect Immun 2004; 72: 6642–6649 pp.
- Li, J., *et al.* (2006). Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein- protein interactions. Biochem. 45(51): 15168-15178 pp.
- Li, Z., *et al.* (2020) a. The chymase mouse mast cell protease-4 regulates intestinal cytokine expression in mature adult mice infected with *Giardia intestinalis*. Cells 9(4): 925.
- 184. Li, Z.-Z., *et al.* (2020) b. The novel testicular enrichment protein Cfap58 is required for Notch-associated ciliogenesis. Bioscience Rep. 40(1): BSR20192666.
- Liang, P. y T. H. MacRae (1997). Molecular chaperones and the cytoskeleton. J Cell Sci. 110(13): 1431-1440 pp.
- 186. Lin, Z.-Q., *et al.* (2019). Development of CRISPR/Cas9-mediated gene disruption systems in *Giardia lamblia*. PloS One 14(3): e0213594.
- Linding, R., *et al.* (2003). Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. Structure. 11(11): 1453-1459 pp.
- 188. Liu, J., *et al.* (2018). Secreted *Giardia intestinalis* cysteine proteases disrupt intestinal epithelial cell junctional complexes and degrade chemokines. Virulence 9(1): 879-894 pp.

- Long, S., *et al.* (2017). A conserved ankyrin repeat-containing protein regulates conoid stability, motility and cell invasion in *Toxoplasma gondii*. Nat Commun. 8(1): 1-14 pp.
- López-Romero, G., *et al.* (2015). Host defences against *Giardia lamblia*. Parasite Immunol.37(8): 394-406 pp.
- 191. Lorson, M. A., *et al.* (2000). LIN-5 is a novel component of the spindle apparatus required for chromosome segregation and cleavage plane specification in *Caenorhabditis elegans*. J Cell Biol. 148(1): 73-86 pp.
- Lujan, H. D. y M. C. Touz (2003). Protein trafficking in *Giardia lamblia*. Cell Microbiol. 5(7): 427-434 pp.
- 193. Luo, D., *et al.* (2011). Interacting domains of P14-3-3 and actin involved in protein– protein interactions of living cells. Arch Microbiol.193(9): 651-663 pp.
- 194. Ma, B., *et al.* (2012). Arabidopsis vacuolar H+-ATPase (V-ATPase) B subunits are involved in actin cytoskeleton remodeling via binding to, bundling, and stabilizing F-actin. J Biol Chem. 287(23): 19008-19017 pp.
- 195. Maayeh, S. Y., *et al.* (2017). Characterization of the *Giardia intestinalis* secretome during interaction with human intestinal epithelial cells: the impact on host cells. PLoS Negl Trop Dis 11(12): e0006120.
- Maayeh, S. Y., *et al.* (2018). Responses of the differentiated intestinal epithelial cell line Caco-2 to infection with the *Giardia intestinalis* GS isolate. Front Cell Infect Microbiol. 8: 244 pp.
- 197. Magowan, C., *et al.* (2000). *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 1 associates with the band 3 binding domain of ankyrin in the infected red cell membrane. Biochim Biophys Acta. 1502(3): 461-470 pp.
- Mahmoud, A. *et al.* (2014). Ginger and cinnamon: Can this household remedy treat giardiasis? Parasitological and histopathological studies. Iran. J. Parasitol. 9:530-540 pp.
- Maia-Brigagão, C., *et al.* (2012). Giardia disrupts the arrangement of tight, adherens and desmosomal junction proteins of intestinal cells. Parasitol Int. 61(2): 280-287 pp.

- 200. Maia-Brigagão, C., *et al.* (2013). New associated structures of the anterior flagella of *Giardia duodenalis*. Microsc Microanal. 19(5): 1374-1376 pp.
- 201. Manko, A., *et al.* (2017). Giardia co-infection promotes the secretion of antimicrobial peptides beta-defensin 2 and trefoil factor 3 and attenuates attaching and effacing bacteria-induced intestinal disease. PloS One 12(6): e0178647.
