



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico-Biológicas
Programa de Posgrado Integral en Biotecnología
Doctorado en Ciencias en Biotecnología

**Efecto del Hierro en la Patogenicidad de *Giardia duodenalis*,
Estructuras Tallo Burbuja como Posibles Elementos
Reguladores.**

Tesis Doctoral

Que presenta

MC Laura Yuliana Plata Guzmán

Como requisito para obtener el grado de
Doctora en Ciencias en Biotecnología de Salud

Directoras de Tesis

Dra. Claudia del Rosario León Sicairos

Dra. Nidia Maribel León Sicairos

Culiacán, Sinaloa, México. Abril de 2026



Universidad Autónoma de Sinaloa

Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd.
Universitarios
C.P. 80010 Culiacán Sin. Méx.
Tel (667) 713 78 32 y
(667) 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

PRESENTACIÓN

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Patología, Biología Celular y Molecular del Programa de Posgrado Integral en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección de la Dra. Claudia del Rosario León Sicaños y de la Dra. Nidia Maribel León Sicaños. El trabajo experimental se desarrolló con fondos institucionales del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAP) de la Universidad Autónoma de Sinaloa, así como del antes Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT, No de proyecto 51241) ahora Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) mediante Ciencia de Frontera 2019, cuyo responsable técnico es la Dra. Claudia del Rosario León Sicaños. Agradezco al CONAHCYT por la beca otorgada a su servidora, MC. Laura Yuliana Plata Guzmán, para el desarrollo de este proyecto de Tesis Doctoral. Además, agradezco al Centro de Investigación aplicada a la Salud Pública (CIASaP) de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección del Dr. Adrián Canizalez Román y la Dra. Nidia Maribel León Sicaños, por permitirme desarrollar una parte experimental de la Tesis Doctoral durante el periodo 2019-2020. Finalmente, agradezco al Colegio de Sinaloa por la beca otorgada en Ciencias Médicas con Orientación en Salud Pública “Jesús Kumate Rodríguez” para la culminación exitosa del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Claudia del Rosario León Sicaños por permitirme formar parte de su grupo de trabajo. Por su apoyo incondicional y asesoría; por impulsarme a hacer todo de la mejor manera y sobre todo por ser usted quien me inició en el camino de la investigación. Gracias por su paciencia, disponibilidad, comprensión y amistad.

A la Dra. Nidia Maribel León Sicaños por su apoyo y asesoría estando siempre dispuesta a compartir sus conocimientos y por hacerme parte de su laboratorio. Gracias por su disponibilidad y amistad.

Al Dr. Adrián Canizalez por permitirme desarrollar parte experimental en el Centro de Investigación Aplicada a la Salud Pública (CIASaP). Gracias por su apoyo y disponibilidad.

Al Dr. Héctor Flores Villaseñor por colaborar para mi formación académica y profesional.

Al Dr. José Garzón Tiznado por su apoyo, disponibilidad y asesoría.

A la Dra. Erika Acosta Smith gracias por brindarme su apoyo y amistad. Por estar siempre dispuesta ayudarme.

A la Dra. Diana Aurora Ramírez Sánchez por su valiosa asesoría y por estar siempre dispuesta a compartir sus conocimientos. Gracias por su apoyo.

A mis compañeros de laboratorio: Aurora Gastélum, Luz Adriana Reyes, Francisco Puga, Perla Linares por estar siempre en la mejor disposición de colaborar.

A los profesores investigadores del posgrado en Biotecnología, que en verdad colaboraron para mi formación académica y profesional.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE CUADROS	xii
I RESUMEN	1
ABSTRACT	3
II INTRODUCCIÓN	5
III REVISIÓN DE LITERATURA	11
A <i>Giardia duodenalis</i>	11
1 Aspectos generales de <i>G. duodenalis</i>	11
2 Aspectos históricos	15
3 Taxonomía de <i>G. duodenalis</i>	15
4 Morfología	18
a Trofozoíto	18
b Quiste	23
5 Ciclo Biológico	25
6 Epidemiología y transmisión	28
7 Mecanismos de Patogenicidad	32
8 Formas clínicas de la giardiasis	38
a Giardiasis asintomática	38
b Giardiasis aguda	38
c Giardiasis crónica	39
d Manifestaciones extraintestinales	39

9 Diagnóstico de laboratorio de la giardiasis	40
a Diagnóstico por microscopía	40
b Diagnóstico por detección de antígenos	40
c Diagnóstico mediante técnicas de análisis genético	43
10 Tratamiento	43
11 Metabolismo	45
12 Metabolismo de hierro	47
13 Aspectos moleculares de <i>G. duodenalis</i>	51
14 Efecto del hierro en protozoarios	55
B HOMEOSTASIS DEL HIERRO EN LAS CÉLULAS	62
a El Hierro en microorganismo patógenos	65
b El Hierro en parásitos protozoarios	65
c El hierro en <i>G. duodenalis</i>	66
C EL SISTEMA TIPO IRE/IRP	68
a Proteína Reguladora de Hierro 1	71
b Proteína Reguladora de Hierro 2	75
c Proteínas Reguladoras de Hierro en protozoarios	77
D RNAm CON ESTRUCTURAS IREs	83
IV JUSTIFICACIÓN	85
V HIPÓTESIS	86
VI OBJETIVOS	87
A OBJETIVO GENERAL	87
B OBJETIVOS PARTICULARES	87
VII MATERIALES Y MÉTODOS	88

A MATERIALES	88
1 Cultivos de <i>G. duodenalis</i>	88
B MÉTODOS	89
1 Efecto del hierro en la patogenicidad de <i>G. duodenalis</i>	89
a Cinética para medición del crecimiento de <i>G. duodenalis</i> en diferentes concentraciones de hierro	89
b Cultivos Celulares	90
c Ensayo de Adhesión	90
d Ensayo de Citotoxicidad	91
2 Identificación de RNAm y proteínas expresadas diferencialmente por Fe	91
a Extracción de Ácidos Nucleicos	91
b Cuantificación e Integridad de Ácidos Nucleicos	92
c Remoción de DNA contaminante del RNA obtenido	92
d Diseño de Oligonucleótidos	93
3 Predicción de estructuras tallo-burbuja en RNAm de <i>G. duodenalis</i>	95
VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	96
A El hierro afecta el crecimiento de <i>G. duodenalis</i>	96
B Efecto del hierro en la adhesión y citotoxicidad de Giardia a células HT-29	99
C La expresión de los RNAm de Actina, Citocromo b5, Glucosamina 6 fosfato desaminasa y Subtilisina son moduladas diferencialmente por hierro	104
D Presencia de estructuras tallo-burbuja en RNAm's de <i>G. duodenalis</i>	111
IX CONCLUSIONES	149
X BIBLIOGRAFÍA	1150
XI ABREVIATURAS	175
XII ANEXOS	177

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Morfología del trofozoíto de <i>G. duodenalis</i>	19
2	Diagrama de corte transversal de <i>G. duodenalis</i>	22
3	Morfología del quiste de <i>G. duodenalis</i>	24
4	Ciclo biológico de <i>G. duodenalis</i>	27
5	Adhesión de trofozoítos de <i>Giardia</i> al epitelio intestinal	36
6	Técnicas más utilizadas para el diagnóstico de la giardiasis	42
7	Secuencia consenso conservada para el sitio de iniciación de la transcripción en <i>G. duodenalis</i>	54
8	Expresión diferencial de genes de <i>E. histolytica</i> en condiciones de bajo hierro	58
9	Efecto del hierro en la adherencia y toxicidad de <i>E. histolytica</i> a monocapas de células CHO	59
10	Efecto del hierro en el crecimiento de <i>E. histolytica</i>	60
11	Homeostasis del hierro en células eucariotas	64
12	Sistema de Regulación IRE/IRP	70
13	Estructura lineal de la proteína IRP1 y representación del IRE	73
14	Aconitasa/Proteína Reguladora de Hierro	74
15	Proteína Reguladora de Hierro 2	76
16	Proteínas tipo IRP en el citoplasma de <i>T. vaginalis</i>	79
17	Identificación de proteínas de unión a RNA de <i>T. vaginalis</i>	80
18	Alineamiento múltiple en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de humano, proteína reguladora de hierro de <i>P. falciparum</i> y la secuencia IRP-like GL50803_17385 de <i>G. duodenalis</i>	82

19	Elementos de Respuesta al Hierro (IREs)	84
20	Efecto del hierro sobre el crecimiento poblacional de <i>G. duodenalis</i>	98
21	Efecto del hierro en la adhesión de Giardia a células HT-29	102
22	Efecto del hierro en la citotoxicidad de Giardia a células HT-29	103
23	La expresión del RNAm de <i>Actina</i> de <i>G. duodenalis</i> se modula diferencialmente por condiciones de hierro	107
24	La expresión del RNAm de <i>Citocromo b5</i> de <i>G. duodenalis</i> se modula diferencialmente por condiciones de hierro	108
25	La expresión del RNAm de <i>Glucosamina 6 fosfato desaminasa</i> de <i>G. duodenalis</i> se modula diferencialmente por condiciones de hierro	109
26	La expresión del RNAm de <i>Subtilisina</i> de <i>G. duodenalis</i> se modula diferencialmente por condiciones de hierro	110
27	Delimitación de secuencias de <i>G. duodenalis</i> que codifican a proteínas de virulencia, ribosomales, del citoesqueleto y del metabolismo	114
28	Predicción de estructuras tallo-burbuja en RNAm de <i>G. duodenalis</i> que codifican proteínas de virulencia	122
29	Predicción de estructuras tallo-burbuja en RNAm de <i>G. duodenalis</i> que codifican proteínas de virulencia	123
30	Predicción de estructuras tallo-burbuja en RNAm de <i>G. duodenalis</i> que codifican proteínas ribosomales	131
31	Predicción de estructuras tallo-burbuja en RNAm de <i>G. duodenalis</i> que codifican proteínas ribosomales	132
32	Predicción de estructuras tallo-burbuja en RNAm de <i>G. duodenalis</i> que codifican proteínas ribosomales	133
33	Predicción de estructuras tallo-burbuja en RNAm de <i>G. duodenalis</i> que codifican proteínas del citoesqueleto	135
34	Predicción de estructuras tallo-burbuja en RNAm de <i>G. duodenalis</i> que codifican proteínas del metabolismo	137
35	Análisis en SIREs de la secuencia <i>Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase</i> (GL50803_114609) de <i>G. duodenalis</i>	141

36	Análisis en SIREs de la secuencia <i>Cathepsin L precursor</i> (GL50803_3169) de <i>G. duodenalis</i>	142
37	Análisis en SIREs de la secuencia de <i>Cathepsin L-like protease</i> (GL50803_3099) de <i>G. duodenalis</i>	143
38	Análisis en SIREs de la secuencia de <i>Hypothetical protein</i> (GL50803_113303) de <i>G. duodenalis</i>	144
39	Análisis en SIREs de la secuencia de <i>Ribosomal protein L7a</i> (GL50803_17244) de <i>G. duodenalis</i>	145
40	Análisis en SIREs de la secuencia de <i>Ribosomal protein L12</i> (GL50803_14938) de <i>G. duodenalis</i>	146
41	Análisis en SIREs de la secuencia de <i>Actin-related protein</i> (GL50803_8726) de <i>G. duodenalis</i>	147
42	Posible mecanismo de regulación tipo IRE/IRP en <i>G. duodenalis</i>	148

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Casos nuevos de giardiasis de los Estados Unidos Mexicanos 2025	14
2	Especies o conjuntos de <i>Giardia</i>	17
3	Efectos fisiopatológicos principales de <i>G. duodenalis</i> y sus mecanismos	37
4	Hemo proteínas de <i>G. duodenalis</i>	50
5	Variantes de la frecuencia consenso del inicio de transcripción	53
6	Proteínas reguladas positivamente en elevadas concentraciones de hierro (Fe ²⁺)	57
7	Valores hematológicos antes y después del tratamiento de 102 niños con giardiasis	61
8	Oligonucleótidos diseñados para ensayos de RT-PCR	94
9	Delimitación de secuencias de <i>G. duodenalis</i> que codifican para proteínas de virulencia	118
10	Delimitación de secuencias de <i>G. duodenalis</i> que codifican para proteínas ribosomales	124
11	Delimitación de secuencias de <i>G. duodenalis</i> que codifican para proteínas del citoesqueleto	134
12	Delimitación de secuencias de <i>G. duodenalis</i> que codifican para proteínas del metabolismo	136
13	Estructuras IRE-like predichas por el servidor web SIRES de algunos RNAm de <i>G. duodenalis</i>	140

I RESUMEN

Las infecciones parasitarias representan un gran problema de salud pública para la población ocasionando afectaciones económicas a nivel mundial. *Giardia duodenalis* es un protozooario que causa giardiasis, una de las infecciones intestinales más frecuente sobre todo en niños, personas inmunocomprometidas y adultos mayores, provocando complicaciones como el “síndrome de mala absorción de nutrimentos”, síndrome de intestino irritable y disbiosis. Su infección presenta una incidencia del 10 al 15% a nivel mundial, representando una de las causas más frecuentes de brotes diarreicos. Se han reportado aproximadamente 1000 millones de casos de giardiasis anuales, así como 2.5 millones de muertes al año por diarrea. En cuanto a los mecanismos de patogenicidad, utiliza la citoadherencia, citotoxicidad y evasión de la respuesta inmune para lo cual expresa diversos factores de virulencia, sin embargo, poco se sabe de los mecanismos de regulación de dichos genes. El hierro es un catión importante para la sobrevivencia de todos los seres vivos, incluyendo los protozoarios. En otros parásitos con organelos análogos de mitocondria como *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica*, evolutivamente cercanos a *Giardia*, se ha reportado que el hierro afecta el crecimiento, los mecanismos de patogenicidad y regula la expresión de genes de virulencia; el mecanismo recientemente reportado ocurre al nivel postranscripcional y es de tipo IRE/IRP (Iron Responsive Element/Iron Regulated Protein). Los IREs son estructuras secundarias, de tallo-burbuja, conservadas que se encuentran en las regiones no traducidas (UTR) de los ARNm; y las IRPs son proteínas citoplasmáticas bifuncionales que se unen a estas estructuras en condiciones de bajo hierro permitiendo o inhibiendo la traducción del ARNm que contenga al IRE, dependiendo de la localización de dicha estructura (5' o 3'). Existen reportes que muestran gran necesidad de hierro por *G. duodenalis*, ya que estudios con niños diagnosticados con Giardiasis muestran valores de hemoglobina bajos que se restablecen después de un tratamiento con antiparasitarios. Sin embargo, el efecto del hierro en el crecimiento y virulencia de *Giardia* no han sido estudiados. Por lo anterior, el objetivo de este proyecto fue estudiar el efecto del hierro en la patogenicidad de *G. duodenalis* y su posible mecanismo de regulación basado en la presencia de estructuras tallo burbuja. Para ello, se crecieron parásitos en diferentes concentraciones de hierro a diferentes tiempos de incubación y se determinó su crecimiento poblacional. Los resultados muestran que el parásito puede adaptarse a las diferentes condiciones de hierro en el medio; sin embargo, la

condición de bajo hierro afecta la viabilidad dependiendo del tiempo de cultivo. Para determinar el efecto del hierro en los mecanismos de citoadherencia y citotoxicidad necesaria para su patogenicidad, se interaccionaron dichos cultivos con líneas celulares de intestino humano. Los resultados preliminares mostraron una mayor adherencia y daño a las células intestinales en condiciones altas de hierro. Por otra parte, se determinó la expresión diferencial por hierro de algunos factores de virulencia mediante ensayos de RT-PCR utilizando el ARN de los cultivos del parásito crecidos en las diferentes condiciones de hierro, observándose regulación de *Actina* (GL50803_40817), *Citocromo b5* (GL50803_9089), *Glucosamina 6 fosfato desaminasa* (GL50803_10839) y *Subtilisina* (GL50803_114625). Finalmente, analizamos el genoma de *Giardia* en busca de estructuras tallo burbuja en los diferentes grupos de ARNm que codifican para proteínas de virulencia, ribosomales, del citoesqueleto y metabólicas. Interesantemente, en los diferentes grupos de ARNms, a los cuales se les delimitó su región no traducida, se formaron estructuras tallo burbuja fisicoquímicamente estables. En conclusión, los resultados mostrados en este trabajo sugieren que el hierro afecta los mecanismos de patogenicidad del parásito, así como la expresión de genes de virulencia, y el probable mecanismo de regulación está mediado por estructuras tallo burbuja presentes en las regiones UTRs de sus ARNm.

Palabras clave: *Giardia duodenalis*, hierro, crecimiento, adhesión, RT-PCR, sistema IRE/IRP.

ABSTRACT

Infectious diseases represent a serious public health problem for the population, causing great economic losses worldwide. *Giardia duodenalis* is the protozoan that causes giardiasis, one of the most common intestinal infections, especially in children, immunocompromised individuals and older adults causing complications such as "nutrient malabsorption syndrome", irritable bowel syndrome and dysbiosis. Its infection has a distribution of 10 to 15% of the world population, being one of the most frequent causes of diarrheal outbreaks. It has been estimated that about 1 billion cases of giardiasis occur annually resulting in 2.5 million deaths annually from diarrheal disease. Regarding the mechanisms of pathogenicity, *Giardia* utilizes cytoadherence, cytotoxicity, and evasion of the immune response, for which it expresses various virulence factors; however, the mechanisms of gene regulation remain under study. Iron is an important element for the survival of all living organisms, including protozoan parasites. In protozoa such as *Trichomonas vaginalis* and *Entamoeba histolytica*, it has been reported that iron affects growth, pathogenicity mechanisms and regulates the expression of virulence genes; the proposed mechanism is at the post-transcriptional level, the IRE/IRP system (Iron Responsive Element/Iron Regulated Protein). IREs are conserved stem-loops structures found in untranslated regions (UTRs) of virulence mRNAs; and IRPs are cytoplasmic proteins that can bind these structures under low iron conditions, promoting or repressing translation of mRNAs depending on the location of the IRE (5' or 3'). It has been reported that there is a great need for iron by *G. duodenalis*, since studies with children with Giardiasis show low hemoglobin values that are restored after treatment with antiparasitic. However, the effect of iron on *Giardia* growth and virulence remains under study. Therefore, the objective of this work was to study the iron effect in the pathogenicity of *G. duodenalis* and its possible regulation mechanism based on the presence of stem-loops structures. Thus, parasites were grown in different iron concentrations at different incubation times and their growth and viability were determined. These results show that the parasite is capable to adapt to the different iron conditions in the medium, however, the low iron condition affects viability in a time-dependent manner. To determine the effect of iron on the cytoadherence and cytotoxicity mechanisms necessary for its pathogenicity, parasite cultures interacted with human intestinal cell lines. These results showed higher percentage of adhesion and damage to intestinal cells under high iron conditions. On the other hand,

differential gene expression by iron of some virulence factors was determined by RT-PCR assays using RNA from parasite cultures grown under different iron conditions, suggesting iron regulation in *Actin* (GL50803_40817), *Cytochrome b5* (GL50803_9089), *Glucosamine 6 phosphate deaminase* (GL50803_10839) and *Subtilisin* (GL50803_114625). Finally, we analyzed the *Giardia* genome in search of IRE-like structures in the several groups of mRNAs that encode for virulence, ribosomal, cytoskeletal, and metabolic proteins. Interestingly, in the different groups of mRNAs, whose non-translated region was delimited, stable physicochemical structures were formed. In conclusion, these data suggest that iron affects the pathogenicity mechanisms of the parasite, as well as the expression of virulence genes, and the probable regulation mechanism is mediated by stem-loop structures located in UTRs of their mRNA.

Keywords: *Giardia duodenalis*, iron, growth, adhesion, RT-PCR, IRE/IRP system.

II INTRODUCCIÓN

Las enfermedades gastrointestinales desde siempre han sido una de las primeras causas de muerte a nivel mundial. Es por ello, que se les considera un problema de salud pública, afectando a personas de cualquier condición social y edad, aunque los más vulnerables son los ancianos y los niños (Hernández y col., 2011; Adam, 2021), especialmente en los países en desarrollo y en personas con comorbilidades (Kuick y col., 2004; Zahedi y col., 2021). Se ha reportado que en las regiones de Asia, África y Latinoamérica la probabilidad de muerte de niños menores de cinco años puede llegar al 50%, esto depende de factores socioeconómicos y nutricionales, sin embargo, esto los hace más susceptibles a las enfermedades infecciosas. Entre las enfermedades gastrointestinales infecciosas se mencionan las causadas por bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*, protozoarios como *Giardia duodenalis* y amibas (*Entamoeba*); y virus (Rotavirus y virus Norwalk) adquiridos al consumir alimentos y agua contaminados con materia fecal principalmente (Vila y col., 2009; Hernández y col., 2011; Zahedi y col., 2021).

Giardia duodenalis (Sinónimos: *Giardia lamblia*, *Giardia intestinalis*) es el agente causal de la giardiasis, una de las infecciones parasitarias más prevalentes a nivel global, con aproximadamente 280 millones de casos anuales (Bermúdez y Chinea, 2025), siendo los brotes diarreicos una de las causas más frecuentes a nivel mundial. Muchos casos de infecciones por *G. duodenalis* son asintomáticas sobre todo en las regiones altamente endémicas (Veenemans y col., 2011; Ignatius y col., 2012; Danquah y col., 2014; Zahedi y col., 2021). Sin embargo, una infección crónica puede desarrollar complicaciones como desnutrición por mala absorción de nutrimentos, retraso en el crecimiento en niños, y en adultos mayores la reducción en las funciones cognitivas (Berkman y col., 2002; Danquah y

col., 2014), de hecho, a cualquier edad pueden presentarse síndrome de intestino irritable y disbiosis a causa de *Giardia* (Singer y col., 2020). Aunque la presencia de *G. duodenalis* es más frecuente en lugares con malas condiciones sanitarias, es común en todo el mundo debido a la globalización de los viajes, así como el suministro de alimentos, factores de estilo de vida, hacinamiento, mala calidad del agua y el cambio climático (Yoshida y col., 2011; Zahedi y col., 2021). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que *Giardia* es uno de los parásitos que más se esparce en humanos y animales domésticos, lo cual es un problema de salud pública en países tanto desarrollados como en vías de desarrollo (CDC, 2010; Feng y Xiao, 2011; Cernikova y col., 2018; Leung y col., 2019). Se ha reportado que alrededor de 280 millones de personas se infectan cada año, principalmente en África, Asia y Latinoamérica (Mark-Carew y col., 2013; Fink y col., 2020; Bermúdez y Chinae, 2025), sin embargo, la infección ocurre a nivel mundial. La seroprevalencia en México es de 55.3% (Cedillo-Rivera y col., 2009; Martínez-Gordillo y col., 2014). *Giardia* es uno de los protozoarios más comunes que causa síntomas de diarrea a nivel mundial, notificándose más de 300 millones de casos cada año, sobre todo en países en vías de desarrollo o en países de bajos ingresos (Cernikova y col., 2018; Lagunas-Rangel y col., 2021), cabe aclarar que es más común en dichos países, sin embargo, se presenta a nivel mundial.