- 202. Marti, M., *et al.* (2003). The secretory apparatus of an ancient eukaryote: protein sorting to separate export pathways occurs before formation of transient Golgi-like compartments. Mol Biol Cell14(4): 1433-1447 pp.
- 203. Martin, D. D., *et al.* (2011). Post-translational myristoylation: Fat matters in cellular life and death. Biochimie 93(1): 18-31 pp.
- 204. Martincová, E., *et al.* (2015). Probing the biology of *Giardia intestinalis* mitosomes using in vivo enzymatic tagging. Mol Cell Biol. 35(16): 2864-2874 pp.
- 205. Martínez-Gordillo, M. N., *et al.* (2014). Intraepithelial *Giardia intestinalis*: a case report and literature review. Medicine 93(29): e277.
- 206. Martínez-Miguel, R. M., et al. (2017). Giardia duodenalis Rad52 protein: biochemical characterization and response upon DNA damage. The Journal of Biochemistry 162(2): 123-135 pp.
- 207. Matadamas-Martínez, F. *et al.* (2016): Proteomic and ultrastructural analysis of the effect of a new nitazoxanide-N-methyl-1H-benzimidazole hybrid against *Giardia intestinalis*. Research in Veterinary Science 105. 171–179 pp.
- 208. McCabe, R., et al. (1991). In vitro model of attachment of Giardia intestinalis trophozoites to IEC-6 cells, an intestinal cell line. Antimicrobial agents and chemotherapy 35(1): 29-35 pp.
- 209. McInally, S. G. y S. C. Dawson (2016). Eight unique basal bodies in the multiflagellated diplomonad *Giardia lamblia*. Cilia 5(1): 1-10 pp.
- McRoberts, K., *et al.* (1996). Morphological and molecular characterization of Giardia isolated from the straw-necked ibis (*Threskiornis spinicollis*) in Western Australia. J Parasitol. 82(5): 711-718 pp.
- 211. Mena-Rejón, G. J., *et al.* (2007). Antigiardial activity of triterpenoids from root bark of Hippocratea excelsa. J Nat Prod. 70(5): 863-865 pp.

- Mendez, T. L., *et al.* (2013). Glucosylceramide transferase activity is critical for encystation and viable cyst production by an intestinal protozoan, *Giardia lamblia*. J Biol Chem. 288(23): 16747-16760 pp.
- 213. Merluzzi S, *et al* (2010). Mast cells enhance proliferation of B lymphocytes and drive their differentiation toward IgA secreting plasma cells. Blood. 115: 2810–2817 pp.
- 214. Midlej, V. y M. Benchimol (2009). *Giardia lamblia* behavior during encystment: how morphological changes in shape occur. Parasitol Int. 58(1): 72-80 pp.
- 215. Midlej, V., *et al.* (2016). Mitosomal chaperone modulation during the life cycle of the pathogenic protist *Giardia intestinalis*. Europ J Cell Biol. 95(12): 531-542 pp.
- 216. Minetti, C., *et al.* (2015). Determination of *Giardia duodenalis* assemblages and multi-locus genotypes in patients with sporadic giardiasis from England. Parasit Vect. 8(1): 444 pp.
- 217. Monis, P. T., *et al.* (2009). Variation in Giardia: towards a taxonomic revision of the genus. Trends Parasitol. 25(2): 93-100 pp.
- 218. Morf, L., *et al.* (2010). The transcriptional response to encystation stimuli in *Giardia lamblia* is restricted to a small set of genes. Eukaryot Cell 9(10): 1566-1576 pp.
- 219. Morrison H. G. *et al.* (2007) Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. Science 317: 1921–1926 pp.
- 220. Mosavi, L. K., *et al.* (2002). Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(25): 16029-16034 pp.
- 221. Mosavi, L. K., *et al.* (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. Prot Sci. 13(6): 1435-1448 pp.
- Moss D. M. *et al.* (2014) Longitudinal evaluation of enteric protozoa in Haitian children by stool exam and multiplex serologic assay. Am J Trop Med Hyg. 90:653–60 pp.
- 223. Mounier, N. y A.-P. Arrigo (2002). Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? Cell Stress Chaperones 7(2): 167-76 pp.
- 224. Müller, J. *et al* (2008) Identification of differentially expressed genes in a *Giardia lamblia* WB C6 clone resistant to nitazoxanide and metronidazole. J Antimicrob. Chemother. 62:72-82 pp.

- Müller, J., *et al.* (2007). A novel *Giardia lamblia* nitroreductase, GINR1, interacts with nitazoxanide and other thiazolides. Antimicrob Agents Chemother. 51(6): 1979-1986 pp.
- 226. Müller, J., *et al.* (2013). Metabolism of nitro drugs metronidazole and nitazoxanide in Giardia lamblia: characterization of a novel nitroreductase (GINR2). J Antimicrob Chemother. 68(8): 1781-1789 pp.
- 227. Müller, J., et al. (2015). Comparative characterisation of two nitroreductases from Giardia lamblia as potential activators of nitro compounds. International Journal for Parasitology: Drugs Drug Resist. 5(2): 37-43 pp.
- 228. Müller, J., *et al.* (2018). Physiological aspects of nitro drug resistance in Giardia lamblia. International Journal for Parasitology: Drugs Drug Resist.8(2): 271-277 pp.
- Müller, J., *et al.* (2020). Comparative proteomics of three *Giardia lamblia* strains: investigation of antigenic variation in the post-genomic era. Parasitol. 147(9): 1008-1018 pp.
- 230. Nash T. E. (2002). Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. Mol Microbiol. 45:585–590 pp.
- 231. Nosala, C. y S. C. Dawson (2015). The critical role of the cytoskeleton in the pathogenesis of Giardia. Curr Clin Microbiol Rep. 2(4): 155-162 pp.
- 232. Nosala, C., *et al.* (2018). 'Disc-o-fever': getting down with Giardia's groovy microtubule organelle. Trends Cell Biol 28(2): 99-112 pp.
- 233. Nosala, C., *et al.* (2020). Disc-associated proteins mediate the unusual hyperstability of the ventral disc in *Giardia lamblia*. J Cell Sci. 133(16): jcs227355.
- 234. Ortega-Pierres, M. G., *et al.* (2018). Recent advances in the genomic and molecular biology of Giardia. Acta Trop.184: 67-72 pp.
- 235. Pacheco, F. T., *et al.* (2019). Immune response markers in sera of children infected with *Giardia duodenalis* AI and AII subassemblages. Immunobiol. 224(4): 595-603 pp.
- Palm, D., *et al.* (2005). Developmental changes in the adhesive disk during Giardia differentiation. Mol Biochem Parasitol. 141(2): 199-207 pp.

- Pan, Y.-J., *et al.* (2009). A novel WRKY-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in Giardia lamblia. J Biol Chem. 284(27): 17975-17988 pp.
- 238. Panaro, M. A., *et al.* (2007). Caspase-dependent apoptosis of the HCT-8 epithelial cell line induced by the parasite *Giardia intestinalis*. FEMS Immunol Medical Microbiol. 51(2): 302-309 pp.
- Panti-May, J. A., M. L. Zonta, P. Cociancic, R. C. Barrientos-Medina *et al.* (2019).
 Occurrence of intestinal parasites in Mayan children from Yucatán, Mexico. Acta Trop.195: 58-61 pp.
- 240. Paredez, A. R., *et al.* (2011). An actin cytoskeleton with evolutionarily conserved functions in the absence of canonical actin-binding proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(15): 6151-6156 pp.
- 241. Paredez, A. R., *et al.* (2014). Identification of obscure yet conserved actinassociated proteins in *Giardia lamblia*. Eukaryot Cell 13(6): 776-784 pp.