En nuestro país, la secretaria de Salud ha reportado un total de 6,621 casos de los cuales 197 corresponden al estado de Sinaloa, esto no coloca en décimo sexto lugar nacional en casos de giardiasis (Cuadro 1) (SSA, 2025). Cabe señalar que las cifras pueden ser subestimadas porque muchos casos no se reportan o son mal diagnosticados.

Este parásito ocupa un punto de transición evolutiva entre los procariontes y eucariontes, por lo que es gran interés biológico. Presenta en su ciclo de vida dos estadios;

un trofozoíto flagelado y un quiste. La infestación se inicia por la ingesta de alimentos o agua con presencia de quistes, siendo esta la forma infectiva, así como el contacto directo fecal-oral (Que y col., 1996; Adam, 2001; Carpenter y col., 2012). El quiste es relativamente inerte, y puede sobrevivir en una gran diversidad de factores ecológicos y ambientales. El proceso de exquistación ocurre después de exponerse al ambiente ácido del estómago o condiciones hostiles, luego los trofozoítos se diferencian en el intestino delgado. La forma vegetativa es el trofozoíto, en el intestino delgado se duplica, se adhiere al duodeno y libera factores de virulencia ocasionando el síndrome de malabsorción de nutrimentos y diarrea. Posteriormente cuando los trofozoítos se exponen a los fluidos biliares ocurre el proceso de enquistamiento. En este proceso, los trofozoítos se diferencian en quistes en el yeyuno, y finalmente son arrojados por las heces, terminando así su ciclo biológico (Que y col., 1996; Adam, 2001; Carpenter y col., 2012). El cuadro clínico de la infección puede ser desde una infección asintomática o bien con síntomas como diarrea con mal olor, dolor abdominal que se ve agravada por comer, flatulencia, vómitos, anorexia y pérdida de peso; hasta cuadros graves con diarrea crónica acompañada con síndrome de malabsorción de nutrimentos donde hay períodos de estreñimiento o diarrea con esteatorrea, disbiosis y deficiencia de lactasa (Hill, 1993; Rana y col., 2005; Martínez-Gordillo y col., 2014).

La patogénesis de la giardiasis es un proceso de múltiples factores donde se involucra la adhesión de los trofozoítos por medio del disco de succión ventral a las células epiteliales (Jenkins y col., 2009), empleando fuerzas mecánicas no específicas y/o interacciones específicas con lectinas (Lev y col., 1986), y anexinas (Weilan y col., 2003). Con lo anterior, se genera una lesión en las microvellosidades del epitelio intestinal por la interacción entre los enterocitos y el disco de succión de *Giardia* (Erlandsen y col., 1988), ocasionando una

alteración en el equilibrio celular iónico provocando así la característica diarrea. En el transcurso del proceso se producen una serie de sucesos que favorecen la interacción de las células epiteliales y el parásito, sin embargo, se tiene poco conocimiento sobre las moléculas que se expresan en dicha conexión. Algunas proteasas de tipo cisteína son liberadas por el trofozoíto (Rodríguez-Fuentes y col., 2006; Rascón y McKerrow, 2013; Adam, 2021), la principal función de las cisteín proteasa es en los procesos de enquistamiento y desenquistamiento (Rascón y McKerrow, 2013); sin embargo, se necesitan más estudios para entender la patogenia de este parásito. Además, se ha reportado un aumento del síndrome del intestino permeable ocasionada debido a las alteraciones en las uniones oclusivas (Buret y col., 2002; Troeger y col., 2007). La forma vegetativa de *Giardia* para invadir un entorno adverso ha cambiado, por lo cual, este parásito es hábil para manipular y transformar su ambiente mediante factores como: el contacto de *Giardia* con las proteínas de superficie variables (VSP) para modular las interacciones proteínas-proteínas (Singer y col., 2001; Leung y col., 2019; Singer y col., 2020), la reducción de producción de óxido nítrico en las células epiteliales (Eckman y col., 2000), así como la variación antigénica para evitar el ataque del sistema inmune (Nash, 2002) y la disminución de hierro y zinc (Luján y col., 1995; Leung y col., 2019).

La regulación de la expresión de genes de la respuesta inmune puede darse por interacciones oclusivas entre las células Caco2 y *Giardia* (Roxström-Lindquist y col., 2005; Leung y col., 2019). Como se ha mencionado, este parásito produce un síndrome de malabsorción de agua, glucosa y sodio. Los trofozoítos liberan lectinas, proteinasas y una posible enterotoxina de 58 kDa que ocasionan daño citotóxico (Kaur y col., 2001; Shant y col., 2004; Humen y col., 2011). *Giardia* requiere de una gran cantidad de metabolitos

preformados y de nutrimentos para su desarrollo, además, no tiene citocromos, ni presenta las rutas metabólicas como la de la fosforilación oxidativa y ácidos tricarboxílicos por la carencia de mitocondrias, no obstante, presenta mitosomas que podrían desarrollar una función análoga de las mitocondrias debido a que se han reportado proteínas que a través de grupos hierro-azufre realizan el transporte de electrones, así como una enzima piruvato oxidorreductasa (PFO) que junto con la ferredoxina se encargan de activar a los derivados del nitroimidazol, uno de los antiparasitarios empleados contra *Giardia* (Townson y col., 1996; Tovar y col., 2003; Dolezal y col., 2005; Leung y col., 2019). Un hallazgo interesante de este parásito es su gran requerimiento por el hierro, por lo tanto, este catión podría influir en la virulencia de *Giardia* (Suchan y col., 2003; Olivares y col., 2004; Al-Mekhlafi y col., 2005; Monajemzadeh y Monajemzadeh, 2008) similar a lo que ocurre en otros protozoarios (Soto-Castro y col., 2017; Gastelum-Martínez y col., 2018), además, hay muy pocos estudios sobre el efecto del hierro en el crecimiento y modulación de genes de este protozoario.

Un catión primordial para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos es el hierro, sobre todo en los parásitos protozoarios. La obtención del hierro se regula para impedir la toxicidad debido a la formación de radicales libres. Además, algunos protozoarios han presentado proteínas de unión a hemoglobina, transportadores, reductasas, inclusive por medio de la lisis de células hospederas. Algunos ejemplos de microorganismos con esta regulación de obtención de hierro son los parásitos protozoarios *E. histolytica* y *T. vaginalis*; algunas de las moléculas que intervienen en el proceso de adhesión a la célula blanco, moléculas implicadas en el crecimiento y metabolismo basal y la expresión de factores de virulencia son reguladas por este metal (Álvarez-Sánchez y col., 2000; Park y col., 2001; Hernández-Gutiérrez y col., 2003; Hernández-Gutiérrez y col., 2004; Lee y col., 2008; Mach

y Sutak, 2020). Nuestro grupo de colaboradores reportó que en *T. vaginalis* existen algunas proteínas reguladas por este catión, además, la presencia de un mecanismo alternativo por dicho metal a un nivel postranscripcional tipo IRE/IRP (Iron Responsive Element/Iron Regulatory Proteins) parecido al de eucariontes superiores (Solano-González y col., 2007; Torres-Romero y Arroyo, 2009; Calla-Choque y col., 2014; Arroyo y col., 2015; León-Sicairos y col., 2023). En el sistema tipo IRE/IRP, los elementos de respuesta al hierro (IREs), son estructuras tallo-burbuja que se localizan en las regiones no traducidas (UTR) de los ARN o RNA mensajeros (por sus siglas en inglés) que codifican proteínas relacionadas con la homeostasis del hierro, dichas estructuras tallo-burbuja interactúan con las proteínas citoplásmicas reguladoras de hierro (IRP). De acuerdo con los niveles de hierro presentes en la célula la unión de estos elementos puede estabilizar el RNAm o bien, reprimir la traducción dependiendo también de la localización del IRE.

En el parásito *G. duodenalis* no se ha evidenciado si el hierro puede ser metabolizado y si puede tener un efecto en su crecimiento y patogenicidad, sin embargo, existen evidencias para hipotetizar que el hierro es esencial para estos aspectos tales como la presencia de mitosomas que contienen proteínas con grupos hierro-azufre, la presencia de secuencias que codifican para deshidrogenasas dependientes de hierro, de PFO, de superóxido reductasa y otros ortólogos; la necesidad del hierro ya mencionada para su sobrevivencia y la presencia de hierro en el medio de cultivo utilizado para su crecimiento (Mach y Sutak, 2020). Además, previamente encontramos estructuras tallo-burbuja en RNAm de diferentes genes lo que sugiere regulación tipo IRE/IRP (Plata-Guzmán, 2015) y por lo tanto pudiera ser que el hierro también juegue un papel importante en la virulencia del parásito.

III REVISIÓN DE LITERATURA

A Giardia duodenalis

1 Aspectos generales de *Giardia duodenalis*

Las infecciones del tracto gastrointestinal por parásitos protozoarios ocurren a nivel mundial y tienen tasas de morbilidad y mortalidad significativas (Leung y col., 2019; Zahedi y col., 2021). Las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en el mundo y en México. Por ello, se les considera un problema de salud pública a nivel mundial, que afecta a personas de cualquier edad y condición social, aunque los grupos más vulnerables son los niños y los ancianos (Hernández y col., 2011; Leung y col., 2019).

Las infecciones gastrointestinales han sido desde siempre una de las causas más importantes de morbimortalidad entre los lactantes y niños a nivel mundial. Se ha reportado que en Asia, África y Latinoamérica la probabilidad de muerte de un niño menor de cinco años es del 50%, aunque esto depende de factores socioeconómicos y nutricionales. Las enfermedades gastrointestinales infecciosas más comunes son causadas por bacterias (principalmente *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*), parásitos (*Giardia lamblia* y amibas), y virus (Rotavirus y virus Norwalk) al consumir alimentos y agua contaminados con materia fecal (Vila y col., 2009; Hernández y col., 2011).

Los miembros del género *Giardia* son protozoos flagelados que pertenecen a la clase Zoomastigophorea y al orden Diplomonadida. Suelen afectar a los tubos intestinales de numerosas especies vertebradas. *Giardia duodenalis* (Sinónimos: *G. lamblia*, *G. intestinalis*) coloniza el intestino delgado superior del humano (duodeno) para producir giardiasis, infección parasitaria muy común en el mundo, de distribución cosmopolita, que constituye

un problema de salud pública especialmente en países en vías de desarrollo (Halliez y Buret, 2013). La giardiasis puede ser asintomática (en la mayoría de los casos y especialmente en adultos) o producir cuadros de diarrea aguda o crónica y síndrome de mala absorción de nutrimentos con pérdida de talla y peso, lo cual es muy frecuente en infantes (Vázquez-Tsuji y Campos-Rivera, 2009).

G. duodenalis es uno de los protozoarios intestinales más frecuentes en todo el mundo, aunque uno de los síntomas gastrointestinales en particular es la diarrea, muchas infecciones de las regiones altamente endémicas son asintomáticas (Veenemans y col., 2011). Sin embargo, en la infección crónica se puede desarrollar la desnutrición, retraso en el crecimiento; y en adultos mayores, la reducción en las funciones cognitivas (Berkman y col., 2002).

La malabsorción se considera el principal determinante patogénico, pero los mecanismos subyacentes no han sido completamente aclarados (Cotton y col., 2011; Singer y col., 2020). La Giardiasis, es decir, la infección sintomática causada por *G. duodenalis*, se ha asociado con una alteración en la absorción intestinal del hierro y las concentraciones de hierro en suero son reducidos en niños (de Vizia y col., 1985; Ertan y col., 2002; Abou-Shady y col., 2011).

En este contexto, la giardiasis, causada por *G. duodenalis* es una parasitosis cosmopolita, de alta incidencia en países en vías de desarrollo y se ha asociado a brotes epidémicos importantes en Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos de Norteamérica (Lane y Lloyd, 2002; Busatti y col., 2013). La giardiasis presenta una distribución muy amplia con 10-15% de la población mundial infectada en promedio (Leung y col., 2019).

Su mayor prevalencia se encuentra en zonas tropicales y subtropicales, donde afecta hasta el 30% de los adultos (Said y col., 2012; Goyal y col., 2013). Esta parasitosis es más frecuente en niños de 1-4 y 5-9 años, así como adultos de 35-39 años comúnmente los padres de familia (Cacciò y col., 2005).

El creciente interés en el estudio de la giardiasis se explica, entre otras razones, por ser una de las causas más frecuentes de brotes diarreicos a nivel mundial. Se ha estimado que cerca de 280 millones de personas son infectadas anualmente, principalmente en Latino América, Asia y África (Mark-Carew y col., 2013, Fink y col., 2020). En México la seroprevalencia es de 55.3% (Cedillo-Rivera y col., 2009; Martínez-Gordillo y col., 2014). En nuestro país, hasta la semana 53 del año 2025 (Cuadro 1) la secretaria de Salud ha reportado un total de 6,621 casos de los cuales 197 corresponden al estado de Sinaloa colocándonos en décimo sexto lugar nacional en casos de giardiasis (SSA, 2025). Aunque *G. duodenalis* es más frecuente en lugares con malas condiciones sanitarias, es común en todo el mundo debido a la globalización de los viajes, el suministro de alimentos, factores de estilo de vida y el cambio climático (Yoshida y col., 2011; Leung y col., 2019).

Cuadro 1. Casos nuevos de giardiasis de los Estados Unidos Mexicanos 2025

Entidad Federativa	Semana 53	Mujeres	Hombres
Aguascalientes	-	3	4
Baja california	-	23	42
Baja california Sur	1	30	41
Campeche	1	41	60
Coahuila	-	11	7
Colima	8	162	155
Chiapas	6	391	465
Chihuahua	-	16	21
Ciudad de México	1	128	151
Durango	1	69	74
Guanajuato	-	8	13
Guerrero	5	272	337
Hidalgo	-	32	55
Jalisco	5	128	129
México	3	228	267
Michoacán	-	154	133
Morelos	1	21	22
Nayarit	1	113	105
Nuevo León	1	34	37
Oaxaca	2	128	232
Puebla	-	41	73
Querétaro	-	7	10
Quintana Roo	4	69	71
San Luis Potosí	2	143	119
Sinaloa	-	95	102
Sonora	4	110	109
Tabasco	-	109	115
Tamaulipas	-	201	207
Tlaxcala	-	4	6
Veracruz	3	135	136
Yucatán	-	123	153
Zacatecas	-	62	70
TOTAL	49	3094	3527

FUENTE: SINAVE/DGE/Salud 2025 (SSA, 2025).

2 Aspectos históricos

La historia de la protozoología nació a mediados del siglo XVII, cuando Anton Van Leeuwenhoek; comerciante holandés de telas y tallador aficionado de lentes observó por primera vez a través de los rudimentarios microscopios fabricados por él mismo, un organismo que por su descripción muy probablemente correspondía a *G. duodenalis* (Vázquez-Tsuji y Campos-Rivera, 2009). Posteriormente, el profesor Vilém Lambl en 1859 denominó a este microorganismo con el nombre de *Cercomonas intestinalis* y después en 1881 lo denominó *Lambliia intestinalis* (Núñez-Fernández y col., 2004; Vázquez-Tsuji y Campos-Rivera, 2009). Años después en 1902 el parasitólogo norteamericano Charles Wardell Stiles decidió nombrarlo como *G. duodenalis*, seguido por Kofoid en 1915 quien propuso el nombre de *G. lambliia* y Christias, quien en 1920 propuso el nombre de *G. entérica* (Adam, 2001; Vázquez-Tsuji y Campos-Rivera, 2009). *Giardia* actualmente es conocida por tres nombres (*G. duodenalis*, *G. intestinalis* y *G. lambliia*), la controversia continúa y en la literatura se le cita como *Giardia lambliia* por los latinoamericanos y norteamericanos, *Lambliia intestinalis* por los europeos orientales y *Giardia intestinalis* o *G. duodenalis* por los europeos occidentales (Vázquez-Tsuji y Campos-Rivera, 2009).

3 Taxonomía de *G. duodenalis*

Los miembros del género *Giardia* son protozoos flagelados que pertenecen a la clase Zoomastigophorea y al orden Diplomonadida. Suelen afectar a los tubos intestinales de numerosas especies vertebradas (Thompson y Monis, 2004). Las afinidades filogenéticas de dicho parásito han sido objeto de debate durante muchos años. *Giardia* presenta una organización intracelular muy simple y se ha propuesto que representa un linaje eucariótico de ramificación temprana, que diverge antes de la adquisición de mitocondrias (Simpson y

col., 2002). En consecuencia, *Giardia* ha llegado a ser un microorganismo clave en los intentos de comprender la evolución de las células eucarióticas (Thompson, 2008; Thompson y Monis, 2004). La técnica molecular PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), permitió identificar a las especies de *Giardia* morfológicamente idénticas. En consecuencia, ahora están identificados un gran número de especies y genotipos de *Giardia* que difieren principalmente en su gama de hospedadores (Thompson y Monis, 2004; Caccio y col., 2005; Traub y col., 2005; Smith y col., 2006; Thompson, 2008). La taxonomía actual de *Giardia* (Cuadro 2) ha sido revisada extensamente. La nomenclatura más ampliamente aceptada en la actualidad con respecto a los genotipos que han sido caracterizados es ‘conjunto o colección’, si bien se ha propuesto una taxonomía revisada (Thompson y Monis, 2004; Caccio y col., 2005). Algunas especies y genotipos/conjuntos parecen estar limitados a especies o tipos de hospedadores particulares (por ejemplo, *Giardia* conjuntos C/D (*G. canis*) y E (*G. bovis*) en perros y ganadería, respectivamente, mientras que otros tienen amplias gamas de hospedadores, incluyendo a humanos (por ejemplo, *G. duodenalis* conjuntos A y B; y poseen, en consecuencia, significación zoonótica. *G. duodenalis* (sinónimos: *G. intestinalis*; *G. lamblia*) siendo la única especie hallada en el humano (Thompson, 2008; Yaoyu y Xiao, 2011; Leung y col., 2019).

Cuadro 2. Especies o Conjuntos de *Giardia*

Espece /conjunto	Hospedador
<i>G. duodenalis</i> /conjunto A	Humanos y otros primates, perros, gatos, ganadería, roedores y otros mamíferos salvajes
<i>G. duodenalis</i> /conjunto B (<i>G. entérica</i>) ¹	Humanos y otros primates, perros
<i>G. agilis</i>	Anfibios
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. pisticci</i>	Aves
<i>G. ardeae</i>	Aves
<i>G. duodenalis</i> /conjunto C/D(<i>G. canis</i>) ¹	Perros
<i>G. duodenalis</i> /conjunto F (<i>G. cati</i>) ¹	Gatos
<i>G. duodenalis</i> /conjunto E (<i>G. bovis</i>) ¹	Ganado vacuno y otra ganadería ungulada
<i>G. duodenalis</i> /conjunto G (<i>G. simondi</i>) ¹	Ratas

(Tomado de: Thompson, 2008).

4 Morfología

Giardia es un protozooario microaerofílico, no invasivo, que se reproduce por fisión binaria en la superficie de intestino delgado y en su ciclo biológico presenta dos estadios: trofozoíto y quiste.

a Trofozoíto

El trofozoíto es el causante de la enfermedad y tiene una forma semejante a una pera atravesada longitudinalmente. La parte plana es la superficie ventral y el lado convexo es la superficie dorsal. El trofozoíto de *Giardia* mide alrededor de 12-15 micras de largo y 5-9 micras de ancho. En comparación con otros eucariontes, *Giardia* se caracteriza por poseer dos núcleos y carecer de mitocondrias, peroxisomas y un aparato de Golgi típico. El citoesqueleto incluye un cuerpo medio, cuatro pares de flagelos (anterior, ventral, posterior / lateral y caudal) y el disco adhesivo. El cuerpo medio tiene función conocida, pero su ubicación da al parásito la característica "sonrisa" que se observa después de la tinción con Giemsa. Los flagelos y el disco adhesivo (Figura 1) se componen de las proteínas del citoesqueleto clásicos como α -tubulina y β -tubulina junto con las proteínas de la familia de las giardinas (α -giardina, β -giardina, γ -giardina y δ -giardina), que es una familia única de *Giardia* (Elmendorf y col., 2003; Palm y col., 2005; Ankarklev y col., 2010; Leung y col., 2019). El parásito depende de su gran movilidad y presenta un fuerte apego a los enterocitos del intestino delgado y esto se logra por el disco adhesivo y el flagelo (Adam, 2001).

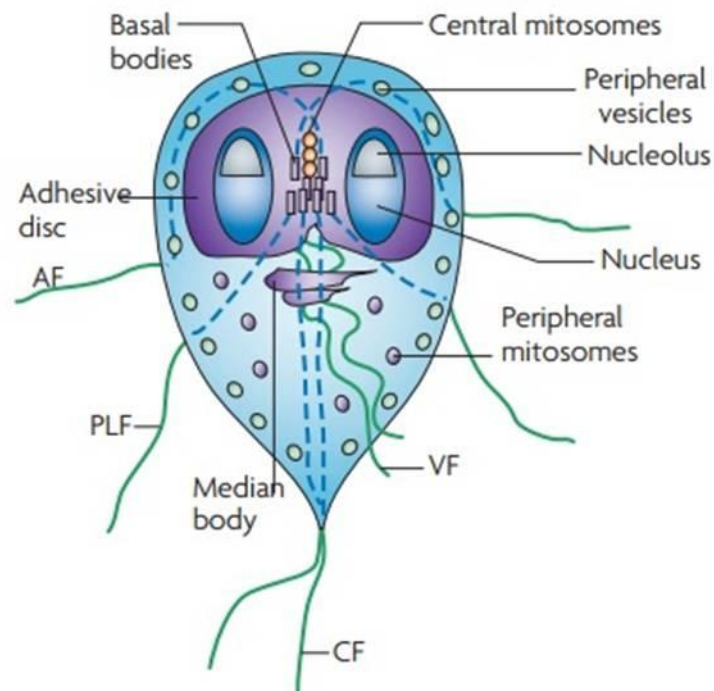


Figura 1. Morfología del trofozoíto de *G. duodenalis*. El trofozoíto de *Giardia* mide de 12-15 μm de largo y de 5-9 μm de ancho. Cuenta con 8 flagelos organizados en 4 pares: dos flagelos anteriores (AF), dos flagelos ventrales (VF), dos flagelos posteriores laterales (PLF) y dos flagelos caudales (CF). Los cuerpos basales son los sitios en los cuales los flagelos se originan. El cuerpo mediano es una estructura microtubular de función desconocida. El disco adhesivo es una estructura de fijación grande, rígida, compuesta por microtúbulos. Hay varios mitocondrios centrales y periféricos en la célula. Las vesículas periféricas son como vesículas lisosómicas que se encuentran debajo de la membrana plasmática en toda la célula. Adaptada de Ankarklev y col., (2010).

Además, este parásito se adhiere, desprende y mueve en su forma infectiva utilizando el citoesqueleto formado principalmente por proteínas como tubulina, giardina, actina, entre otras (Rivera y col., 2002). El disco adhesivo se ubica en la superficie ventral del trofozoíto abarcando tres cuartas partes de esta. El disco adhesivo es una estructura cóncava y bilobulada, de 0,4 μ de grosor máximo, esta estructura es rígida, y se encuentra fortalecida por microtúbulos y cintas fibrosas dorsales (que cursan desde los microtúbulos al citoplasma), se encuentra rodeada por un anillo de citoplasma contráctil (Figura 2). El disco adhesivo es el responsable de la capacidad del parásito de adherirse a las células epiteliales del hospedero actuando como una ventosa (Fonte, 2009).

Cuatro pares de flagelos emergen de cada trofozoíto: ventrales, anteriores, posteriores y caudales. Los flagelos, que son estructuras móviles responsables de la locomoción del parásito, la cual se da por la rotación alrededor de su eje longitudinal para crear una fuerza de propulsión que ocasiona que *G. duodenalis* puede alcanzar velocidades de 12-40 $\mu\text{m/s}$ (Lenaghan y col., 2011).

Los flagelos se originan en ocho blefaroplastos situados simétricamente y a corta distancia del borde anterior de la célula. Dichos bleferoplastos marcan el origen de los axonemas, lo cuales son organelos en forma de varilla recta que se disponen paralelamente y terminan en el extremo posterior. Los axonemas de todos los flagelos cursan distancias variables dentro del citoplasma antes de salir del cuerpo del protozoo, y los correspondientes al par de flagelos anteriores emergen lateralmente al área del disco adhesivo en el lado opuesto a su respectivo blefaroplasto (Fonte, 2009; Tay-Zavala, 2010).

Los cuerpos medianos son elementos únicos de *Giardia*, y su función aún no se define, han sido nombrados de diversas maneras por varios autores: cuerpos parabasales,

kinetoplastos y cuerpos cromatoidales. Sin embargo, los estudios de ultraestructura de alta resolución realizados niegan su participación en las actividades biológicas a las que aluden esas denominaciones, se encuentran situados encima de los axonemas de los flagelos caudales, inmediatamente detrás del disco adhesivo, se describen como un par de estructuras alargadas, de coloración oscura, ligeramente curvas, dispuestas de manera oblicua o transversal y muy próximas entre sí (Fonte, 2009).

Así mismo, es importante mencionar que la entidad patógena de *G. duodenalis* carece de mitocondrias y peroxisomas, y en su lugar presentan vestigios de estos organelos llamados mitosomas, los cuales son minúsculos ($<2\ \mu\text{m}$), y manifiestan una importante reducción de proteínas, presentan doble membranas y retienen la función mitocondrial: la biosíntesis de Fe/S y nucléolo (Heinz y Lithgow, 2013; Makiuchi y Nozaki, 2013).

Por su parte, carece de organelos como el retículo endoplásmico rugoso y Golgi, estos son sugeridos durante la secreción de componentes requerida para el enquistamiento, a través de marcadores específicos para estos organelos durante el proceso (Uribarren, 2015).

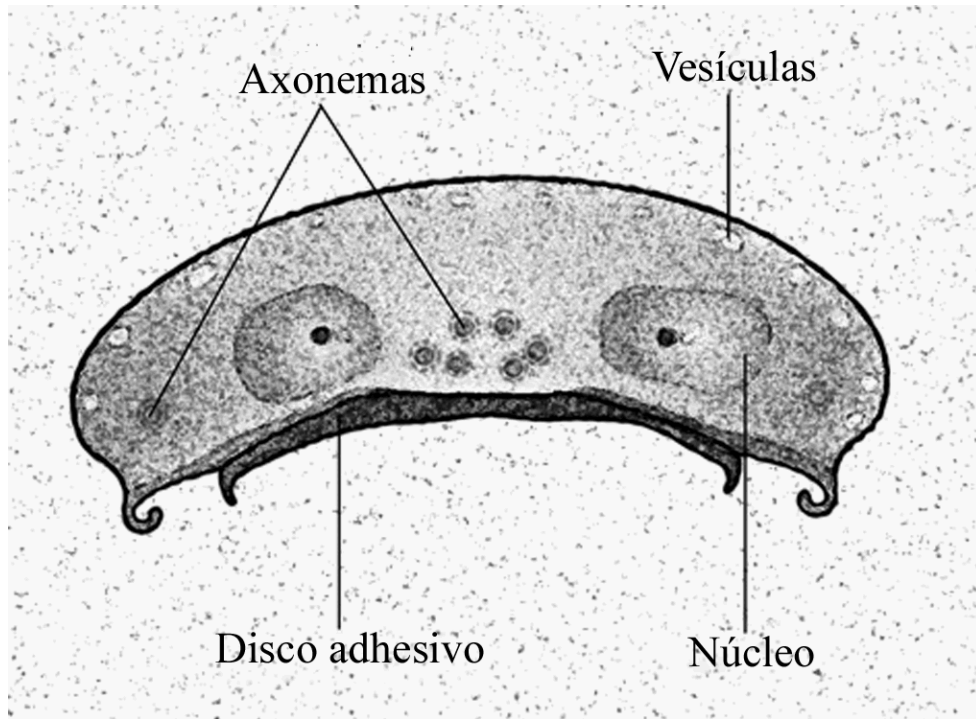


Figura 2. Diagrama de corte transversal de trofozoito de *G. duodenalis*. Al microscopio electrónico de transmisión (Fonte 2009).

b Quiste

Los quistes de *Giardia* tienen una morfología elipsoidal de 8-12 μm de largo y de 7-10 μm de ancho (Ankarklev y col., 2010). Poseen un citoplasma granular, fino, claramente separado de una pared quística de 0.3 μm de espesor adosada a la membrana plasmática del parásito (Figura 3). La pared del quiste es retráctil y su porción externa presenta una estructura fibrilar compuesta por 7 a 20 filamentos y se encuentra compuesta principalmente por N-acetilgalactosamina (GalNAc), mientras que la porción interna es membranosa. Ambas se encuentran separadas por el espacio periplasmático (Montoya-Orozco y Roldán-Aristizábal, 2007).

En el citoplasma del quiste se observan también ocho axonemas, dos láminas de microtúbulos (10 a 20 microtúbulos cada una) numerosos ribosomas, vacuolas, y fragmentos del disco ventral (Rivera y col., 2002; Tay-Zavala, 2010; Uribarren, 2015). Por el contrario, no se observan mitocondrias, aparato de Golgi, ni retículo endoplásmico rugoso (Montoya-Orozco y Roldán-Aristizábal, 2007).

Los quistes inmaduros o de reciente formación tienen dos núcleos y se denominan prequistes, y los quistes maduros tienen cuatro núcleos. Los núcleos suelen localizarse en el extremo del quiste. La actividad metabólica de los quistes es sólo del 10 al 20% de la desarrollada por los trofozoitos (Montoya-Orozco y Roldán-Aristizábal, 2007).

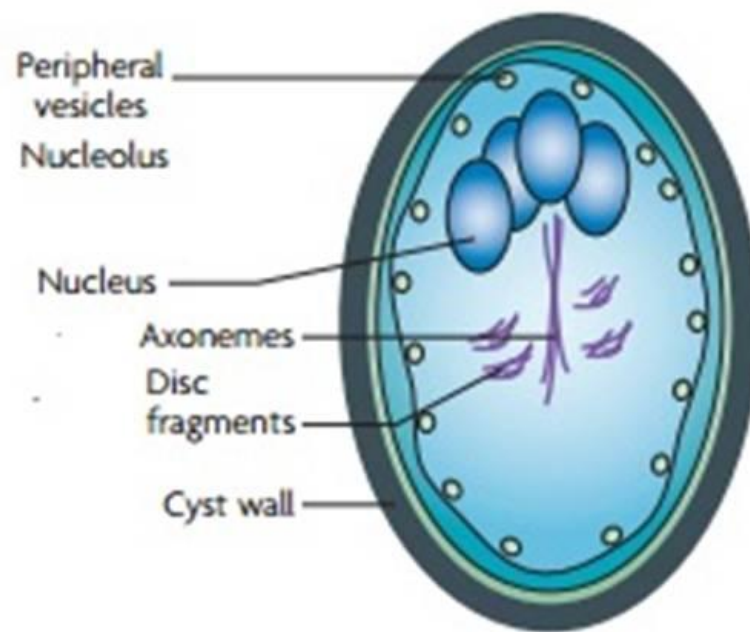


Figura 3. Morfología del quiste de *G. duodenalis*. El quiste tiene 4 núcleos tetraploides. El disco ventral y los flagelos se desmontan y forman fragmentos en el quiste. Adaptada de Ankarklev y col., (2010).

5 Ciclo Biológico

G. duodenalis tiene un ciclo de vida simple con dos estadios que permiten su sobrevivencia. La forma patogénica conocida como trofozoíto se adhiere a las células del intestino ocasionando los síntomas de la giardiasis, mientras que el quiste representa la forma infectiva. Así, este parásito presenta dos procesos de diferenciación que se desarrollan en el hospedador: el desenquistamiento y el enquistamiento. La infección se inicia mediante transmisión directa persona-persona y oro-fecal por la ingestión de quistes que se encuentran en agua o alimentos contaminados con ellos y por transmisión homosexual (Craun, 1986; Adam, 2001; Adam 2021).

Una vez que el quiste se localiza en el estómago del hospedero se inicia el desenquistamiento desencadenado por el medio ácido de este órgano así como por la actividad de las enzimas hidrolíticas pancreáticas quimiotripsina y tripsina del huésped, aunque en este proceso también ayudan las cisteín proteinasas producidas por las vesículas periféricas de *G. duodenalis*, la fosforilización y desfosforilización de proteínas de la pared del quiste del parásito, y el catión Ca^{2+} participando como ion de señalización (Núñez-Fernández y col., 2004; Esch y Petersen, 2013).

Este proceso culmina en el duodeno y finaliza cuando se rompe la pared quística y emerge del quiste una masa tetranucleada de protoplasma denominada excizoito (Bernander y col., 2001). Dos trofozoítos serán generados a partir de un solo quiste y éstos se podrán adherir a las microvellosidades intestinales del duodeno para dividirse por fisión binaria, colonizando la mucosa intestinal. El enquistamiento se realiza principalmente en el yeyuno, probablemente por la acción de la bilis (Adam, 2001; Bazán-Tejeda y col., 2008). Los quistes son expulsados por el huésped en las heces y permanecen en estado de latencia en el medio

ambiente. Debido a las características, particularmente de la pared del quiste, puede sobrevivir en el medio externo aún y cuando se presentan variaciones drásticas de pH (Adam, 2001; Argüello-García y col., 2002). Además, pueden persistir durante meses en suelo o agua, estimándose que la dosis infecciosa para *G. duodenalis* es de 10 quistes (Esch y Petersen, 2013).

La virulencia del parásito depende de factores del huésped y factores del propio parásito, el disco adhesivo proporciona una adhesión no específica a los enterocitos, la virulencia del trofozoíto es altamente dependiente de la movilidad mediada por ocho flagelos presentes en 4 pares y la fijación a la célula huésped mediada por el disco ventral. La adhesión a los enterocitos desencadena una cascada intracelular en la huésped aún no comprendida, lo que ocasiona cambios osmóticos causando diarrea y los síntomas característicos de la giardiasis (Esch y Petersen, 2013).

Cuando se ha llegado el tiempo de la excreción fecal, los trofozoítos pueden enquistarse en el íleon convirtiéndose en quistes, posiblemente como resultado de la exposición a sales biliares o a la ausencia de elementos nutritivos como el colesterol, aunque no todos alcanzan a completar esta última etapa, pudiéndose observar en heces fecales la presencia tanto de quistes como de trofozoítos (Núñez-Fernández y col., 2004, Esch y Petersen, 2013). Asimismo, la eficiencia de la transmisión de *Giardia* depende en forma decisiva de la formación adecuada de esta estructura (Figura 4).

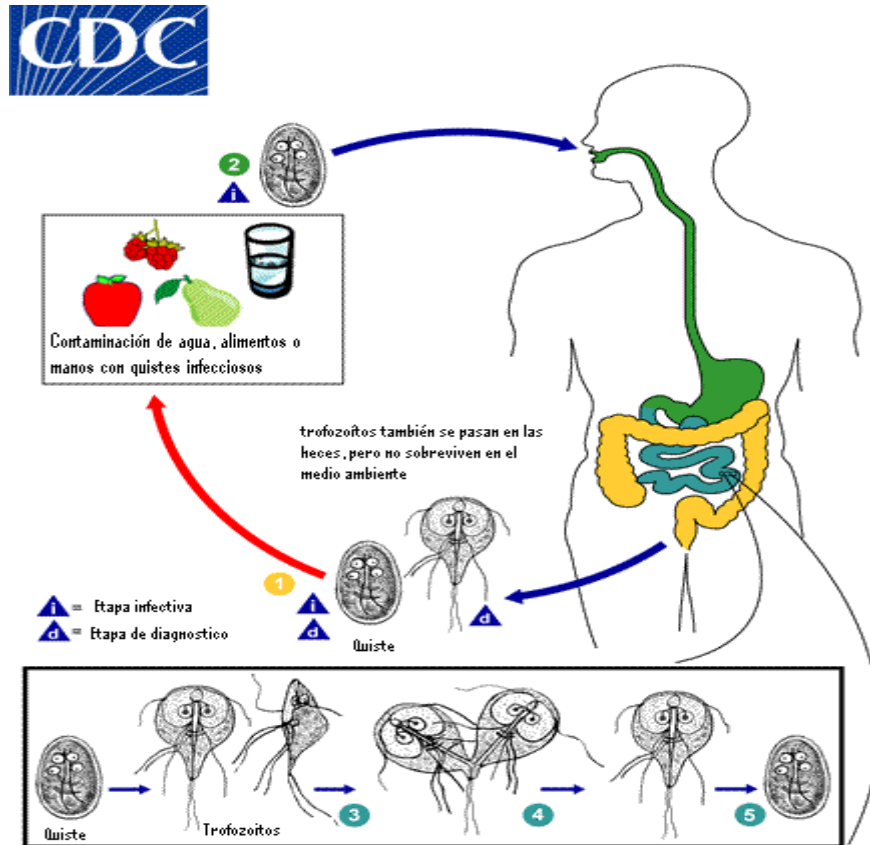


Figura 4. Ciclo biológico de *G. duodenalis*. *G. duodenalis* tiene dos estadios en su ciclo de vida: trofozoíto flagelado (etapa diagnóstica) y quiste (etapa infectiva). La infección es iniciada por la ingestión de quistes en alimentos o agua contaminada con ellos, seguido por la exquistación y colonización del intestino por trofozoítos causando la enfermedad (CDC, 2016).

6 Epidemiología y transmisión

La prevalencia de la parasitosis intestinal depende de la región geográfica, de las condiciones de saneamiento ambiental, de la calidad de las viviendas, de los niveles socioeconómicos, de la higiene personal y colectiva, de la calidad de vida, del hacinamiento y de los aspectos propios del ambiente (Martínez y col., 2011).

La giardiasis es comúnmente adquirida por fuentes de agua dulce o aguas públicas contaminadas, debido a que el tratamiento químico que éstas últimas reciben no es suficiente para eliminar los quistes infecciosos de *G. duodenalis*. Otras formas de transmisión de esta enfermedad son por vía fecal-oral directa, o por el consumo de alimentos contaminados con los quistes del parásito a causa de una mala práctica de higiene y sanidad de quienes preparan dichos alimentos (Halliez y Buret, 2013; Galkin y col., 2014).

G. duodenalis es mundialmente el parásito entérico más frecuente en el humano y también el protozooario más común en los animales domésticos incluyendo perros, gatos y el ganado. Las infecciones en la infancia, en la gestación, y aquellas relacionadas con el SIDA, son las de mayor importancia debido al sistema inmune deficiente. La morbilidad y mortalidad asociadas son elevadas, con más de 58 millones de casos de diarrea protozoaria infantil por año, con respecto a lo cual los costes directos solamente del tratamiento se estiman en el orden de 150 millones de dólares (Thompson, 2008).

Cabe señalar que *G. duodenalis* no es considerado como un patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos. Un estudio realizado en personas infectadas por VIH en Italia reveló que las tasas de infección por este parásito varían del 3.5% al 6.2% en ese país, antes de la introducción del tratamiento antirretroviral de gran actividad (Feng y Xiao, 2011).

Las tasas de prevalencia de giardiasis notificadas varían entre menos del 1% y más del 50%, habiéndose estimado que en Asia, África y América Latina se registran más de 200 millones de casos anuales de infección. Además, ha habido grandes epidemias de origen hídrico en las regiones septentrionales de la antigua URSS, así como en los Estados Unidos de América y Canadá, donde los castores pueden servir como reservorio de la infección (OMS, 1991; Leung y col., 2019).

La prevalencia de giardiasis en niños, como ya se ha mencionado, es bastante común y más frecuente que en adultos. En un estudio realizado en Colombia, donde se analizaron las heces de 328 niños asintomáticos en busca de parásitos intestinales, se encontró una prevalencia de 2.4% para *Ascaris lumbricoides*, 0.6% en *Hymenolepis nana*, 2.1% con *Trichuris trichiura*, 6.1% para *Blastocystis hominis* y 13% con *G. duodenalis*, siendo este valor el mayor (Giraldo-Gómez y col., 2005).

Las tasas de infección de giardiasis en los seres humanos son generalmente más bajas en los países desarrollados. Estudios recientes reportan tasas de infección de 4.0 % en Bélgica, 1.5 % en Alemania, del 0.4% hasta el 6.2 % en Italia, 3.7 % en Portugal, un 5.4% en España, 1.3 % en el Reino Unido, 1.4% en los Estados Unidos, del 1.1% al 6.6 % en Arabia Saudita, 2.5% en Corea del Sur, del 1.6% al 7.6% en Australia, y un 7.6 % en Nueva Zelanda (Feng y Xiao, 2011). La mayoría de las encuestas se llevaron a cabo con niños asintomáticos. La ocurrencia de giardiasis es probablemente mayor en niños con diarrea. Así, en los países nórdicos de Dinamarca, Finlandia, Noruega, y Suecia, se estimó que la tasa de infección de la giardiasis es 2,9% y 5,8% para las personas asintomáticas y sintomáticas, respectivamente. Una tendencia similar se observó en los Países Bajos, con tasas de infección

de 14,0% en los pacientes con diarrea persistente y el 2,0% en sujetos asintomáticos (Feng y Xiao, 2011).

La explicación del por qué en los países desarrollados existan tasas de infección más bajas que las existentes en los subdesarrollados, debe deberse seguramente al acceso que tienen los primeros al agua potable sin contaminación de los quistes infecciosos de *G. duodenalis*.

En México la prevalencia varía de un 7.4 hasta un 68.5% dependiendo de la zona geográfica. La incidencia más alta se encuentra entre lactantes, preescolares y escolares (Uribarren-Berrueta, 2014).

En un estudio realizado en la comunidad de Casulco, ubicada al sureste de la Ciudad de México, población formada por asentamientos humanos irregulares (mezcla de poblaciones citadina y rural), donde sólo el 65% contaba con agua potable; se encontró que el 100% de la población muestreada (741 personas) resultaron positivos a la presencia de protozoos comensales, y/o helmintos parásitos. Las protozoosis encontradas en orden de frecuencia fueron: giardiasis (29.98%), entamebiasis por *Entamoeba coli* (14.71%) y por *Entamoeba histolytica* (7.29%), seguidas de infecciones por protozoos no patógenos (Sánchez-Vega y col., 2000).

Un estudio realizado en nuestra ciudad (Culiacán), reportó hasta un 58.3 % de un total de 12 muestras aisladas de niños de 3 a 6 años de edad positivas para el genotipo AII, y un 41.7% con el genotipo AI, lo sorprendente de estos resultados no son únicamente los porcentajes, sino el hecho de que se hubieran encontrado también resultados similares en

muestras de perros con un 52.6% de muestras positivas para el genotipo AI y un 47% para AII, señalando de nuevo el potencial zoonótico de la enfermedad (Eligio-García y col., 2008).

En nuestro país, hasta la semana 53 del año 2025 (Cuadro 1) la secretaria de Salud ha reportado un total de 6,621 casos de los cuales 197 corresponden al estado de Sinaloa colocándonos en décimo sexto lugar nacional en casos de giardiasis (SSA, 2025).

Sin duda, *G. duodenalis* ha demostrado ser el parásito protozoario patógeno más frecuente en niños, con un gran impacto en la salud pública y en la economía de las naciones, del cual los aspectos epidemiológicos rompen fronteras aun en los países desarrollados, donde, aunque las prevalencias sean bajas, existen.