- 242. Pérez-Rangel, A., *et al.*, (2013). Albendazole and its derivative JVG9 induce encystation on *Giardia intestinalis* trophozoites. Parasitol Res. 112(9):3251-7 pp.
- 243. Pham, J. K., *et al.* (2017). Transcriptomic profiling of high-density Giardia foci encysting in the murine proximal intestine. Front Cell Infect Microbiol.7: 227 pp.
- 244. Pimenta P. F. *et al.* (1991). Variant surface antigens of *Giardia lamblia* are associated with the presence of a thick cell coat: thin section and label fracture immunocytochemistry survey. Infect. Immun. 59:3989 –3996 pp.
- 245. Piva, B. y M. Benchimol (2004). The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. Biol Cell. 96(9): 735-746 pp.
- 246. Plutzer, J., *et al.* (2010). Giardia taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. Int J Hyg Environ Health. 213(5): 321-333 pp.
- 247. Prokhnevsky, A. I., *et al.* (2005). Actin cytoskeleton is involved in targeting of a viral Hsp70 homolog to the cell periphery. J Virol. 79(22): 14421-14428 pp.
- 248. Prucca, C. G., *et al.* (2008). Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. Nature. 456(7223): 750-754 pp.

- 249. Prystajecky, N., *et al.* (2015). *Giardia spp.* are commonly found in mixed assemblages in surface water, as revealed by molecular and whole-genome characterization. Appl Environ Microbiol. 81(14): 4827-4834 pp.
- 250. Puebla, L. J., *et al.* (2014). Correlation of *Giardia duodenalis* assemblages with clinical and epidemiological data in Cuban children. Infect Genet Evol. 23: 7-12 pp.
- 251. Quihui-Cota, L., *et al.* (2008). Impact of *Giardia intestinalis* on vitamin A status in schoolchildren from northwest Mexico. Int J Vit Nutr Res. 78(2): 51-56 pp.
- 252. Quihui-Cota, L., *et al.* (2017). Prevalence and associated risk factors for *Giardia* and *Cryptosporidium* infections among children of northwest Mexico: a cross-sectional study. BMC Public Health 17(1): 852 pp.
- 253. Rahimi-Esboei, B. *et al.* (2013) Anti-giardial activity of *Sambucus ebulus*. Eur. Rev.
 Med. Pharmacol. Sci. 17, 2047-2050 pp.
- 254. Raj, D., *et al.* (2014). Differential gene expression in *Giardia lamblia* under oxidative stress: significance in eukaryotic evolution. Gene 535(2): 131-139.
- 255. Rascon, A. y J. H McKerrow (2013). Synthetic and natural protease inhibitors provide insights into parasite development, virulence and pathogenesis. Curr Med Chem. 20(25): 3078-3102 pp.
- Rayan, P. *et al.* (2015) *Terminalia ferdinandiana* extracts as inhibitors of Giardia duodenalis proliferation: A new treatment for giardiasis. Parasitol. Res. 114, 2611-2620 pp.
- 257. Read, C., *et al.* (2002). Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. Int J Parasitol.32(2): 229-231 pp.
- 258. Reiner, D. S., *et al.* (2003). Calcium signaling in excystation of the early diverging eukaryote, *Giardia lamblia*. J Biol Chem. 278(4): 2533-2540 pp.
- 259. Requena-Méndez, A., *et al.* (2017). The use of quinacrine in nitroimidazoleresistant *Giardia duodenalis*: an old drug for an emerging problem. J Infect Dis.215(6): 946-953 pp.
- 260. Reyes-Vivas, H. *et al.* (2014) Giardial triosephosphate isomerase as possible target of the cytotoxic effect of omeprazole in *Giardia lamblia*. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 7072-7082 pp.

- 261. Reynoso-Robles, R., *et al.* (2015). The invasive potential of *Giardia intestinalis* in an *in vivo* model. Sci Rep. 5(1): 1-8 pp.