7 Mecanismo de Patogenicidad

Definir los mecanismos patogénicos de esta infección es uno de uno de los aspectos de gran relevancia actual para el entendimiento, diagnóstico y tratamiento de la giardiasis.

La patogénesis de *G. duodenalis* es un proceso de múltiples factores que inicia con la adherencia del parásito a los enterocitos del duodeno. Dicha unión de los trofozoítos a las células del epitelio intestinal es por medio de un disco de succión ventral, siendo crucial para comenzar la colonización y mantener la infección. Una de las proteínas que están relacionadas en la unión de *Giardia* a la mucosa intestinal, además, participa en el montaje y desmontaje del citoesqueleto que marca la transición de trofozoítos infecciosos transmisibles a quiste, son las α -giardinas; proteínas relacionadas a las anexinas que son altamente expresadas en este parásito (Figura 5) (Yoshida y col., 2011).

Diferentes posibles mecanismos de adherencia de este parásito se han propuesto: A) por debajo del disco de succión ventral se genera una **fuerza de succión** por movimientos impulsores del flagelo; B) **Procesos mecánicos** relacionados con proteínas contráctiles del disco ventral y del fleco ventrolateral (Crossley y col., 1983; Peattie, 1990; Yoshida y col., 2011), y C) Participación de **moléculas de superficie** que permiten la unión del trofozoíto a receptores en las células epiteliales del hospedero (Pegado y col., 1994). Se han empleado diversos modelos con el propósito de estudiar el fenómeno de adhesión del parásito a células epiteliales, dichos modelos han dado conocimientos en relación con los factores que intervienen en la adherencia del parásito a la célula huésped, sin embargo, se sabe poco acerca de las moléculas que se expresan en la interacción y que desempeña un importante papel en el establecimiento de *Giardia*.

Existen pocos estudios sobre como el parásito causa la enfermedad, no obstante, la noción más aceptada es que la sintomatología provocada se debe a un acortamiento en el borde en cepillo de las microvellosidades del epitelio, siendo un factor clave en el origen de las enfermedades diarreicas por la mala digestión y malabsorción (Gillon, 1984; Chávez y col., 1986; Halliez y Buret, 2013; Danquah y col., 2014).

En anteriores estudios, donde se han utilizado parásitos de pacientes con sintomatología de giardiasis, establecieron que este parásito produce un fenómeno de malabsorción de agua, sodio y glucosa, además, debido a la pérdida de la superficie absorbente del epitelio intestinal se produce una disminución en la actividad de la disacaridasa (Cuadro 3) (Buret y col., 2002; Müller, 2005; Gascón, 2006; Cotton y col., 2011; Halliez y Buret, 2013). De igual modo, se ha especificado la disminución y distorsión del borde de las microvellosidades, aumento en el índice mitótico de las células de las criptas epiteliales, interferencia en el metabolismo de sales y ácidos biliares (Halliday y col., 1988). Además, debido a este fenómeno de malabsorción, se observa una hipersecreción de cloro y electrolitos que provoca acumulación de fluidos en el lumen de intestino durante la infección crónica (Troeger y col., 2007; Cotton y col., 2011).

También, se ha observado secreción de moco como resultado de la irritación que ocasiona la presencia de los trofozoítos en la pared del epitelio intestinal lo que produce una respuesta inflamatoria. Además, se confirmó que las lesiones del borde en cepillo y las deficiencias de disacaridasa en pacientes con giardiasis son dependientes de la presencia de linfocitos CD8⁺ (Scott y col., 2004; Halliez y Buret, 2013) y que un número incrementado de linfocitos intraepiteliales están íntimamente relacionados con el proceso de malabsorción durante la infección por *Giardia* (Buret y col., 2002; Müller, 2005; Gascón, 2006). Además,

se ha visualizado que la forma vegetativa de *G. duodenalis* es capaz de alterar la barrera epitelial aumentando la permeabilidad de los enterocitos primordialmente por medio de la ruptura de las uniones oclusivas, también, ocasiona cambios en el citoesqueleto del epitelio, así como inducir la muerte celular programada de dichas células (Buret, 2007; Troeger y col., 2007). Por otro lado, se ha establecido que el mecanismo principal por el que los trofozoítos de *Giardia* es capaz de provocar un daño citotóxico es por medio de la liberación de proteinasas, lectinas, además, se ha sugerido la existencia de una “enterotoxina” de 58 kDa que es secretada, en unión son las encargadas del daño provocado en las microvellosidades (Kaur y col., 2001; Shant y col., 2004; Humen y col., 2011). Por otro lado, el trofozoíto es capaz de liberar algunas proteasas de tipo cisteína (Rodríguez-Fuentes y col., 2006; Rascón y McKerrow, 2013), la función principal de dichas proteasas se localiza en el enquistamiento y desenquistamiento (Rascón y McKerrow, 2013). El transcrito de la cisteín proteasa 2 (CP2) se sobreexpresa en las etapas vegetativa y de enquistamiento de los trofozoítos. También, la CP2 interviene en la degradación de las proteínas de la pared del quiste, y se encuentra co-localizada en vesículas específicas para el enquistamiento; dichas vesículas contienen los materiales precursores requeridos para la formación de la pared del quiste (Dubois y col., 2008; Rascón y McKerrow, 2013). En cultivos de *G. duodenalis* se ha visualizado la actividad que se le atribuye a otras proteasas (Williams y col., 1995; Coradi y col., 2006; Rodríguez-Fuentes y col., 2006; de Carvalho y col., 2008; Rascón y McKerrow, 2013), se ha comprobado la existencia de amino, aspártico, metalo, treonina y serin-peptidasas independientemente del análisis del genoma. Aunado a ello, han sido caracterizadas de manera parcial dos proteasas en este parásito: la proproteína convertasa subtilisina (GSPC) (Davids y col., 2011; Rascón Jr y McKerrow, 2013) y la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV)

(Touz y col., 2002; Rascón y McKerrow, 2013), las dos están implicadas en los procesos de enquistamiento (DPP IV y GSPC) y desenquistamiento (GSPC) y son proteasas de serina.

La mayoría de los estudios hasta ahora indican que la giardiasis provoca alteraciones en las vellosidades intestinales, sin embargo, también se ha observado que el sistema inmunológico del hospedero tiene una participación crítica en este mecanismo tornándose entonces multifactorial, hecho sugerido al observarse en un modelo murino deficiente en linfocitos T en ausencia de esas anormalidades. Uno de los eventos más importantes durante el curso de la giardiasis es el aumento en la permeabilidad epitelial provocada por la apoptosis masiva de los enterocitos así como la reorganización del citoesqueleto de los mismos inducido por los desechos de excreción-secreción del trofozoíto; el aumento en la permeabilidad epitelial también provoca la acumulación intraepitelial de linfocitos T cuya activación aunada a las moléculas de excreción-secreción inician el proceso de acortamiento y aplanamiento de las vellosidades, disminuyendo la actividad de enzimas como la lipasa y lactasa desencadenando el descontrol en la absorción de sustancias como H₂O, electrolitos y otros nutrientes promoviendo su aparición en heces (Geurden y col., 2011).

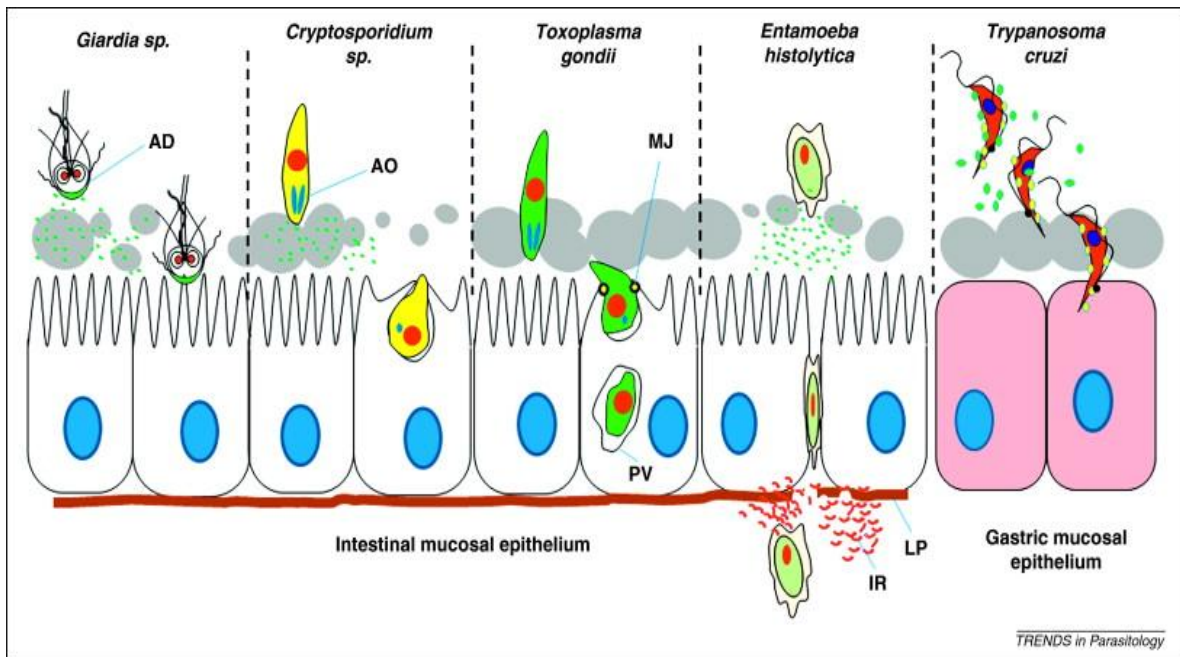


Figura 5. Adhesión de trofozoítos de parásitos al epitelio intestinal (Yoshida y col., 2011).

Cuadro 3. Efectos fisiopatológicos principales de *G. duodenalis* y sus mecanismos

Respuestas patofisiológicas inducidas por <i>Giardia</i>	Mecanismos implicados o hipotetizados de ser implicados
Apoptosis de las células epiteliales intestinales	Inducción de factores pro-apoptóticos: Caspasa-3,8 y 9, Inhibición de factores anti-apoptóticos: poly (ADP-ribosa) escisión de la polimerasa (PARP)
Detención de la progresión del ciclo celular de los enterocitos	Competencia por los nutrientes (arginina), sobre regulación de los genes del ciclo celular
Disfunción de la barrera intestinal	Ruptura de Claudina-1 y alfa-actinina por mecanismos desconocidos, ruptura de la zona ocludens (ZO)-1 mediada por caspasa-3, miosina de cadena ligera quinasa mediada por la interrupción de F-actina y ZO-1
Hipermotilidad del intestino delgado	Inmunidad adaptativa, óxido nítrico neuronal, desgranulación de los mastocitos
Acortamiento difuso de las microvellosidades del borde de cepillo	Linfocitos CD8 ⁺ mediados por las vías secretoras del parásito/productos de excreción
Hiperplasia de las criptas	Alteración de las vellosidades/proporción de las criptas
Composición de la microbiota	Microbiota del huésped infectado puede llegar a ser patógena
Aumento en la producción de moco	Aumento de la secreción de moco en respuesta al parásito
Deficiencias de la actividad enzimática del borde de cepillo	Pérdida de superficie (microvellosidades y vellosidades)
Deficiencias de las disacaridasas	Pérdida de superficie (microvellosidades y vellosidades)
Electrolitos/nutrientes/malabsorción del agua	Pérdida de superficie (microvellosidades y vellosidades)
Hipersecreción de aniones	Mecanismos desconocidos

(Tomado de: Halliez y Buret, 2013).

8 Formas clínicas de la giardiasis

a Giardiasis asintomática

Se alude al contagio por *G. duodenalis* donde no se presentan hallazgos clínicos en relación con esta parasitosis. Los pacientes con giardiasis asintomática, se les denomina portadores sanos, equivalente a más del 80% de los individuos infestados por *Giardia*. Comúnmente, entre más grande es la endemidad de esta parasitosis en una zona, más grande es la correlación de pacientes asintomáticos. Supuestamente, las previas infecciones ocasionan algún tipo de inmunocompetencia que, si bien no evita la reinfección, si limita las consecuencias clínicas de ésta (Saleh, 2010).

b Giardiasis aguda

La etapa aguda generalmente comienza con problemas intestinales, cólicos, seguido por náuseas y anorexia. Los primeros síntomas pueden ser de bajo grado, fiebre y letargo. Los síntomas posteriores incluyen diarrea profusa, acuosa, y fétida, meteorismo y aumento de la peristalsis con amplia flatulencia, eructos, calambres epigástricos y mal sabor de boca. En raras ocasiones, las heces pueden contener moco o sangre. La etapa inicial de la infección que tiene una duración de 3-4 días, es similar a la causada por otros parásitos y un diagnóstico provisional de la giardiasis rara vez se hace. La mayoría de los pacientes presentan diarrea y los demás síntomas se observan con menor frecuencia. Aunque algunos episodios de giardiasis aguda pueden resolverse espontáneamente, suelen pasar a una subaguda o fase crónica (Ivanov, 2010).

c Giardiasis crónica

Esta etapa puede caracterizarse con 2 o más años de diarrea intermitente. En las personas que regresan de zonas endémicas, la fase aguda puede ser olvidada y pueden exponerse únicamente a una ligera a moderada diarrea persistente o signos recurrentes de esta. Durante la etapa crónica pueden estar presentes síntomas como letargo, cefalea y dolor muscular, con pérdida progresiva de peso, pérdida de apetito y mala absorción. La infección persistente en infantes podría manifestarse con un crecimiento lento (Ivanov, 2010).

d Manifestaciones extraintestinales

Entre las manifestaciones extraintestinales asociadas a giardiasis, se han descrito las siguientes: lesiones de tipo urticariano, lesiones del epitelio pigmentado de la retina, glositis y artritis reactiva, son las cuatro manifestaciones clínicas extraintestinales mejor estudiadas. Muchos investigadores también encontraron manifestaciones cutáneas de muy diversos tipos asociadas a la infección por *G. duodenalis* (Saleh, 2010).

Otras de las consecuencias extraintestinales a largo plazo provocadas por *G. duodenalis* podrían ser: alergias, complicaciones musculares, retraso en el desarrollo, deterioro de la función cognitiva, síndrome de fatiga crónica, síndrome del intestino irritable post-infección y susceptibilidad a procesos carcinogénicos (Halliez y Buret, 2013).

9 Diagnóstico de laboratorio de la giardiasis

a Diagnóstico por microscopía

En el diagnóstico realizado por la toma y análisis de muestras fecales en pacientes, los métodos coproparasitológicos de concentración son muy útiles para detectar las formas quísticas, dando los mejores resultados los métodos de sedimentación de Ritchie y de flotación de Faust, debido a que son técnicas que se utilizan para concentrar parásitos en la materia fecal. Por medio de estos métodos se diagnostican la mayoría de los casos, aunque solo se diagnostican el 80-90 % de los casos en análisis de 3 muestras seriadas de heces por paciente (Vázquez-Tsuji y Campos-Rivera, 2009).

Los trofozoítos móviles pueden ser detectados por el examen microscópico directo de muestras frescas (frotis preparados de inmediato con solución salina), mientras que los trofozoítos muertos se pueden detectar en los frotis fecales secados al aire y teñidos, por ejemplo, con Giemsa que ayuda a la diferenciación de otros microorganismos protistas, y de los desechos fecales o del medio ambiente. Los trofozoítos generalmente se encuentran en muestras diarreicas, mientras que los quistes en muestras de heces fecales no diarreicas. La microscopía electrónica puede ser útil para la identificación de algunas especies de *Giardia*, pero lamentablemente no se aplica rutinariamente (Vázquez-Tsuji y Campos-Rivera, 2009; Koehler y col., 2014).

b Diagnóstico por detección de antígenos

Comúnmente el diagnóstico de la infección por *G. duodenalis* se realiza a través de exámenes coproparasitológicos. Sin embargo, la excreción intermitente de quistes y

trofozoítos del parásito hace que no sea posible diagnosticar la infección con *G. duodenalis* en un 10 a 50% de los casos mediante estos métodos. Por otra parte, la determinación de anticuerpos humanos IgG contra *G. duodenalis*, no permite diferenciar entre una infección pasada o una reciente, por lo que es mejor la identificación directa del antígeno de *Giardia* (Duque y col., 2001).

Dos de los ensayos de detección de antígenos más comunes son: Ensayos de Detección por Inmunofluorescencia Directa (DFA) que detectan organismos intactos, e Inmunoensayos enzimáticos (EIA) que detectan antígenos solubles en heces. La sensibilidad y especificidad de DFA ha sido reportada de un 96 al 100% para *Giardia*. La sensibilidad descrita para EIA varía desde un 94 hasta un 97% y su especificidad se ha reportado de un 99 a 100% (Ali y Hill, 2003).

Las ventajas de EIA, sobre la DFA son que se puede procesar un mayor número de muestras en un lapso menor de tiempo y además los resultados pueden ser leídos o medibles objetivamente mediante el uso de un espectrofotómetro, mientras que en la inmunofluorescencia directa los resultados únicamente son leídos en un microscopio de fluorescencia (Jahan y col., 2014).

La Citometría de Flujo (FC), es un método de concentración o recuperación de los quistes de *Giardia*, para su posterior inmunofluorescencia, tinción, examen microscópico y/o cuantificación. Además, también es posible la tinción del ácido nucleico del parásito con yoduro de propidio para distinguir de forma segura entre quistes viables y no viables (Figura 6) (Koehler y col., 2014).

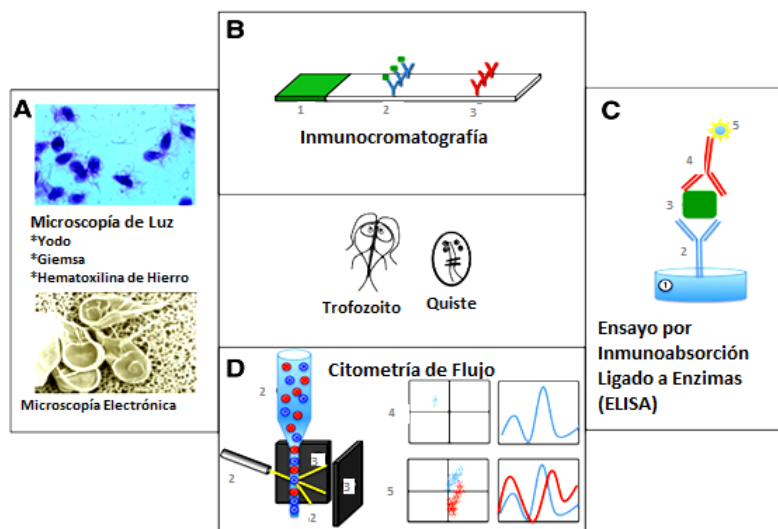


Figura 6. Técnicas más utilizadas para el diagnóstico de la giardiasis. Microscopía, inmunocromatografía, FC y ELISA. (A) Microscopía de quistes o trofozoítos, y análisis de microscopía electrónica de estas etapas. (B) inmuno-cromatografía: (1) la zona de carga de la muestra; (2) anticuerpo de control positivo para el ensayo; (3) anticuerpos específicos para la detección de antígenos de *Giardia*; (C) inmunoensayo para la detección de antígenos de quistes o trofozoítos: (1) ELISA; (2) captura de anticuerpos; (3) antígeno de *Giardia*; (4) anticuerpo secundario específico; (5) enzima conjugada con fluorescencia para la detección colorimétrica; (D) la Citometría de Flujo (FC) para la recuperación o cuantificación de los quistes: (1) emisor láser; (2) muestra que contiene quistes marcados con fluorescencia; (3) detectores de luz; (4) visualización de resultados utilizando un color; (5) FC de dos colores. Adaptada de Koehler y col., (2014).

c Diagnóstico mediante técnicas de análisis genético

Dado que los métodos fenotípicos no pueden ser utilizados para distinguir diferentes especies o conjuntos de *Giardia*, diversos métodos ácido-nucleicos acoplados se han desarrollado para identificar y detectar la variación genética dentro y entre los miembros de este género de muestras clínicas y ambientales. Aunque algunos métodos se basan en la hibridación específica *in situ* de sondas de loci genéticos particulares, en el genoma de los quistes de *Giardia*, la mayoría de las técnicas se basan en la amplificación específica de uno o más *loci* de pequeñas cantidades de ADN genómico por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La aplicación de la PCR ha llevado a un mayor conocimiento y comprensión de la sistemática, biología, epidemiología, ecología y las poblaciones genéticas de *G. duodenalis*, así como también ha brindado soportes para la prevención y control de la giardiasis (Koehler y col., 2014).

10 Tratamiento

A pesar de contar con algunos fármacos para tratar las infecciones por *G. duodenalis* en humanos, se reportan problemas de toxicidad y resistencia. Entre los fármacos más utilizados destacan: metronidazol, tinidazol y furazolidona (los cuales son nitroimidazoles), albendazol (un benzimidazol) y quinacrina (una acridina sustituida). También se ha demostrado la utilidad de la paromicina en algunas situaciones y se ha propuesto la nitazoxanida como alternativa a los nitroimidazoles convencionales; aun así, es imprescindible la realización de más estudios para evaluar por completo su eficacia (Thompson, 2008).

El metronidazol (nitroimidazol) es el fármaco de elección para combatir la giardiasis, mientras que el sabor agradable y eficacia de los benzimidazoles los hace una alternativa a la utilización de los nitroimidazoles (Ivanov, 2010; Mahmoud y col., 2014).

Lamentablemente, hoy en día la terapia antimicrobiana no siempre es eficaz, ocurre una resistencia a los medicamentos por parte de los microorganismos; este problema se ha convertido en una preocupación creciente. A pesar de ello, recientemente varios candidatos a fármacos prometedores se han identificado con cualidades que pueden superar la resistencia a los antibióticos en *Giardia*. Estos incluyen derivados de 5-nitroimidazoles y bencimidazoles, así como compuestos híbridos creados a partir de combinaciones de diferentes fármacos anti-giardiales con desventajas como en el caso de giardiasis asintomática (Watkins y Eckmann, 2014).

Otros estudios reportan medicamentos como la auranofina (fármaco antirreumático) como un medicamento eficaz contra las cepas de *Giardia* humano (de los conjuntos A y B) que han mostrado resistencia al metronidazol (Tejman-Yarden y col., 2013). Y al orlistat (tratamiento utilizado en la obesidad), como un potente inhibidor del crecimiento de *G. duodenalis in vitro*, que elimina a los parásitos en concentraciones alcanzables en el intestino por los regímenes de tratamiento aprobado para la obesidad (Hahn y col., 2013). Por último, también se reconocen los posibles efectos terapéuticos de los extractos de jengibre y canela en la infección por *Giardia* en ratas albinas como una terapia alternativa prometedora a los medicamentos de uso común anti-giardíasis (Mahmoud y col., 2014).

Se utiliza la terapia tradicional (metronidazol, tinidazol, furazolidona, entre otros), así como, los derivados de 5-nitroimidazoles y bencimidazoles o compuestos híbridos creados por la combinación de diferentes fármacos anti-giardiales, como se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, es importante advertir que el uso frecuente o sin medicación de estos fármacos pueden ser los causantes de que se produzca una resistencia por parte de los microorganismos, por otra parte; cabe señalar que la toxicidad de este tipo de antibióticos es muy alta y no se recomienda su uso indebido o indiscriminado cuando no hay la certeza de que se tenga la enfermedad. Se requiere la innovación de medicamentos que presenten una menor toxicidad.

11 Metabolismo

El primer sitio de absorción de los alimentos es el duodeno, debido a que es la zona colindante al estómago, además, recibe enzimas de la bilis del hígado y páncreas, se cree que los trofozoítos de *Giardia* tienen una predilección por esta zona debido a que requieren de una concentración elevada de nutrientes para su proliferación y supervivencia, sobre todo aquellos nutrientes que el protozoo no tiene la capacidad de sintetizar de nuevo (Das y col., 2002; Hernández y col., 2007; Yichoy y col., 2011). Cuando los trofozoitos de *Giardia* carecen completamente de oxígeno pueden metabolizar la glucosa hasta la alanina o etanol. Por otro lado, en concentraciones de oxígeno sub-toxicas, sus productos finales son acetato y CO₂. El metabolismo energético de *G. duodenalis* está relacionado al metabolismo de aminoácidos como la Arginina, que constituye su principal fuente de energía, y la Alanina, producto final del metabolismo en su ambiente natural. A pesar de que *Giardia* puede producir Alanina desde piruvato, a

través de la enzima alanin amino-transferasa, los trofozoítos tienen un sistema de transporte para captarla (Ringqvist y col., 2008; Humen y col., 2011).

En lo que respecta a las grasas, *Giardia* necesita de sales y lípidos que se encuentran en la bilis, como son glicoldesoxicolato, glicolato, fosfatidilcolina y colesterol, relevantes para su crecimiento en cultivos axénicos y mantenimiento (Humen y col., 2011; Yichoy y col., 2011). Además, existe evidencia que muestra que *Giardia* tiene la capacidad de incorporar en menor proporción ácido araquidónico y ácido palmítico, al igual que ácidos grasos en forma de fosfolípidos, por medio de las vías de reacilación y deacilación.

Inclusive se ha manifestado un prototipo en como este parasito muestra toda una vía desde que entran los lípidos hasta que se usan por medio de la remodelación de fosfolípidos (Humen y col., 2011). Hemos visualizado que *G.duodenalis* requiere para su desarrollo de una gran cantidad de nutrientes y metabolitos preformados como ácidos grasos, aminoácidos, carbohidratos, esteroides, pirimidinas y purinas, esto es debido a la ausencia de citocromos y de las principales rutas metabólicas como la fosforilación oxidativa y la de los ácidos tricarboxílicos por la carencia de mitocondrias. Ahora bien, se ha reportado la existencia de mitosomas, unas estructuras que llevarían a cabo una ancestral función de las mitocondrias debido a que se han descubierto proteínas que hacen el transporte de electrones, además, de una enzima tipo piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFO) (Townson y col., 1996; Tovar y col., 2003; Dolezal y col., 2005).

En los mitosomas se han encontrado proteínas implicadas en las reacciones óxido-reducción por medio de los grupos ferro-sulfurados y proteínas involucradas en la

formación de estos grupos hierro-azufre, como la PFO que junto con la ferredoxina activan a los derivados de nitroimidazol, los cuales son los antiparasitarios más utilizados contra *Giardia*.

12 Metabolismo de hierro

El hierro es un elemento esencial para nuestras células, juega un papel primordial en el metabolismo del oxígeno, la absorción de oxígeno, el transporte de electrones en la mitocondria, el metabolismo energético, función muscular y la hematopoyesis. Además, este metal es esencial para el funcionamiento y el bienestar físico, pero el hierro divalente libre se oxida rápidamente a su hierro trivalente, que cuando éste se encuentre disponible en su forma libre puede inducir la formación de radicales libres de oxígeno que puede ocasionar daños en el tejido. Por lo tanto, el metabolismo del hierro está estrictamente controlado para asegurar que los niveles de hierro libre se mantengan lo más bajo posible, para garantizar una adecuada absorción, transporte y almacenamiento del hierro (Ludwing y col., 2015).

Desde el organismo más primitivo hasta el más complejo necesitan de hierro para realizar una gran variedad de funciones biológicas, como; la síntesis de DNA, la respiración celular, el transportador de electrones, los procesos de óxido-reducción, entre otras. Por otra parte, estipulan que el metabolismo del hierro debe estar estrictamente regulado por un mecanismo debido a su alto potencial en los procesos *redox*, aunado a su gran capacidad de promover la formación de compuestos tóxicos reactivos los cuales

causan daño oxidativo tanto en proteínas como en ácidos nucleicos (Shiflett y Johnson, 2010; Jedelsky y col., 2011; Tandara y Salamunic, 2012; Wilkinson y Pantopoulos, 2014).

En los humanos el contenido total de este metal es regulado por medio del proceso de absorción intestinal. Se lleva a cabo en la membrana apical de los enterocitos del duodeno y en el inicio del yeyuno.

El hierro que obtenemos de la dieta se encuentra principalmente como hierro férrico (Fe^{3+}) o como hierro hemo. El hierro férrico fácilmente forma complejos insolubles, además, para su absorción debe ser reducido previamente a ferroso por una reductasa que se localiza en la membrana apical del enterocito que tiene el nombre de Dcytb (citocromo b duodenal). Por otro lado, el Fe^{2+} puede ser trasladado hacia el interior de la célula por el transportador de metales divalentes (DMT1 o Nramp2). El hierro hemo que obtenemos de la dieta se absorbe directamente mediante un transportador no identificado, aunque se ha visto la participación de un transportador de folatos (PCTF) (Qui y col., 2006; Nakai y col., 2007; Inoue y col., 2008).

La habilidad que tiene el metal para estar en varios estados de oxidación es una propiedad que es explotada por los organismos. Su bioquímica está sometida por dos estructuras, el grupo hemo, donde el catión reside en el centro de un macrociclo de porfirina y está compaginado por cuatro átomos de nitrógeno coplanares y por grupos de hierro-azufre de varios tipos, que usan azufre aparte de la cisteína para unirse al hierro (Johnson y col., 2005).

La mayoría de los organismos contienen proteínas de tipo hemo, siendo un cofactor demasiado versátil donde sus funciones están determinadas por las proteínas que

se unen a ella, además, su biosíntesis implica tanto a las mitocondrias como a las enzimas citosólicas (Layer y col., 2010). Pese a que *G. duodenalis* es un eucarionte, no presenta mitocondrias, sin embargo, en su lugar tiene mitosomas, orgánulos residuales de origen mitocondrial que tienen la habilidad de unir los grupos ferro-sulfurados, aunque no tiene la capacidad para la biosíntesis de las proteínas hemo y la fosforilación oxidativa (Tovar y col., 2003; Jedelsky y col., 2011). Para satisfacer su necesidad de energía este parásito se basa en la fermentación a nivel sustrato y en las vías de fosforilación (Jarrol y col., 1989). No obstante, el parásito de *Giardia* codifica proteínas hemo (Morrison y col., 2007), algunas han sido expresadas como proteínas recombinantes, incluyendo cuatro miembros de la familia del citocromo B5 de función desconocida (Cuadro 4) (Alam y col., 2012; Pyrih y col., 2014; Rafferty y Dayer, 2015) y una flavohemoglobina con actividad óxido nítrico dioxigenasa (Mastronicola y col., 2010; Rafferty y col., 2010)

Como un parásito, *Giardia* se basa en su hospedero, y específicamente en los contenidos del tracto digestivo para muchas de sus funciones celulares. A pesar de su metabolismo anaeróbico, *Giardia* consume oxígeno molecular mediante el uso de uno o más flavoproteínas, las cuales usa electrones proporcionadas por NADH para reducir el oxígeno a agua (David y col., 1996). Las flavohemoglobinas son eficientes óxido nítrico dioxigenasas que catalizan la reacción de globina unida al O₂ con óxido nítrico para formar nitrato (Gardner y col., 1998). Además, el óxido nítrico en altos niveles micromolares es tóxico para *Giardia*, sin embargo, una flavohemoglobina funcional puede ayudar a protegerlo de los efectos dañinos de este radical libre (Fernandes y col., 1997).

Cuadro 4. Hemo proteínas de *G. duodenalis*

Proteína	UniProtKB AC	<i>Giardia</i> DB	Cromosoma	KDa	Tamaño
GFIHb	E2RTZ4	GL50803_15009	5	52.0	458 aa
gCYTB5-I	A8B968	GL50803_9089	2	15.1	131 aa
gCYTB5-II	A8BAF9	GL50803_27747	4	15.3	136 aa
gCYTB5-III	A8BZG5	GL50803_33870	No asignado	14.4	129 aa
gCYTB5-IV	A8BD17	GL50803_2972	4	28.9	258 aa

(Tomado de: Rafferty y Dayer, 2015)

13 Aspectos moleculares de *G. duodenalis*

De la misma forma que los otros organismos amitochondriados como *E. histolytica* y *T. vaginalis*, el parásito *Giardia* debido a su infectividad también es de gran interés. Pese a que se mantienen inciertas las posiciones evolutivas de estos parásitos protozoarios, se tienen reportes que los mantienen en una posición muy cercana en la evolución (Vanacova y col., 2003). El primer genoma secuenciado de *G. intestinalis* proviene del aislado WB y se publicó en 2007. En ese momento, 200,000 lecturas de ambos extremos de bibliotecas de plásmidos de inserción pequeña y 2,400 secuencias finales de una biblioteca de 200 kpb en cromosomas artificiales bacterianos (los vectores BAC) se generaron y secuenciaron con el método de Sanger. Recientemente, se volvió a secuenciar el genoma de *Giardia* el cual tiene un tamaño aproximado de 12 Mbp (Xu y col., 2020) y no difiere mucho del borrador reportado hace unos años (Franzén y col., 2013; Jex y col., 2013). Por otro lado, la forma vegetativa de *Giardia* no es tan común debido a que presenta dos núcleos del mismo tamaño y son indistinguibles morfológicamente. Ambos núcleos presentan la misma cantidad de DNA y son transcripcionalmente activos. Los trofozoítos parecen ser tetra haploides con el DNA arreglado en cinco cromosomas. El contenido de G+C es de 42-49% (Vanacova y col., 2003; Prucca y Lujan, 2009).

Además, sus regiones intergénicas son muy cortas (a veces menos que 250 pb) y sus regiones promotoras muy compactas. Por otro lado, existen reportes donde indican que este parásito tiene las regiones no traducidas más cortas (1-6 nt). Aunque dichas regiones poseen todos los elementos que se requieren para la regulación transcripcional, como las regiones ricas en A+T. Este parásito tiene un elemento iniciador de nt

(ATTAAAA en la posición -30), con sus variantes (Cuadro 5). En la secuencia rica en A-T contiene una A en el medio, la cual podría ser el mejor inicio de la transcripción (Figura 7) (Tolba y col., 2013). Suena interesante conocer cómo es que este parásito lleva a cabo la regulación de sus genes por la secuencia tan limitada de sus regiones promotoras.

Los genes de *Giardia* presentan una secuencia corta de 6 nt que podría actuar como sitio de anclaje de los ribosomas para la síntesis de proteínas. Por otra parte, la posible señal de poliadenilación se encuentra 20-30 nt río debajo de codón de paro (AGTPuAApy) (Vanacova y col., 2003). Hasta la fecha poco se sabe sobre la regulación de este parásito aun cuando se tiene casi completa la secuencia de su genoma.

Cuadro 5. Variantes de la frecuencia consenso del inicio de transcripción

ATTTTAAAATG	21
ATTTTAAAAAT	17
AATTTAAAATG	16
AAAATAAAAAAT	15
AAAATAAAAATG	13
AAATTAAAAAA	13
AAATTAAAAAT	13
AAATTAAAATG	13
AATTTAAAAAT	13
CTTTTAAAAAT	13
AAAATAAAAAAG	12
TTTTTAAAATG	12
AATTCAAAAAA	11
ATTTTAAAAAA	11
AATTTAAAAAA	10
ATTTCAAAAAA	10
ATTTTAATTTT	10
doi:10.1371/journal.pone.0076184.t003	

(Tomado de: Tolba y col., 2013)

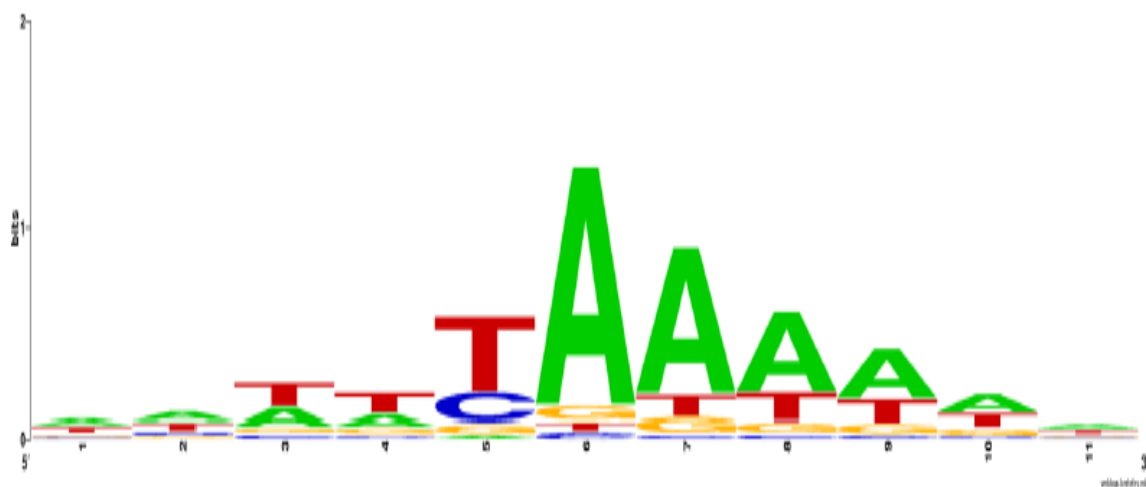


Figura 7. Secuencia consenso conservada para el sitio de iniciación de la transcripción en *G. duodenalis* (Tomado de: Tolba y col., 2013).

14 Efecto del hierro en protozoarios

Se tienen estudios que muestran que el hierro es un catión importante para los seres vivos, además, en los protozoarios se relaciona con los mecanismos de patogenicidad; como los mecanismos de adhesión y citotoxicidad de *E. histolytica* y *T. vaginalis* donde en altas concentraciones de hierro se ven aumentados (Lehker y col., 1991; Álvarez-Sánchez y col., 2001; Park y col., 2001; Hernández-Gutiérrez y col., 2003; 2004; Lee y col., 2008). Mediante ensayos de “Northern blot” en *E. histolytica* empleando parásitos en condiciones normales y de bajo hierro, se visualizó una regulación negativa de este catión de seis diferentes proteinasas de tipo cisteína (Figura 8) (CP1, CP2, CP3, CP4, CP5 y CP6) (Park y col., 2001). Además, Lee y col., (2008) reportaron que el hierro es un factor clave en la adherencia y citotoxicidad de *E. histolytica* a las monocapas de células CHO (células de ovario de hámster chino) (Figura 9). Por otro lado, en *T. vaginalis*, se ha mostrado que el hierro modula negativamente algunas cisteín proteinasas, debido a que en altas condiciones de hierro en el medio de cultivo se reduce la actividad y expresión de superficie de estas CPs, así como también modula positivamente algunas proteínas (Cuadro 6) (Álvarez-Sánchez y col., 2000; Hernández-Gutiérrez y col., 2003; Hernández-Gutiérrez y col., 2004). Dichos reportes nos mostraron que la carencia de hierro en el medio de cultivo afecta el crecimiento de los parásitos, sin embargo, en los medios con una elevada concentración del catión no afecta su desarrollo (Figura 10). Interesantemente, en las amibas en altas concentraciones de hierro (285 μ M) incrementa su capacidad adhesiva y citotóxica (Lee y col., 2008). Por otro lado, Cruz-Castañeda y Olivares-Trejo identificaron una proteína de 45 kDa, Ehhmbp45, que se une a

hemoglobina como fuente de hierro y encontraron que los niveles de RNAm son regulados negativamente por hierro (Cruz-Castañeda y Olivares-Trejo, 2008). Nuestro grupo de trabajo reportó la presencia de estructuras tallo burbuja en las regiones no traducidas del RNAm de la Ehhmbp45 (Soto-Castro y col., 2017) lo que sugiere un tipo de regulación postrancricional IRE/IRP, el cual describiremos más adelante. En *G. duodenalis*, la gran necesidad por hierro se refleja en la anemia causada sobre todo en niños con giardiasis (Bartelt y col., 2013), donde después del tratamiento con metronidazol se observa aumento de hemoglobina en la sangre (Cuadro 7) (Olivares y col., 2004; Monajemzadeh y Monajemzadeh, 2008) por lo que la presencia de *Giardia* en niños está estrechamente relacionada con malnutrición y se ha considerado un predictor de dicha condición (Al-Mekhlafi y col., 2005; Bartelt y col., 2013). A pesar de ello, la modulación por hierro en este protozooario ha sido muy poco estudiada.

Cuadro 6. Proteínas reguladas positivamente en elevadas concentraciones de hierro (Fe^{2+})

Proteínas	Participación en:
AP65, AP51, AP33, AP23 y AP120	Adherencia
Ferredoxina, Succinil CoA sintetasa, Piruvato Ferredoxin Óxido-Reductasa (PFO)	Metabolismo de carbohidratos
Cisteín proteinasa de tipo legumaina TVLEGU-1	Adherencia
Cisteín proteinasa de tipo catepsina L, TVCP4	*ND
Ecto-ATPasas y ecto-fosfatasas	Proteínas de superficie
Triacilglicerol lipasa (TVLip)	Similar a las lipasas del grupo EC3.1.1.3.
Nucleósido trifosfato sifosfohidrolasa 1 (NTPDasa 1)	Hidrólisis del ATP extracelular a ADP
Ecto-5'-nucleotidasa	Hidrólisis de AMP
Cisteín-proteinasas	Degradación del componente C3b del complemento
Algunas proteinasas	Alteraciones de las uniones estrechas; disminución de la resistencia transepitelial
*ND, no determinada	

(Tomado de: Arroyo y col., 2015).

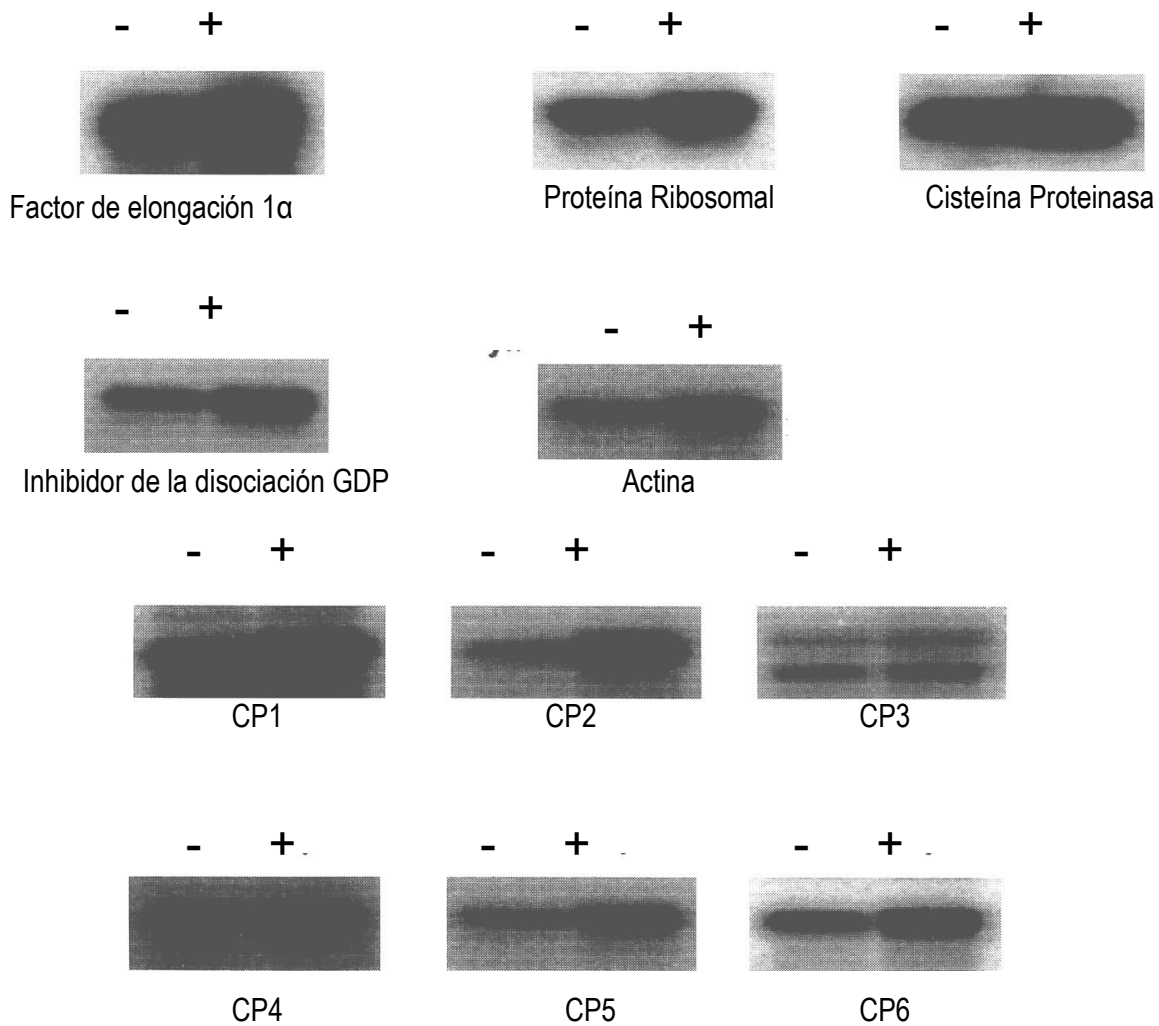


Figura 8. Expresión diferencial de genes de *E. histolytica* en condiciones de bajo hierro. (A) Análisis de Northern blot del cDNA aislado de células de *E. histolytica* crecidas en medio con hierro normal (-) y medio con bajo hierro (+). (B) Modulación de los seis genes de CP por limitación de hierro (Park y col., 2001).