- Ringqvist, E., *et al.* (2011). Transcriptional changes in Giardia during host–parasite interactions. Int J Parasitol.41(3-4): 277-285 pp.
- 263. Rivero F. D. *et al* (2010). Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine. Nat Med 2010; 16: 551–557 pp.
- 264. Robertson, L. J., *et al.* (2010). Giardiasis–why do the symptoms sometimes never stop? Trends in parasitology 26(2): 75-82 pp.
- 265. Rogawski, E. T., L. A. Bartelt, J. A. Platts-Mills, J. C. Seidman *et al.* (2017). Determinants and impact of *Giardia* infection in the first 2 years of life in the MAL-ED birth cohort. J Pediat Infect Dis Soc. 6(2): 153-160 pp.
- 266. Rojas, O. (2021): Caracterización de la proteína GL50803_40831 en Giardia duodenalis. Tesis de Doctorado. Escuela de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. México.
- 267. Rojas-Gutiérrez, O., *et al.* (2021). *Giardia intestinalis* coiled-coil cytolinker protein
 259 interacts with actin and tubulin. Parasitol Res.120(3): 1067-1076 pp.
- Rosado-García, F. M., M. Guerrero-Florez, G. Karanis, M. C. Hinojosa *et al.* (2017). Water-borne protozoa parasites: the Latin American perspective. Int J Hyg Environ Health 220(5): 783-798 pp.
- Roskens, H. y S. L. Erlandsen (2002). Inhibition of in vitro attachment of Giardia trophozoites by mucin. J Parasitol. 88(5): 869-873 pp.
- 270. Salusso, A., *et al.* (2017). Histone methyltransferase 1 regulates the encystation process in the parasite *Giardia lamblia*. FEBS J. 284(15): 2396-2409 pp.
- Sandoval-Cabrera, A., *et al.* (2015). MR (Mre11-Rad50) complex in Giardia duodenalis: In vitro characterization and its response upon DNA damage. Biochim 111: 45-57 pp.
- 272. Saraiya, A. A., *et al.* (2014). The microRNAs in an ancient protist repress the variant-specific surface protein expression by targeting the entire coding sequence. PLoS Pathog 10(2): e1003791.
- 273. Šarić, M., *et al.* (2009). Dual acylation accounts for the localization of α19-giardin in the ventral flagellum pair of *Giardia lamblia*. Eukaryot Cell 8(10): 1567-1574 pp.

- 274. Schafer, D. A. (2004). Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin. Traffic 5(7): 463-469 pp.
- 275. Scheunemann, A. E. *et al* (2010) Binding of aminoglycoside antibiotics to helix 69 of 23S rRNA. Nucleic Acids Res. 38(9):3094-105 pp.
- Schwartz, C. L., *et al.* (2012). A detailed, hierarchical study of *Giardia lamblia*'s ventral disc reveals novel microtubule-associated protein complexes. PloS One 7(9): e43783.
- 277. Scott K. G. *et al.* (2004) Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. Infect Immun. 72:3536-42 pp.
- Scott, K. G. E., *et al.* (2002). Intestinal infection with *Giardia spp*. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase–dependent fashion. Gastroenterol. 123(4): 1179-1190.
- Sedgwick, S. G. y S. J. Smerdon (1999). The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. Trends Biochem Sci. 24(8): 311-316.
- 280. Seit-Nebi, A. S., *et al.* (2013). Commentary on paper: Small heat shock proteins and the cytoskeleton: an essential interplay for cell integrity? (Wettstein *et al.*). Int J Biochem Cell Biol. 45(2): 344-346 pp.
- 281. Selden, S. C. y T. D. Pollard (1986). Interaction of actin filaments with microtubules is mediated by microtubule-associated proteins and regulated by phosphorylation. Ann N Y Acad Sci. 466: 803-812 pp.