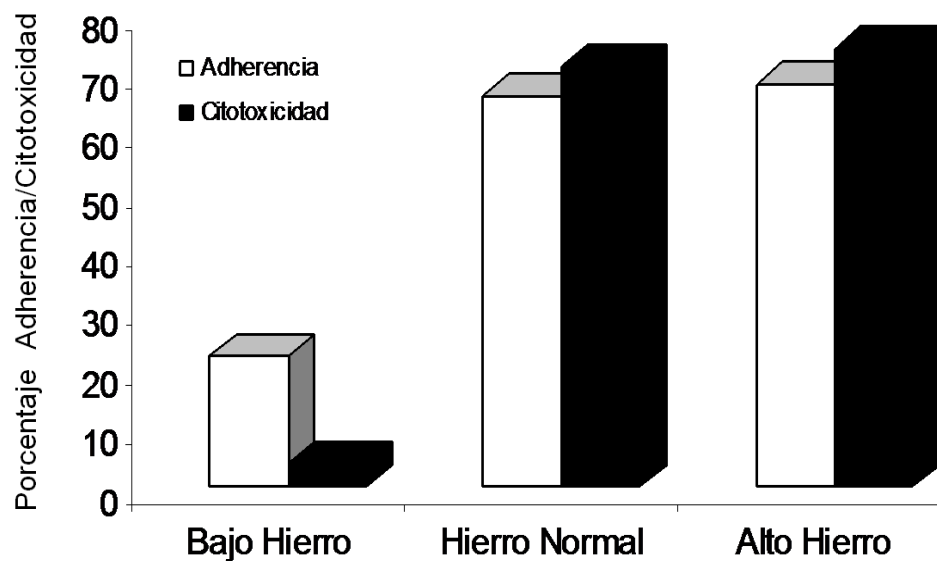


Figura 9. Efecto del hierro en la adherencia y citotoxicidad de *E. histolytica* a monocapas de células CHO. Bajo hierro, 21.4 μM de sal férrica. Hierro normal, 71.4 μM de sal férrica. Alto hierro, 285.6 μM de sal férrica (Lee y col., 2008).

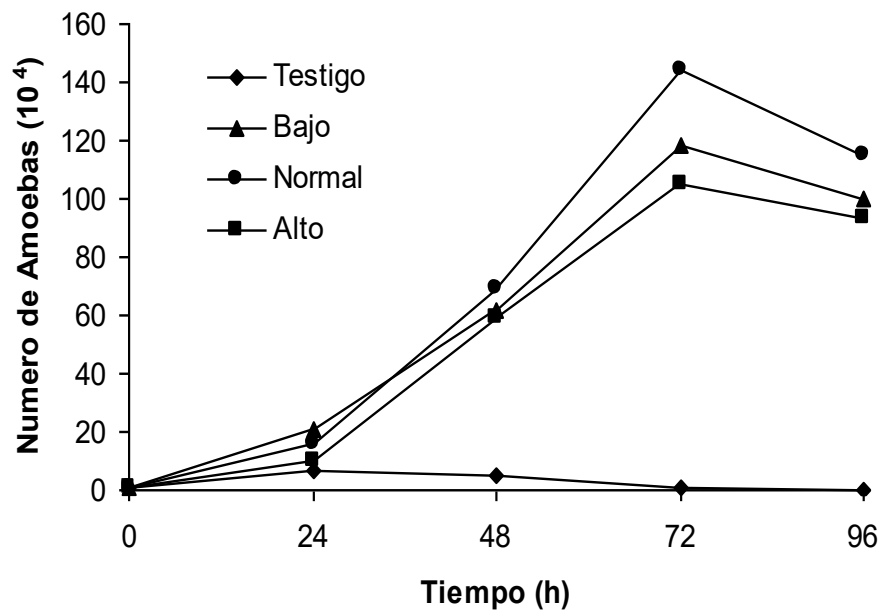


Figura 10. Efecto del hierro en el crecimiento de *E. histolytica* (Lee y col., 2008).

Cuadro 7. Valores hematológicos antes y después del tratamiento de 102 niños con giardiasis

Variables	Rango normal	Promedio antes del Tx	Rango antes del Tx	Promedio después del Tx	Rango después del Tx	ρ valor
Hemoglobina (mg/dl)	12-15	11.8+/-1.54	9-13.7	13.2+/-1.92	11-14	<0.0001
Hematocrito (%)	40-45	36.7+/-2.63	32-41	39.6+/-2.80	36-45	<0.0001
Ferritina (μl/l)	12-300	50.08+/-3.22	5-80	62.75+/-3.56	16-114	<0.0001
Capacidad de fijación del hierro (TIBC) (μl/dl)	250-400	392+/-16.95	258-454	342+/-16.60	164-360	<0.0001
Hierro en el suero TIBC (%)	20-55	17+/-1.50	14-26.5	23+/-1.80	21-34	<0.0001
Ancho de distribución eritrocitaria (%)	11.5-14.5	14.6+/-2.2	11-17.7	11.8+/-1.98	9-13	<0.0001

(Tomado de: Monajemzadeh y Monajemzadeh, 2008).

B HOMEOSTASIS DEL HIERRO EN LAS CÉLULAS

Para todos los organismos vivos el hierro es un elemento importante. En soluciones acuosas, el hierro se encuentra en dos estados de oxidación estables: Fe^{2+} (ferroso) y Fe^{3+} (férrico). Dicha propiedad le confiere ser participe en reacciones que comprenden gran parte de la bioquímica de la célula, inclusive aquellas que tienen el control sobre el flujo de electrones por medio de rutas bioenergéticas, el aporte de oxígeno a los tejidos y la síntesis de DNA. Cuando la célula se encuentra deficiente del catión se afecta su crecimiento y se lleva a cabo la apoptosis. Por otro lado, la sobrecarga del hierro libre también es perjudicial para la célula. Dicho efecto tóxico se debe a la capacidad del hierro libre de generar especies reactivas de oxígeno. Debido a que tanto la deficiencia como el exceso de hierro son dañinos, su estado redox, concentración y absorción deben estar estrictamente regulados (Pantopoulos, 2004; Pérez y col., 2005; Tandara y Salamunic, 2012; Wilkinson y Pantopoulos, 2014). La regulación por hierro en procariontes se da por la proteína represora Fur la cual regula los genes que participan en la captación de hierro y la biosíntesis de sideróforos (queladores específicos para Fe^{3+}) en respuesta al nivel de hierro en la célula. La secuencia que reconoce Fur es GATAATGATAATCATTATC conocida como caja Fur (Hantke, 2001). En cambio, el hierro en células eucariontes se encuentra formando parte de dos compartimientos: uno funcional y otro de depósito. El transporte de hierro unido a la proteína transportadora transferrina facilita el intercambio de metal entre ambos compartimientos. El exceso de hierro se deposita intracelularmente asociado a la proteína almacenadora ferritina (Hentze y Kuhn, 1996; Ponka y col., 1998; Rouault y Harford, 2000). Por otra parte, transferrina

se une al receptor de transferrina y este complejo es acidificado y endocitado por una bomba de protones en el endosoma temprano por lo que se afecta la conformación del complejo transferrina/receptor de transferrina para liberar el hierro (Aisen y col., 1980). Las proteínas que intervienen en la captura, almacenamiento, utilización y transporte de este metal deben ser reguladas coordinadamente (Figura 11). Las señales y mecanismos regulatorios que permiten su secreción involucran la modulación de los eventos de la transcripción, estabilidad del RNAm, traducción y modificaciones postraduccionales (Hentze y col., 2004; Pérez y col., 2005).

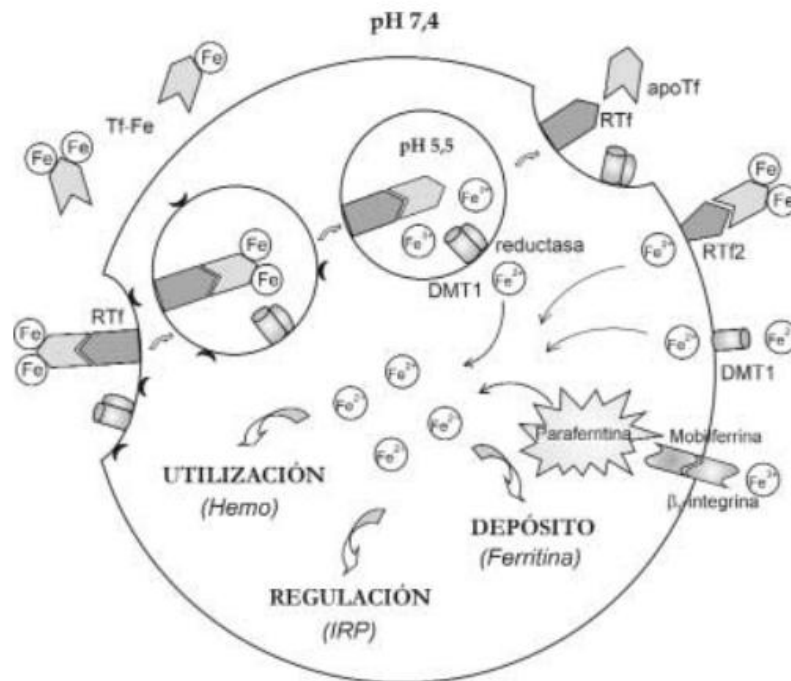


Figura 11. Homeostasis del hierro en células eucariotas. Tf: transferrina, RTf y RTf2: receptores de transferrina, IRP: proteína reguladora de hierro, DMT1: transportador de metales divalentes (Pérez y col., 2005).

a Hierro en microorganismos patógenos

Esta regulación tan estricta del hierro en las células de mamíferos representa un obstáculo para los patógenos, los cuales de igual manera requieren de este esencial elemento para su sobrevivencia y virulencia. Por ello estos microorganismos han desarrollado una serie de mecanismos muy específicos para la captura de hierro a partir de sus hospederos. También, para poder competir de manera exitosa por el hierro contra los demás microorganismos del ambiente, se han especializado en desarrollar sistemas de captura de hierro muy eficaces como son: la producción de sideróforos, receptores específicos para proteínas transportadoras de hierro e incluso para evitar un daño tóxico por el hierro igual han desarrollado mecanismos de regulación del metabolismo de este (Wilson y col., 2016).

b Hierro en parásitos protozoarios

Se ha reportado que el hierro es un elemento esencial para el crecimiento, tanto *in vivo* como *in vitro*, de parásitos protozoarios de los géneros: *Entamoeba*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Naegleria*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma*, *Tritrichomonas* y *Trichomonas*. Los sistemas específicos de los protozoarios para la captura del hierro incluyen receptores que unen a siderofilinas como la holo-transferrina y holo-lactoferrina. Además, aquellos protozoarios que se localizan intracelularmente también aprovechan el hierro a partir de los grupos hemo presentes en hemina o hemoglobina.

Algunos protozoarios han desarrollado proteínas de unión a hemoglobina, reductasas y transportadores para hierro ferroso, algunos receptores para sideróforos

producidos por otros organismos (xenosideróforos) e incluso obtención directa del hierro a partir de la lisis de células hospederas (Wilson y col., 2016).

Esta necesidad de obtención de hierro se ha visto que debe ser regulada para evitar la toxicidad por la formación de radicales libres. Esta regulación también ha sido demostrada en parásitos protozoarios anaerobios como *E. histolytica* y *T. vaginalis*. Se ha observado que en particular en estos protozoarios anaerobios la modulación de obtención de hierro regula muchas de sus moléculas involucradas en su adhesión hacia la célula blanco, expresión regulada por las concentraciones fluctuantes de hierro.

c El hierro en *G. duodenalis*

Poco se ha estudiado sobre el hierro en *Giardia*. No se sabe si el hierro puede ser metabolizado por el parásito. Sin embargo, existe evidencia que hace suponer que este parásito pudiese utilizar el hierro como elemento esencial en sus vías metabólicas y expresión proteica. La cercanía evolutiva con otros protozoarios que usan hierro para su crecimiento es una de ellas.

Por ejemplo, otra evidencia, es la presencia de organelos tipo mitosoma en donde se ha demostrado que contiene las proteínas cisteína desulfurasa (Isc) que participan en la formación de grupos hierro-azufre característico de las cadenas de transporte de electrones. Además, estas proteínas Isc tienen homología en secuencia las proteínas de *E. histolytica* y *T. vaginalis*, de quienes se tiene una amplia información sobre su regulación de hierro (Tachezy y col., 2001; Emelyanov, 2003).

También se ha demostrado la presencia de proteínas homólogas que requieren estos grupos prostéticos de hierro-azufre, una de ellas es una hidrogenasa dependiente de hierro que se expresa a nivel de transcrito en cultivos de *G. duodenalis*, la cual presenta homología a la descrita en *E. histolytica*. Además, *Giardia* contiene proteínas de tipo ferredoxina y PFO, que son proteínas que requieren de grupos hierro-azufre para su función y cuyos homólogos en *T. vaginalis* se regulan por hierro. Interesantemente, se identificó en *Giardia* otra proteína de los mitosomas que se une a un grupo FeS lábil, una variable de glutaredoxina que se participa también en la formación de los grupos hierro-azufre (Townson y col., 1996; Tovar y col., 2003; Dolezal y col., 2005).

Aunado a estas evidencias, se ha identificado una enzima denominada FDP, cuyo centro activo contiene dos sitios para átomos de hierro y participa en la reducción del O_2 en H_2O , por su afinidad específica en condiciones aeróbicas. Además, *Giardia* también presenta una enzima superóxido reductasa, cuya función se sabe es la de reoxidar los aniones O_2^- a O_2 y transportar los electrones a grupos de hierro (Mastronicola y col., 2016).

Por otra parte, se ha visto que muchos de los pacientes infectados con giardiasis presentan niveles bajos de hierro sérico que se ha atribuido principalmente al proceso de malabsorción. Sin embargo, podría también deberse a que, dado que el parásito se encuentra en el sitio de absorción de este metal, podría estar compitiendo por él con las células del hospedero. Además, los trofozoítos que están en el intestino podrían fagocitar bacterias o células, así como proteínas que contienen hierro, tales como algunas enzimas y citocromos que pueden servirles como fuentes de hierro.

Otro punto importante para recalcar es que el medio de cultivo que se utiliza para el crecimiento de *Giardia* contiene citrato férrico y suero bovino con trazas de hierro que utilizan los trofozoítos para su crecimiento *in vitro*.

Por todo lo anterior, así como las analogías con otros microorganismos en general y parásitos protozoarios en la utilización del hierro para su crecimiento y sobrevivencia se sugiere que *G. duodenalis* debe de utilizar el hierro para favorecer su crecimiento y metabolismo.

C EL SISTEMA TIPO IRE/IRP

Entre los mecanismos de regulación por hierro se encuentra la regulación postranscripcional por el sistema IRE/IRP (Iron Responsive Element/Iron Regulatory Protein), ampliamente estudiado en seres humanos. Las proteínas citoplásmicas reguladoras de hierro, IRP-1 e IRP-2, se unen a los elementos de respuesta a hierro (IREs), los cuales son estructuras de tallo-burbuja conservadas que se localizan las regiones no traducidas (UTR) de los RNAm que codifican proteínas que participan en la captación o en la homeostasis del hierro. Los IREs son estructuralmente similares, son estructuras secundarias que constan de un tallo una burbuja. Los IREs canónicos tienen 31-nt de los cuales seis forman la burbuja con la secuencia consenso 5'-CAGUGN-3', el tallo usualmente es de de cinco bases apareadas, además tiene una pequeña asa o protuberancia asimétrica con una citocina no apareada en la hebra 5' y un tallo adicional de longitud variable (Hentze y Kuhn, 1996). Un solo IRE localizado en el extremo 5'-UTR del RNAm de ferritina humana, por ejemplo, es reconocido por la proteína IRP humana y este

complejo IRE/IRP inhibe su traducción (Muckenthaler y col., 1998). El segundo tipo de regulación ocurre cuando el IRE está localizado en el extremo 3'-UTR del RNAm. El receptor de transferrina, por ejemplo, posee cinco estructuras IREs en esta región y tienen la función de estabilizar el RNAm cuando se une la IRP humana en condiciones de bajo hierro celular (Hentze y Kuhn, 1996). Es decir, que el almacén de hierro celular es el factor que regula la unión de las proteínas IRP-1 e IRP-2 por mecanismos distintos (Henderson y Kuhn, 1995). Cuando los niveles de hierro son altos en la célula eucarionte, un grupo 4Fe-4S de la IRP-1 se ensambla y se inhibe la actividad de unión al IRE por lo que se convierte en aconitasa mitocondrial (Haile, 1992; Haile y col., 1992). Mientras que, cuando los niveles de hierro celular son bajos, la IRP-1 se une al IRE, por lo que la IRP-1 actúa como una proteína bifuncional que ahora tiene capacidad de unión al IRE presente en el RNAm (Figura 12) (Pantopoulos y col., 1996; Gegout y col., 1999; Brazzalotto y col., 2002). La IRP-2 posee el 62% de homología con la IRP-1 pero, a diferencia de ella, no posee el grupo Fe-S y no tiene actividad de aconitasa mitocondrial. La IRP-2 tiene la capacidad de unirse con elevada afinidad a secuencias IRE en condiciones de bajo hierro celular, pero en alto hierro se degrada vía proteasoma (Iwai y col., 1995; Hentze y Kuhn, 1996). La IRP-2 contiene una inserción de 73 aminoácidos ricos en prolina y cisteína en el extremo amino-terminal que se ha involucrado en la detección de hierro y en la degradación mediada por proteosoma, a esa inserción se le conoce como sensor de hierro (Guo y col., 1995).

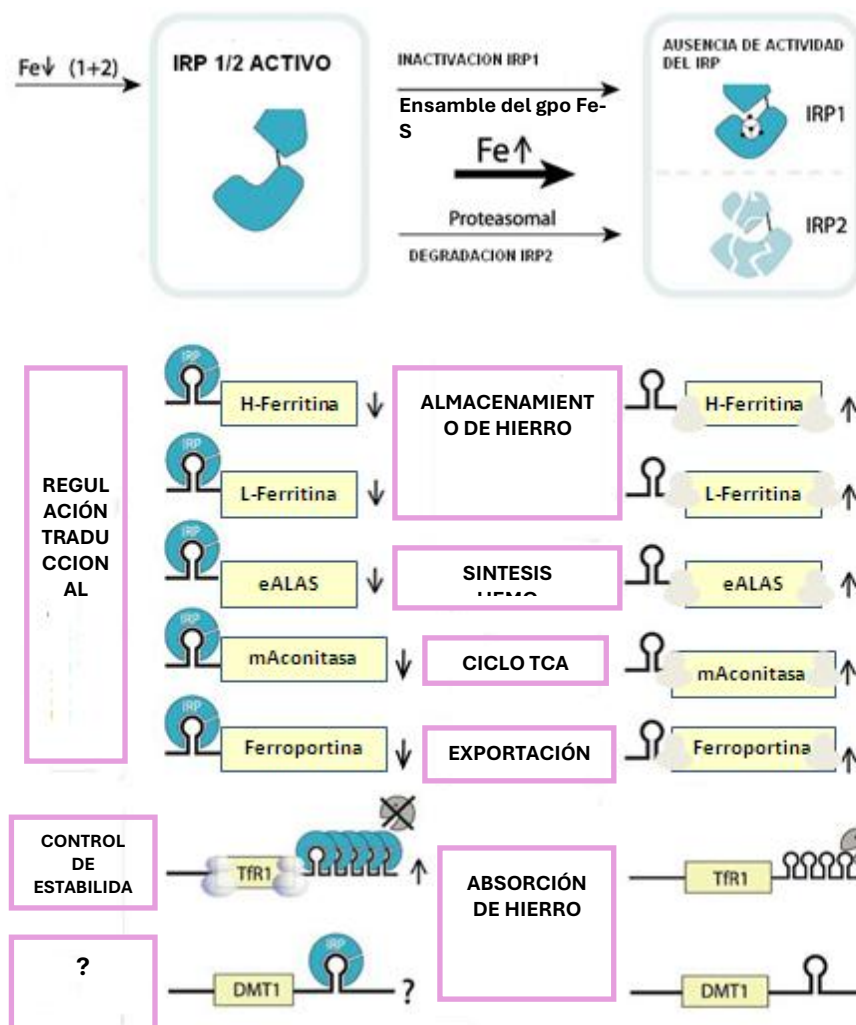


Figura 12. Sistema de Regulación IRE/IRP. Proteínas involucradas en el almacenamiento de hierro (Hentze y col., 2004).

a Proteína Reguladora de Hierro 1

La proteína IRP1 es la proteína más estudiada y es miembro de la familia de las aconitasas, tiene una longitud de 889 aminoácidos, con un peso molecular de 98 kDa y contiene un grupo Fe-S y bajo condiciones normales, la IRP1 se encuentra presente como aconitasa citosólica en el tejido (Meyron-Holtz y col., 2004). Esta proteína tiene 4 dominios, el primer dominio abarca del aminoácido 1 al 240, el segundo dominio del 241 al 367, el tercer dominio del 368 al 604, un *link* que ayuda a cambiar la conformación de la proteína de aconitasa a IRP o viceversa ubicado en la posición aminoacídica 605 a 660 y el cuarto dominio en el aminoácido 661 al 889 (Dupuy y col., 2006; Volz, 2008). Se han identificado 24 aminoácidos que se unen a los IRE's (Figura 14B) (Butt y col., 1996; Dupuy y col., 2006; Volz, 2008) en el dominio 1 son H126 y R149, dominio 2 L262, R269, N298 y E302, en el dominio 3 S371, K379, T438, N439, N535, R536 y L551 y el en dominio 4 S681, P682, G684, N685, R688, S708, R713, R728, R780, D781 y W782 (Dupuy y col., 2006).