- 282. Serradell, M. C., *et al.* (2016). Vaccination of domestic animals with a novel oral vaccine prevents Giardia infections, alleviates signs of giardiasis and reduces transmission to humans. NPJ Vaccines 1(1): 1-11 pp.
- 283. Serradell, M. C., *et al.* (2018). Cytokines, antibodies, and histopathological profiles during Giardia infection and variant-specific surface protein-based vaccination. Infect Immun. 86(6): e00773-17.
- 284. Serradell, M. C., *et al.* (2019). Efficient oral vaccination by bioengineering virus-like particles with protozoan surface proteins. Nat Comm. 10(1): 1-15 pp.
- 285. Shimo-Oka, T., *et al.* (1980). Tubulin-myosin interaction. Some properties of binding between tubulin and myosin. Biochem. 19(21): 4921-4926 pp.

- Sider, J. R., *et al.* (1999). Direct observation of microtubule-f-actin interaction in cell free lysates. J Cell Sci. 112(12): 1947-1956 pp.
- 287. Singer, S. M. y T. E. Nash (2000). T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. Infect Immun. 68(1): 170-175 pp.
- 288. Singh, A., *et al.* (2009). *Giardia intestinalis* assemblages A and B infections in Nepal. Am J Trop Med Hyg. 81(3): 538-539 pp.
- Skarin, H., *et al.* (2011). Elongation factor 1-alpha is released into the culture medium during growth of *Giardia intestinalis* trophozoites. Exp Parasitol.127(4): 804-810 pp.
- 290. Slavin, I., *et al.* (2002). Dephosphorylation of cyst wall proteins by a secreted lysosomal acid phosphatase is essential for excystation of *Giardia lamblia*. Mol Biochem Parasitol. 122(1): 95-98 pp.
- 291. Smith H. V. y Mank T.G. Diagnosis of human Giardiasis. En: Lujan HD, Svard S,Eds. Giardia a model organism. New York: Springer-Verlag; 2011. 353-74 pp.
- Soliman, R., *et al.* (2011). Identification of a novel Assemblage B subgenotype and a zoonotic Assemblage C in human isolates of *Giardia intestinalis* in Egypt. Parasitol Int. 60(4): 507-511 pp.
- 293. Soppa, J. (2001). Prokaryotic structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins: distribution, phylogeny, and comparison with MukBs and additional prokaryotic and eukaryotic coiled-coil proteins. Gene 278(1-2): 253-264 pp.
- 294. Soria-Arteche, O. *et al.* (2013) Synthesis and antiprotozoal activity of nitazoxanide-N-methylbenzimidazole hybrids. Bioorg. Med. Chem. Lett. 23:6838-6841 pp.
- 295. Sousa, M. C., *et al.* (2001). Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to int-407 human intestinal cells. Clin Diag Lab Immunol. 8(2): 258-265 pp.
- Sprong, H., *et al.* (2009). Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*.
 PLoS Negl Trop Dis 3(12): e558.
- 297. Squire, S. A. y U. Ryan (2017). *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. Parasit Vectors. 10(1): 195 pp.
- 298. Stadelmann, B., *et al.* (2013). The role of arginine and arginine-metabolizing enzymes during Giardia–host cell interactions *in vitro*. BMC Microbiol. 13(1): 1-11 pp.

- 299. Stefanic S., *et al.* (2006) Organelle proteomics reveals cargo maturation mechanisms associated with Golgi-like encystation vesicles in the early-diverged protozoan *Giardia lamblia*. J. Biol. Chem. 281:7595-7604 pp.
- Su, L.-H., *et al.* (2011). A novel E2F-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in *Giardia lamblia*. J Biol Chem. 286(39): 34101-34120 pp.
- 301. Sun, C. H., *et al.* (2002). A novel Myb related protein involved in transcriptional activation of encystation genes in *Giardia lamblia*. Mol Microbiol.46(4): 971-984 pp.
- Sun, C.-H., *et al.* (2006). Novel plant-GARP-like transcription factors in *Giardia lamblia*. Mol Biochem Parasitol. 146(1): 45-57 pp.
- 303. Sun, C.-H., *et al.* (2020). DNA topoisomerase IIIβ promotes cyst generation by inducing cyst wall protein gene expression in *Giardia lamblia*. Open Biol. 10(2): 190228 pp.
- 304. Szkodowska, A., et al. (2002). Annexin XXI (ANX21) of Giardia lamblia has sequence motifs uniquely shared by giardial annexins and is specifically localized in the flagella. J Biol Chem. 277(28): 25703-25706 pp.
- 305. Tardieux, I., *et al.* (1998). Actin-binding proteins of invasive malaria parasites and the regulation of actin polymerization by a complex of 32/34-kDa proteins associated with heat shock protein 70kDa. Mol Biochem Parasitol. 93(2): 295-308 pp.
- 306. Thompson R. C. *et al* (2004). Variation in Giardia: implications for taxonomy and epidemiology. Adv Parasitol. 58:69–137 pp.
- 307. Thompson, R. A. y P. T. Monis (2011). Taxonomy of Giardia species. Giardia, Springer: 3-15 pp.
- 308. Thompson, R. y A. Ash (2016). Molecular epidemiology of Giardia and Cryptosporidium infections. Infect Gen Evol. 40: 315-323 pp.
- 309. Torres-Gómez, H. *et al* (2008) Design, synthesis and in vitro antiprotozoal activity of benzimidazole-pentamidine hybrids. Bioorg. Med. Chem. Lett. 18, 3147-3151 pp.
- 310. Touz, M. C. y N. Zamponi (2017). Sorting without a Golgi complex. Traffic 18(10):637-645 pp.

- 311. Tovar, J., *et al.* (2003). Mitochondrial remnant organelles of Giardia function in ironsulphur protein maturation. Nature. 426(6963):172-6 pp.
- 312. Trelis, M., *et al.* (2019). *Giardia intestinalis* and fructose malabsorption: A frequent association. Nutrients 11(12): 2973 pp.
- Turturici, G., *et al.* (2008). Hsp70 localizes differently from chaperone Hsc70 in mouse mesoangioblasts under physiological growth conditions. J Mol Hist. 39(6): 571 pp.
- 314. Unsworth, K. E., *et al.* (2007). Dynamin is required for F-actin assembly and pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). Cell Microbiol. 9(2): 438-449 pp.
- 315. Vahrmann, A., *et al.* (2008). α14-Giardin (annexin E1) is associated with tubulin in trophozoites of Giardia lamblia and forms local slubs in the flagella. Parasitol Res.102(2): 321-326 pp.
- 316. Vaughan, S., *et al.* (2008). A repetitive protein essential for the flagellum attachment zone filament structure and function in *Trypanosoma brucei*. Protist 159(1): 127-136 pp.
- 317. Vidal, F. *et al* (2007) *Giardia lamblia*: The effects of extracts and fractions from Mentha x piperita Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. Exp. Parasitol. 115: 25-31 pp.
- 318. Vivancos, V., *et al.* (2018). Giardiasis: characteristics, pathogenesis and new insights about treatment. Curr Topics Med Chem. 18(15): 1287-1303 pp.
- Vranych, C. V., *et al.* (2014). SUMOylation and deimination of proteins: Two epigenetic modifications involved in Giardia encystation. Biochim Biophys Acta. 1843(9): 1805-1817 pp.
- 320. Wang, C.-H., et al. (2007). A novel ARID/Bright-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein 1 gene in Giardia lamblia. J Biol Chem. 282(12): 8905-8914 pp.
- 321. Wang, Y., *et al.* (2019). Epidemiological distribution of genotypes of *Giardia duodenalis* in humans in Spain. Parasit Vectors 12(1): 432 pp.
- 322. Wang, Y.-T., *et al.* (2010). A novel pax-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in Giardia lamblia. J Biol Chem. 285(42): 32213-32226 pp.