El IRE (Figura 13 C) se une a la proteína IRP1 a través de la apertura cóncava, entrando en contacto con la burbuja y la parte baja del tallo, siendo la parte de la burbuja (A15 y G16) la que se introduce en la proteína e interacciona con los dominios 2 y 3, donde los nucleótidos A15, G16 y U17 proveen especificidad y estabilidad al sitio de unión. La parte baja del tallo C8 interacciona con el dominio 4 (Dupuy y col., 2006). Por otra parte, ensayos de mutagénesis y unión IRE: IRP1 indican que los residuos de cada uno de los cuatro dominios estructurales de la IRP1 contribuyen a la unión con el IRE (Basilion y col., 1994; Swenson y Walden, 1994; Kaldy y col., 1999).

Cuando los niveles de hierro son altos, un grupo 4Fe-4S de la IRP-1 se ensambla y se inhibe la actividad de unión al IRE por lo que se convierte en aconitasa (Haile y col., 1992a; Haile y col., 1992b; Rouault, 2006). Cuando los niveles de hierro celular son bajos, la IRP-1 se une al IRE, por lo que la IRP-1 actúa como una proteína bifuncional como se mencionó (Pantopoulos y col., 1996; Gegout y col., 1999; Brazzalotto y col., 2002).

En su estructura terciaria los dominios de la IRP1 tienen el siguiente arreglo 4, 1, 2 y 3 (Figura 13), los cuales sufren cambios moderados en los dominios 1 y 2 teniendo mayores modificaciones conformacionales los dominios 3 y 4 cuando la proteína cambia de IRP1 a aconitasa o viceversa. Para una primera aproximación, estos cambios pueden ser descritos como movimientos de cuerpo rígido con relación al núcleo (Figura 14). Las interacciones entre los dominios 3 y 4 que están presentes en la actividad aconitasa se eliminan cuando el dominio 4 rota 32° y se traslada ~14 Å quedando libres estas superficies para la interacción con los sitios de unión al ARN (Dupuy y col., 2006).

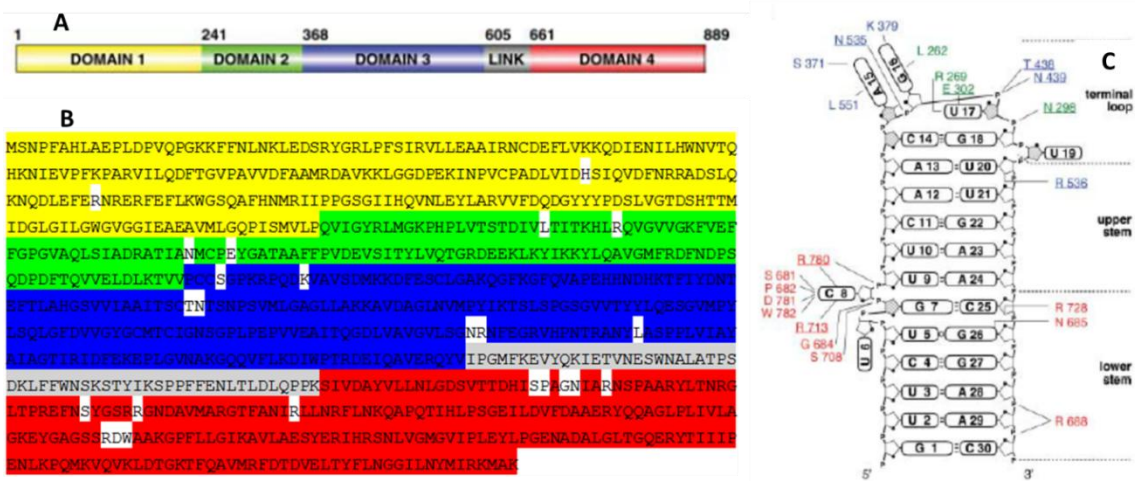


Figura 13. Estructura lineal de la proteína IRP1 y representación del IRE. A. Representación lineal por dominios de la proteína IRP. B. Secuencia en aminoácidos de la IRP1 y aminoácidos de unión al IRE. Amarillo: Dominio 1. Verde: Dominio 2. Azul: Dominio 3. Gris: *Link*. Rojo: Dominio 4. En blanco los aminoácidos que interactúan con el RNA. C. Resumen esquemático de las interacciones RNA-proteína (Dupuy y col., 2006).

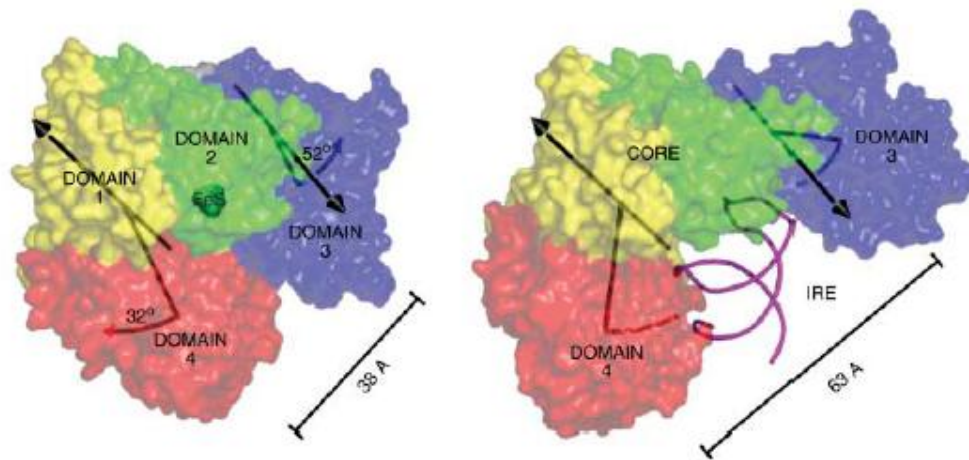


Figura 14. Aconitasa/Proteína Reguladora de Hierro. Diferencias en la posición del dominio entre aconitasa (izquierda) y la IRP: Complejo ARN-Proteína (derecha) (Dupuy y col., 2006).

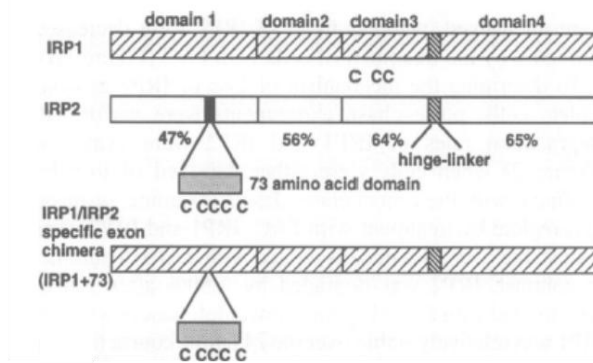
b Proteína Reguladora de Hierro 2

La IRP-2 posee un sensor de hierro (solo presenta 62% de homología con la IRP-1) no posee el grupo Fe-S y no tiene actividad de aconitasa. La IRP-2 tiene la capacidad de unirse con elevada afinidad a secuencias IRE en condiciones de bajo hierro, pero en alto hierro se degrada vía proteosoma (Iwai y col., 1995; Hentze y Kuhn, 1996; Muckenthaler y col., 1998; Hentze y col., 2004).

La IRP-2 tiene un peso molecular de 98 kDa y está conformada por cuatro dominios (Figura 15), dentro del primer dominio contiene una inserción de 73 aminoácidos ricos en prolina y cisteína en el extremo amino-terminal que se ha involucrado en la detección de hierro y en la degradación mediada por proteosoma (Guo y col., 1995; Butt y col., 1996; Leipuviene y Theil, 2007).

Los aminoácidos de unión al RNA en la IRP2 son K611, R616, R774 y R855, además en ensayos de afinidad se ha comprobado que la sustitución por residuos de glutamina en una posición no afecta la afinidad sobre los IREs (Butt y col., 1996).

A



B

MDAPKAGYAFEYLIETLNDSSHKFFDVSKLGTKYDVLPSYIRVLLAAVRNCDGFLMKKEDVMNILDWK
 TKQSNVEVPFFPARVLLQDFTGIPAMVDFAAMREAVKTLGGDPEKVHPACPTDLTVDHSLQIDFSK AIQ
 NAPNPGGGDLQKAGKLSPLKVQPKKLP RGQTT RGS DSGELGRNSGTFSSQIENTPILOPFHLQPVFE
 PETVLKNQEVEFGRNRERLQFFKWSSRVFKNVAVIPPGTGMHQINLEYLSRVVFEEKDLLFPDSVVGTD
 SHITMVNGLGILGWGVGGIETEAVMLGLPVSLT LPEVVGCELTGSSNPFVTSIDVVLGITKHLRQVGVAG
 KFVEFFGSGVSQLSIVDRTTIANMCPEYGAILSFFPVDNVT LKHLEHTGFSKAKLESMETYLKAVKLFRN
 DQNSSGEPEYSQVIQINLNS IVPSVSGPKRPQDRVAVTDMKSDFAQCLNEKVGFKGFQIAAEKQKDIVSI
 HYGSEYKLSHGSVIVAAVISCTNNCNPSVMLAAGLLAKKAVEAGLRVKPYIRTSLSPGSGMVTHYLSSS
 GVLFLYLSKLGF EIVGYCSTCVGN TAPLSDAVLNAVQSGDLVTCGILSGNKNFEGR LDCDCVRANYLASPE
 LVVAYAIAGTVNIDFQTEPLGTDPTGKNIYLHDIWPSREEVHRVEEH HVILSMFKALKDKIEMGNKRWNS
 LEAPDSVLFPPWDLKSTYIRCPSFFDKLTKEPIALQAIENAHVLLYLGDSTVTTDHI SPAGSIARNSSAAKY
 LTNRGLTPREFNSYGARRGNDAVMTRGTFANIKLFNKFIGKPAPKTIHFPSGQTLDFEAAELYQKEGIF
 LIILAGKKYGSGNSRDWAAGKPYLLGVKAVLAESYEKIHKDHILIGIGIAPLQFLPGENADSLGLSGRET
 SLTFPEELSPGITLNIQTSTGKVFSVIASFEDDVEITLYKHGGLLNFVARKFS

Figura 15. Proteína Reguladora de Hierro 2. A. Comparación de las proteínas IRP1 vs IRP2 (Iwai y col., 1995). B. Secuencia de aminoácidos y dominios de la proteína IRP2. Dominio 1: Amarillo, en rosa se encuentra representado el inserto de 73 aminoácidos que sirve como señal para la degradación vía proteosoma y **C** cisteínas de oxidación. Dominio 2: Verde. Dominio 3: Azul. **K** y **R** aminoácido de enlace al IRE. *Link*: Gris. Dominio 4: Rojo. **R** aminoácidos de enlace al IRE (Butt y col., 1996)

c Proteínas Reguladoras de Hierro en protozoarios

Se ha encontrado tanto en *P. falciparum* como en *T. vaginalis*, que además de poseer IRE's en su RNAm, cuentan con proteínas tipo IRP (Burrola-Barraza, 2001; Loyevsky y col., 2003; Calla-Choque y col., 2014). En *T. vaginalis* se logró sugerir la existencia de dicha proteína mediante *Western blot*, donde se obtuvieron bandas de aproximadamente 130 y 135 kDa al interaccionar las membranas con los anticuerpos anti-IRP-1 de humano (Figura 16). La proteína tipo IRP de *P. falciparum* presenta homología a la IRP de humano y tiene la capacidad de unirse a las estructuras tipo IRE del parásito (Loyevsky y col., 2003). En *T. vaginalis*, no hay homología de una IRP en su genoma por lo que mediante bioinformática no fue posible identificarla, así que de manera experimental se propone a una alfa-actinina 3 y a una proteína de choque térmico (HSP70) con función de unión al RNAm (Figura 17) de acuerdo a los ensayos realizados donde se purificó la proteína que interaccionó con los IREs identificados en los transcritos *tvcp4* y *tvcp12* (Solano-González y col., 2007; Calla-Choque y col., 2014; Figueroa-Angulo y col., 2015; León-Sicairos y col., 2023).

En cuanto a *G. duodenalis*, nuestro grupo de trabajo realizó comparaciones entre las secuencias IRP (humano y *P. falciparum*) y las secuencias de *Giardia* (GL50803_12174, GL50803_17385, debido a que estas presentaron mayor porcentaje de similitud al utilizar como sonda la secuencia de la proteína reguladora de hierro de *P. falciparum* parásito protozoario evolutivamente cercano a *Giardia* (Plata-Guzmán, 2015). Al realizar dichas comparaciones observamos al menos cuatro candidatos a IRP-like en *Giardia* (GL50803_14790 proteína hipotética, GL50803_11099 proteína 21.1,

GL50803_17385 proteína hipotética y GL50803_9327 NEK cinasa); de ellas, la que mostró mayor homología es la secuencia GL50803_17385 debido a que presenta más sitios conservados con las proteínas reguladoras de hierro de humano y *P. falciparum* (Figura 18), sin embargo, la homología es baja (Plata-Guzmán, 2015).

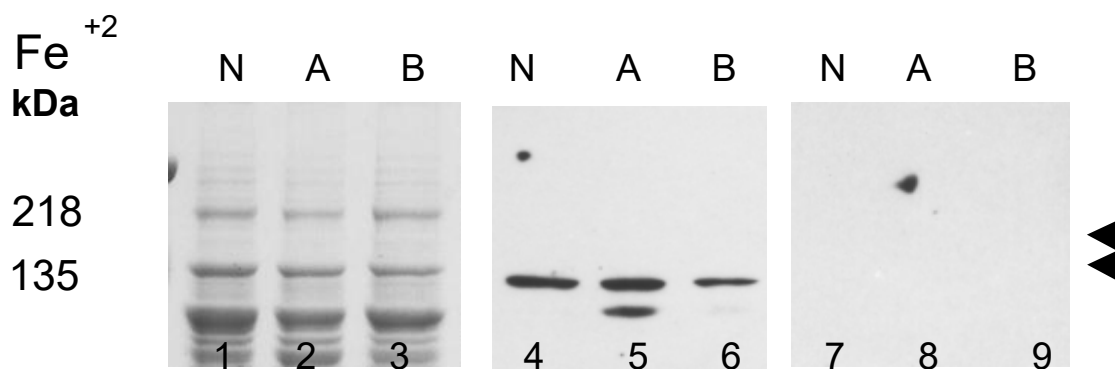


Figura 16. Proteínas tipo IRP en el citoplasma de *T. Vaginalis*. Ensayos de *Western blot* utilizando parásitos crecidos en condiciones bajas (carriles 3, 6 y 9), normales (carriles 1,4y 7) y altas (2, 5 y 8) de hierro (Burrola-Barraza, 2001).

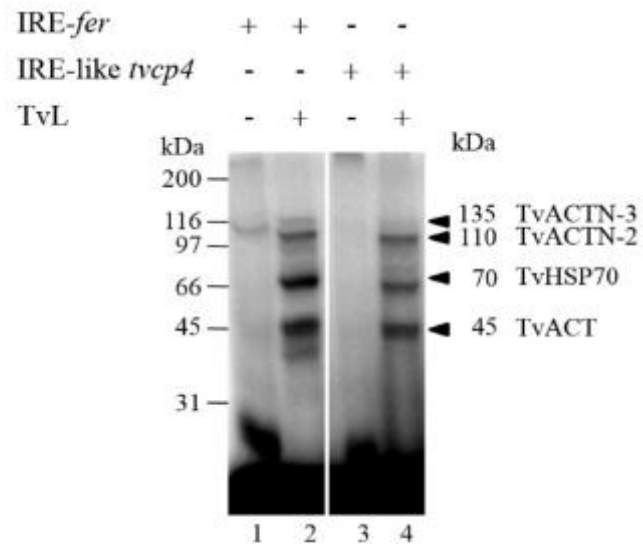


Figura 17. Identificación de proteínas de unión a RNA de *T. vaginalis*. Mediante ensayos de entrecruzamiento usando diferentes IREs como sondas y extractos citoplásmicos crecidos bajo condiciones restringidas de hierro. En el carril 1 y 4 se tienen las sondas libres de los RNAm del IRE-fer y IRE-like *tvcp4* respectivamente y en los carriles 2 y 4 son las interacciones de los extractos citoplásmicos con los IREs. Las flechas indican la posición de las bandas de 135, 110, 70 y 45 kDa de los complejos RNA-proteína (Figueroa-Angulo y col., 2015).

Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	MHFRCIRKYCINKKIVNPFHVQRTLNEKNYYYYDINELHDSRIKSLPY ----- -----
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	SIRVLLESAVRNCDNLKVSEKNVETILGWKENCKKKKEVPFMPTRVLLQD ----- -----
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	LTGVPCIVDLATMRD AEKLG CAERINPLIPVD LVIDHS VQVDYSRRED -----MRD AVKKLGGD PEKINPVCAD LVIDHS IQVDFNRRAD -----MISNTD QGLD VALQTRA ISDLYVHHI ISAGQRLRIT : . * * . * * : * : . . . *
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	ALELNEKKEYERNLER FKFL KWGMNS FKNML ILPP SGS I VHQ INLEYLAH SLQKNQDLEFERNRER FEFL KWGSQAF HNMRI I PPGS G I I HQ VNLEYLAR TPFKAPNRPVILVLGED YSGK SSLIS HITG SRLR SEG MCINI V PCVND : . . . : . : . . . * : : : :
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	CVFNKDNLLYPDS VVG TD SHT TMING--LGILGW VGG IEAEAT MLGL PI V FDQ DGYYPDS LVGT SHTT MD IG--LGILGW VGG IEAE AVML GQPI V AYF TD SLAD TLPS I HAC FRENG FP SGSH IRCS AF NSYS KQ TPGS VL STDQ . : * . . . : : . : * : . : . : : * .
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	SMTLPEVVGIN V VGKLS DYLL STDIVLYITS FL RKEVGV VNK YVEFFGTG SMVLPQVIGYRLMGK PH PLVT STD IVLTIT KHL R-QVGVVGK F VEFFGPG S QLQ SGF HNAN L SPTG KSMY STK STAEGTK QLP -----RGRD SS STSAS * : . * * . * * : :
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	LKDLKL ADRAT IS N MAPEYGAT VG FF PVDD ITLEY LLQT GRDKEKVELIR VAQ LSIADRAT IANMCPEYGAT AAFP VDEVSITY LVQT GRDEEKLYIK RYKDV SS NSATLYNSIDKLEK SVSHLP QSNN----ILHGASD QL MGPTCP . : : * * : : : : * : : : : * :
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	EYLMKNS M FNTYKD---N VEY TDVYTL DL SKLNLS SGPK RPHDN LL SE KY LQ AVG MR FD FND PSQDP DF TQVVELDLKTVV CCSG PKRPQDK VA VSD F IF IEVP FF YRY-----V IES TSKGIL SSL SNLSKR GKQ AKP SSL FSKA : : * : : : : . . * :
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	LHKDF TM CLESPIG FKG ---Y NI AKEEREKKIS FV CSKD G KEY VL SGSV MK KD FESCL GAK Q G FKG---F Q VAP EH NDHKT FI Y--DNTEFT LA HGSV ET RV FENT KAL F HQ VDKIL FTT SCGIDTK TEG FSVENGR LLHY ISSNE : * : : . : : . * . . : : . .
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	VLCAIT SCTNT SNSS MIA AG LLAK KAIEEFGLK SLPY IK SSL SPGSKTV V IA AIT SCTNT SNPS VMLG AG LLAK AVDAG-L NV MPY IK TS LS PGSGVV L FG KTTILIT KCD RLTD KQ SC DAI Q EY ASSLIL SPY RR FK MMN--LVCI : : * . . . : : : * : : * * : . : . :
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	Q KYL EAGGL LKYLE QLGFY NV GYG CM TC IG NSG HLDE EEVEEV INK NDLIV TY YLQ ESGVMPY LSQL GFDV VG YG CM TC IG NSG PL EPV VE AIT Q GD LV A PHYGN AK MAN Q AKT TRL KQ IC DT IR CLN-----EQ TR ALVD TS NI VLE * : . : . : * : : . . . : :
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	SS VL SGNR NF EGR VH PLIK ANY L ASP VL VV LF SI IGN VN VDLSN--YTFN VG VL SGNR NF EGR VH PN TR ANY L ASP LV IAY AI AGT IR ID FE KEPLGVN VT KL SATLSNR PQ QY G ASE VE TGAL PQ LSQ EP THLGIST LT LS-----A * * . . . : : . . : * * * : * : : .
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	Y KG KK INAL D LIP KEEIEEYESTYIK PE MYTEIY KN IKY VN KY WN DIQI AK GQ Q V FLKD IW PT RDE IQ AV ERQY VI PG MF KEVY Q KIET VN ES WN ALAT DK QD K FL SS SV AP SQ Q NY TLAD SLQ SN VV KT LA AS Q AI VN AMAG K LIS * . : . . : * : : : . : . : . * * . : :

Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	KKNKLYEWDKNSTYIHKPPYFENMTLEIEKIQDIKDAHVLLFLGDSITTD PSDKLFFWNSKSTYIKSPFFENLTLDLQPPKSIVDAYVLLNLGDSVTTD QCGTMLRVVNPNTYDAHSIISQ-----GPASSEVGLGNGLHQSCA ..: . .** . : . : * * * :
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	HISPAGMIHKTSEAYKFLKTKNIKDQDLNTYGARRGNDEVMIKGTGANIR HISPAGNIARNSPAARYLTNRGLTPREFNSYGSRRGNDAVMARGTFANIR STSRIGELLASTDELCSLEQSIQFVDNERILRDCHAVIVSILRRLEYNIR * * : .: : : : . :. : * ***
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	LINKLCPDKGPNTIHIPTNQLMSVYQAAMKYKQDNIDVIIAGKEYGCGS LLNRFNLNQAPQTIHLPSGEILDVFDAERYQQAGLPLIVLAGKEYGAGS AVRRIRKRKNAFLTLRLIMITLAILLCFMMAS-----AAQLFGADFLYAR ::: .: * : : : . . : * : :
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	SRDWAAGKPNLLGVKAVIAESYERIHRSNLIGMSVLPQLFINNQSPQYYN SRDWAAGKPFLLGIKAVLAESYERIHRSNLVGMGVIPLYLPGENADALG CHVHHLERHRIFEGGRFDGSALEMAICVLLYEIGVLGLQLRLATNTLTMVC . : : : . .: * * :. * : : .:
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	MDGTEKFTILLNDGNIKAQQTIKVMNQKGIIFDVLCRIDTEIEERYF LTGQERYTIIIP-ENLKPQMKVQVKLDTG---KTFQAVMRFDTDVELTYF IWAIVPLVLMAVFLDALYSAPLQNN-----LASLKKESYEVFK : . : : : : : : : : : : * :
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	RNGGILKYVLRSLVNEANK LNGGILNYMIRKMAK---- PMLILLDGFLEQKEHDVT- : * :

Figura 18. Alineamiento múltiple en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de humano, proteína reguladora de hierro de *P. falciparum* y la secuencia IRP-like GL50803_17385 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados (Plata-Guzmán, 2015).