- 323. Woessner, D. J. y S. C. Dawson (2012). The Giardia median body protein is a ventral disc protein that is critical for maintaining a domed disc conformation during attachment. Eukaryot Cell 11(3): 292-301 pp.
- 324. Xiao, L., y R. Fayer. (2008). Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. Int. J. Parasitol. 38:1239–1255 pp.
- Xu, F., *et al.* (2012). Genome-wide analyses of recombination suggest that *Giardia intestinalis* assemblages represent different species. Mol Biol Evol. 29(10): 2895-2898 pp.
- 326. Yamada, H., *et al.* (2013). Stabilization of actin bundles by a dynamin 1/cortactin ring complex is necessary for growth cone filopodia. J Neurosci. 33(10): 4514-4526 pp.
- 327. Yamada, H., *et al.* (2016). Actin bundling by dynamin 2 and cortactin is implicated in cell migration by stabilizing filopodia in human non-small cell lung carcinoma cells. Int J Oncol. 49(3): 877-886 pp.
- 328. Yu, C., *et al.* (2008). SGLT-1-mediated glucose uptake protects human intestinal epithelial cells against *Giardia duodenalis*-induced apoptosis. Int J Parasitol.38(8-9): 923-934 pp.
- 329. Yu, F., *et al.* (2019). Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolated from patients in Egypt. Acta Trop.196: 66-71 pp.
- 330. Yu, X. y M. Cai (2004). The yeast dynamin-related GTPase Vps1p functions in the organization of the actin cytoskeleton via interaction with Sla1p. J Cell Sci. 117(17): 3839-3853 pp.
- 331. Zarrouk, A., et al. (2015). Impact of C24: 0 on actin-microtubule interaction in human neuronal SK-N-BE cells: evaluation by FRET confocal spectral imaging microscopy after dual staining with rhodamine-phalloidin and tubulin tracker green. Func Neurol. 30(1): 33 pp.
- 332. Zhang, N., *et al.* (2021). Cardiac ankyrin repeat protein contributes to dilated cardiomyopathy and heart failure. The FASEB Journal 35(4): e21488.

- 333. Zhang, R., *et al.* (2020). Dynamin regulates the dynamics and mechanical strength of the actin cytoskeleton as a multifilament actin-bundling protein. Nature Cell Biol. 22(6): 674-688 pp.
- 334. Zhang, X., et al. (2010). Molecular characterization of rice OsBIANK1, encoding a plasma membrane-anchored ankyrin repeat protein, and its inducible expression in defense responses. Mol Biol Rep. 37(2): 653 pp.
- 335. Zhao, J.-Y., *et al.* (2020). The Ankyrin-Repeat Gene GmANK114 Confers Drought and Salt Tolerance in Arabidopsis and Soybean. Front Plant Sci 11: 1666 pp.
- 336. Zhao, S., *et al.* (2015). 14-3-3 λ protein interacts with ADF1 to regulate actin cytoskeleton dynamics in Arabidopsis. Sci China Life Sci. 58(11): 1142-1150 pp.
- 337. Zhou, P., *et al.* (2007). Tumour necrosis factor α contributes to protection against *Giardia lamblia* infection in mice. Parasite Immunol.29(7): 367-374.
- 338. Zumthor, J. P., *et al.* (2016). Static clathrin assemblies at the peripheral vacuole plasma membrane interface of the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. PLoS pathogens 12(7): e1005756.
- 339. Zuo, J., *et al.* (2006). Actin binding activity of subunit B of vacuolar H+-ATPase is involved in its targeting to ruffled membranes of osteoclasts. Journal of bone and mineral research 21(5): 714-721 pp.
- 340. Zuo, J., *et al.* (2008). Biochemical and functional characterization of the actinbinding activity of the B subunit of yeast vacuolar H+-ATPase. J Exp Biol211(7): 1102-1108 pp.