D RNAm CON ESTRUCTURAS IREs

Otros RNAm eucariontes que contienen IREs en su 3'-UTR son: DMT1 (transportador de metales), CDC14A (que participa en la división celular) y MRCK α (cinasa de unión a Cdc42) los cuales no han sido bien estudiados (Leipuviene y Theil, 2007), sin embargo, se encuentra relación estrecha entre algunos polimorfismos de estos genes con enfermedades importantes como anemia, cáncer, diabetes, enfermedades infecciosas y deficiencias del sistema inmune en seres humanos (Good y col., 1988; Leipuviene y Theil, 2007; Malquori y col., 2008). Algunos RNAm de eucariontes primitivos que contienen estructuras tallo burbuja en sus UTR son: *tvcp12* (cisteína proteinasa del parásito protozoario *T. vaginalis*) (León-Sicairos y col., 2004; León-Sicairos y col., 2023) y en algunos que codifican para proteínas hipotéticas del parásito protozoario *P. falciparum* (Loyevsky y col., 2003; Militello y col., 2004). En cuanto a los RNAm que contienen IREs en su 5'-UTR se encuentran ACO2/acon (aconitasa mitocondrial), ferroportina, Subunidad β de la enzima succinato deshidrogenasa, ALAS2/ALASE/ASB (5'-aminolevulínico ácido sintetasa) y EPAS1/HIF-1 α (dominio endotelial PAS, inducible en hipoxia) (Leipuviene y Theil, 2007). En eucariontes primitivos, *tvcp4* (cisteína proteinasa 4 de *T. vaginalis*) (Solano-González y col., 2007), como se muestra en la Figura 19. Todos estos RNAm mencionados codifican proteínas que participan en el metabolismo del hierro (los de eucariontes superiores) o en la virulencia (los de eucariontes primitivos).

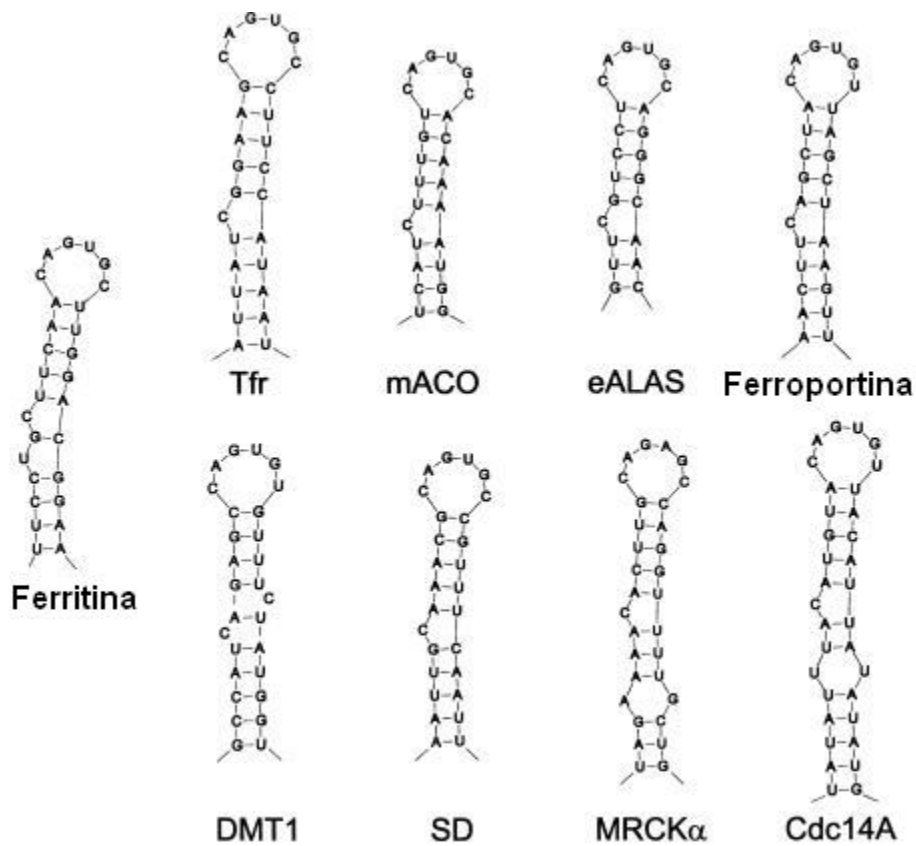


Figura 19. Elementos de Respuesta al Hierro (IREs). Estructuras tallo burbuja de RNAm de eucariontes superiores; Ferritina, Tfr, mACO, eALAS, Ferroportina, DMT1, MRCK y Cdc14A son genes de humano y SD es gen de *Drosophila melanogaster*. Tomado de Piccinelli y Tore, 2007.

IV JUSTIFICACIÓN

A pesar de que el hierro es un elemento esencial para el crecimiento poblacional de la mayoría de los protozoarios; además, regula la expresión diferencial de los genes involucrados en la virulencia y mecanismos de patogenicidad como la citoadherencia y citotoxicidad, en *G. duodenalis* poco se sabe del efecto del hierro en dichos mecanismos. El estudio del efecto del hierro en los mecanismos de patogenicidad ayudará a entender la biología del parásito y puede contribuir al estudio de nuevos métodos de diagnóstico y alternativas de tratamiento contra una de las infecciones más frecuentes a nivel mundial.

V HIPÓTESIS

El hierro afecta el crecimiento poblacional del parásito, así como la virulencia y expresión de genes de *G. duodenalis* debido a la presencia de estructuras tallo burbuja en las regiones no traducidas de sus RNAm.

VI OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del hierro en la patogenicidad de *G. duodenalis* y la presencia de estructuras tallo burbuja en sus RNAm.

B OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto del hierro sobre el crecimiento poblacional de *G. duodenalis*
2. Estudiar el efecto del hierro en los mecanismos de patogenicidad.
3. Identificar RNAm expresados diferencialmente por hierro en los trofozoítos de *G. duodenalis*.
4. Determinar la presencia de estructuras tallo-burbuja en RNAm de *G. duodenalis*.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

1 Cultivos de *G. duodenalis*

Se utilizó el aislado WB de *G. duodenalis* donado por la Dra. Guadalupe Ortega Pierres del departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN y Dr. Héctor Samuel López Moreno de nuestra Facultad. Los trofozoítos fueron cultivados en medio TYI-S-33 enriquecido con suero fetal bovino al 10%, bilis 1 g/L, pH de 7.0, 50 µg/mL de gentamicina. Al medio de cultivo se le añadió citrato de amonio férrico (sigma) a una concentración de 200, 300 y 500 µM para obtener las condiciones de alto hierro, y resina quelex para las condiciones de bajo hierro (7.7 µM) previo al inóculo de los parásitos crecidos en condiciones normales. Las giardias fueron cosechadas en tubos falcom de 15 mL con medio nuevo por enfriamiento a 4°C, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min (Bagchi, 2012), posteriormente se decantó el sobrenadante, luego la pastilla se resuspendió en 1.5 mL de suero fetal bovino; se homogenizó y se resuspendió en 13.5 mL de medio nuevo, finalmente se incubó a 37 °C por 24 h (Tasca y col., 2005). El cultivo se observó periódicamente en un microscopio invertido (Leica) para verificar su crecimiento y descartar contaminación, al llegar a su fase logarítmica los trofozoítos fueron decantados en tubos falcom de 15 mL, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4°C posteriormente se decantó el sobrenadante, luego la pastilla se procesó de acuerdo a los ensayos necesarios o se resuspendieron en 90% de suero fetal bovino y 10% de DMSO para su almacenamiento a -70 °C y uso posterior (Bagchi, 2012).

B MÉTODOS

1 Efecto del hierro en los mecanismos de patogenicidad

a Cinética para medición del crecimiento de *G. duodenalis* en diferentes concentraciones de hierro

La medición del crecimiento de los trofozoítos de *G. duodenalis* se realizó partiendo del medio de cultivo TYI-S-33 en condiciones normales de hierro (100 μM) el cual fue descrito anteriormente. Para obtener condiciones de alto hierro en el medio, a éste se le adicionó citrato de amonio férrico a una concentración de 200, 300 y 500 μM y para las condiciones de bajo hierro (7.7 μM) se añadieron 1.25 g de resina quelex dejándose en agitación en un ambiente frío (4 °C) durante 16 h. Además, se utilizó medio de cultivo TYI-S-33 sin citrato férrico de amonio ni suero fetal bovino como un control sin fuente alguna de hierro. Para la cinética de crecimiento se inocularon 5×10^6 trofozoítos crecidos en las diferentes condiciones de hierro y se incubaron a 37 °C para obtener los tiempos $t_0=0$, $t_1=24$, $t_2=48$, $t_3=72$, $t_4=96$, $t_5=120$, $t_6=144$ y $t_7=168$ h., transcurrido el tiempo, los cultivos con las diferentes condiciones de hierro, se centrifugaron en tubos falcom de 15 mL a 1500 rpm, 4 °C durante 5 min, a la pastilla se le realizó un lavado con PBS 1X, se homogenizó y se colocaron 10 μL en la cámara de Neubauer para realizar el conteo de los trofozoítos del parásito. Después, se preparó una dilución 1:10 con azul de tripano y se añadieron 10 μL en una cámara de Neubauer para verificar la viabilidad de los trofozoítos. Finalmente, el conteo, viabilidad y morfología del parásito se determinaron y se observaron en un microscopio invertido (Leica). Los experimentos se realizaron por triplicado.

b Cultivos Celulares

Los experimentos se realizaron con líneas celulares (HT-29). Se crecieron con medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino y antibiótico (penicilina-estreptomicina-glutamina) en condiciones de 5% de CO₂ y 37 °C para la tripsinización y conteo celular. Las células en 90% de confluencia se lavaron dos veces con una solución salina de PBS pH 7.0 y posteriormente se les agregó 1.5 ml de tripsina-EDTA (Gibco) y se incubaron a 37 °C de 5-10 min para propiciar la separación celular del frasco de cultivo. Después, se transfirió la tripsina con las células a tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 2500 rpm durante 6 min a 4 °C, pasado el tiempo se observó la formación del sedimento celular en el tubo, se le retiró la tripsina y se agregó 1 ml de DMEM. Para contar las células se tomaron 20 µl de las células con medio DMEM y se realizó una dilución 1:2 con azul de tripano. Finalmente se contaron las células con la ayuda de una cámara de Neubauer. Se utilizaron aproximadamente 2,000 células/pozo de microplaca de ensayo. Los experimentos se realizaron por triplicado.

c Ensayo de Adhesión

Las monocapas confluentes de células epiteliales fueron lavadas dos veces con PBS estéril antes de la interacción con los parásitos. Los cultivos de trofozoítos de *Giardia* en las diferentes condiciones de hierro se procesaron para obtener una suspensión final en medio DMEM sin suero fetal bovino en donde se realizó el conteo en cámara de Neubauer. Se realizaron diferentes pruebas con diluciones de parásitos las cuales se co-incubaron con las células en cultivo por 3 h a 37 °C en 5% de CO₂. Posteriormente, se removieron los parásitos no unidos de las placas con breves lavados con medio DMEM sin suero fetal

bovino. Los parásitos unidos fueron recuperados por incubación con medio DMEM sin suero fetal bovino frío por 10 min a 4 °C y se recontabilizaron en una cámara de Neubauer. Todos los ensayos se realizarán por triplicado.

d Ensayo de Citotoxicidad

Las monocapas confluentes de células epiteliales fueron lavadas dos veces con PBS estéril antes de la interacción con los parásitos. Se utilizaron los extractos de los parásitos crecidos en las diferentes concentraciones de hierro. Para ello, las diferentes concentraciones de extractos diluidas en medio DMEM sin suero fetal bovino se co-incubaron con las células en cultivo por 3 h a 37 °C en 5% de CO₂. Posteriormente se tomaron alícuotas de los sobrenadantes en los cuales se realizó la determinación enzimática de proteínas intracelulares por kit comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante.

2 Identificación de RNAm expresados diferencialmente por Fe

a Extracción de Ácidos Nucleicos

Con la ayuda del reactivo TRIzol[®] (INVITROGEN) (la cual es una técnica de extracción de RNA un solo paso), se realizó la extracción primeramente de los ácidos nucleicos de los trofozoítos de *G. duodenalis*, cultivadas bajo las diferentes condiciones de hierro (alto, bajo y norma). Por cada 10 x 10⁶ millones de trofozoítos se agregó 1 ml de TRIzol[®] a las muestras, luego, se incubaron durante 5 minutos en hielo y se les adicionó 200 µl de cloroformo, después se agitaron por inversión durante 30 segundos y luego se

incubaron 10 minutos a temperatura ambiente; de nuevo se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C durante 20 minutos. Después se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se adicionaron 200 µl de cloroformo. Luego se incubaron de nuevo las muestras y se centrifugaron en las condiciones anteriores (12,000 rpm, 4°C, 20 minutos). Posteriormente se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se adicionaron 0.5 ml de isopropanol frío para precipitar el RNA por 48 horas a -20°C. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 11,000 rpm por 10 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Se realizaron dos lavados a la pastilla con 1 ml de etanol al 70% , centrifugando cada vez a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4° C. Posteriormente la pastilla se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 50µl de agua inyectable.

b Cuantificación e Integridad de Ácidos Nucleicos

Las muestras que se obtuvieron de la extracción con Trizol se diluyeron (1:500) en agua inyectable y se cuantificaron en un espectrofotómetro.

La integridad del RNA se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa corrido a 80 Volts por 45 minutos. Finalmente, las muestras se almacenaron a -70°C para su uso posterior.

c Remoción de DNA contaminante del RNA obtenido

Para este ensayo se utilizó el kit masterpure™ RNA purification (EPICENTRE) siguiendo las especificaciones de la casa comercial. A cada muestra se le agregaron 0.5 µl de enzima DNasa y 19.5 µl de “1XDNase Buffer”. Después, las muestras se incubaron a 37°C durante 40 minutos. Posteriormente, a cada muestra se le agregaron 20 µl de 2XT y solución de lisis “CLysis solution” y se mezclaron con agitación manual, posteriormente

se agregaron 20 µl de “MPC Protein Precipitation Reagent”; y se mezclaron de nuevo manualmente por diez segundos para colocarse en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 10,000 xg a 4°C hasta formar el pellet o pastilla. Después, se transfirió el sobrenadante de RNA a un tubo limpio para microcentrífuga y se descartó el pellet. Luego, se precipitó el RNA agregando 50 µl de isopropanol al sobrenadante y dejando en reposo a 4°C por 24 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 4°C a 2,500 rpm durante 10 minutos y se decantó el isopropanol cuidadosamente sin disolver el pellet de RNA. Posteriormente, las muestras se lavaron dos veces con 50 µl de etanol al 70% centrifugando cada vez 5 minutos a 4°C a 2,500 rpm cuidadosamente. Finalmente, la pastilla se secó a temperatura ambiente y las muestras se resuspendieron en 10 µl de agua inyectable o libre de RNAsas.

d Diseño de Oligonucleótidos

Para la amplificación por PCR, se diseñaron oligonucleótidos específicos internos (Oligo 7.2 Software) para: *Actina*, *Citocromo B*, *Glucosamina-6-phosphato deaminasa* y *Subtilisina* (Cuadro 8). Las secuencias se obtuvieron de la base de datos del genoma de *Giardia* (www.giardadb.org). Como control positivo y de cantidad para la amplificación por PCR, se utilizaron los oligonucleótidos de *β-Tubulina* (Sentido: 5' AGATCGTCCACATCCAGGCA 3' y Antisentido: 5' CTTCGGGGACGGGACGACGG 3').

Cuadro 8. Oligonucleótidos diseñados para ensayos de RT-PCR.

Oligonucleótido	Secuencia ^a
Actina Sentido	GGGGTCAGTTAAATACGG
Actina Antisentido	AGATGGGGGGGAGAGAAGA
Citocromo B Sentido	CAGCCCGCCCGTAAGATT
Citocromo B Antisentido	CTCCTCTGATTTGTTCTT
Glucosamine-6-phosphate deaminase Sentido	GAGAAAAGATTTGCCAGA
Glucosamine-6-phosphate deaminase Antisentido	CTCTTTTATATCACGCAC
Subtilisina Sentido	AGCAAGGTCAATATAAAG
Subtilisina Antisentido	CCTCACACTTGCTCTCAC

^aLos oligonucleótidos fueron diseñados con el programa Oligo 7.2 y se realizó BLAST en NCBI para descartar *match* con otros genes de *G. duodenalis*.

3. Predicción de estructuras tallo-burbuja en RNAm de *G. duodenalis*

Para obtener las secuencias que codifican proteínas de virulencia, ribosomales, del citoesqueleto y metabólicas, utilizamos la base de datos del genoma de *G. duodenalis* (Aurrecoechea y col., 2009; Xu y col., 2020). Los extremos de las secuencias se delimitaron de acuerdo con los reportes en la literatura. La región 5' UTR se delimitó de acuerdo a lo reportado por Knodler y Elmendorf (Knodler y col., 1999; Elmendorf y col., 2000). Estos autores proponen regiones ricas en A/T como iniciador de la transcripción. Una A en medio de la secuencia rica en A/T podría ser el mejor sitio de inicio de la transcripción (Tolba y col., 2013). En la región 3' UTR se buscó la señal de consenso polyA AGTPuAA (Peattie y col., 1989), que está ligeramente degenerada en las posiciones 1, 2 y 3, así como la señal ATGGAA ubicada entre 9 y 13 pb río arriba de donde se lleva a cabo la poliadenilación (Que y col., 1996). Además, de los motivos reportados como señal de poliadenilación (AGUGAA, GUGAAC, de las cuales AGUGAA es el motivo más común identificado en *G. duodenlis*), se buscaron de acuerdo con lo reportado por Franzen (2013). Una vez delimitadas las secuencias, las estructuras secundarias fueron analizadas por el programa Zuker mfold (Zuker, 2003).

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A El hierro afecta el crecimiento de *G. duodenalis*

Al ser el hierro un elemento esencial para los seres vivos, su estudio es de gran importancia también para los patógenos, incluyendo los protozoarios. Algunos de ellos han desarrollado proteínas de unión a la hemoglobina, reductasas y transportadores, e incluso, los protozoos son capaces de obtener hierro de la lisis directa de las células huésped. Esta captura de hierro está regulada para evitar la toxicidad por la formación de radicales libres. Por ejemplo, los protozoos *E. histolytica* y *T. vaginalis*; regulan muchas de las moléculas involucradas en la adhesión a la célula huésped, expresión de factores de virulencia, moléculas involucradas en su crecimiento y metabolismo dependiendo de las condiciones del hierro (Álvarez-Sánchez y col., 2000; Park y col., 2001; Hernández-Gutiérrez y col., 2003, 2004; Lee y col., 2008; Soto-Castro y col., 2019). Para evaluar el efecto del hierro sobre el crecimiento de *G. duodenalis*, se realizó una cinética de crecimiento a diferentes concentraciones de hierro en el cultivo (0, 7.7 μM , 100 μM , 200 μM , 300 μM y 500 μM) hasta 120 h a 37 ° C, el conteo, la viabilidad y la morfología del parásito se observaron en un microscopio invertido (Leica). Después de 24 h (t_1), el número de parásitos fue de 7.6×10^6 trofozoítos en bajo hierro (7,7 μM), 8.2×10^6 trofozoítos en medio normal (100 μM) 7.2×10^6 , 7.1×10^6 y 7.2×10^6 trofozoítos en concentraciones de hierro de 200 μM , 300 μM y 500 μM y 7.5×10^4 trofozoítos en el control sin hierro (Figura 20). Cuando se extendió el tiempo de incubación ($t_2 = 48$ h), el número de parásitos aumentó, observando un mayor crecimiento de parásitos en condiciones bajas de hierro que en condiciones altas de hierro. El número de parásitos alcanzó su valor máximo después de 72 h de cultivo:

16.6 x 10⁶ trofozoítos en bajo hierro (7,7 µM), 22.1 x 10⁶ trofozoítos en medio normal (100 µM), 15.9 x 10⁶, 19.5 x 10⁶ y 17.2 x 10⁶ trofozoítos en concentraciones de hierro de 200 µM, 300 µM y 500 µM. Sin embargo, después de 96 y 120 h el número de parásitos disminuyó en todas las condiciones de hierro, lo que podría sugerir que el parásito es capaz de adaptarse a diferentes condiciones de este metal. Por lo tanto, en ausencia de este catión se observó una drástica disminución en el crecimiento del parásito en el rango de 7.7 µM a 100 µM, sugiriendo que el hierro es un elemento importante para el crecimiento de los trofozoítos de *G. duodenalis*. Sin embargo, el parásito puede adaptarse a las diferentes concentraciones de este metal, en un rango de 7.7 µM a 500 µM.

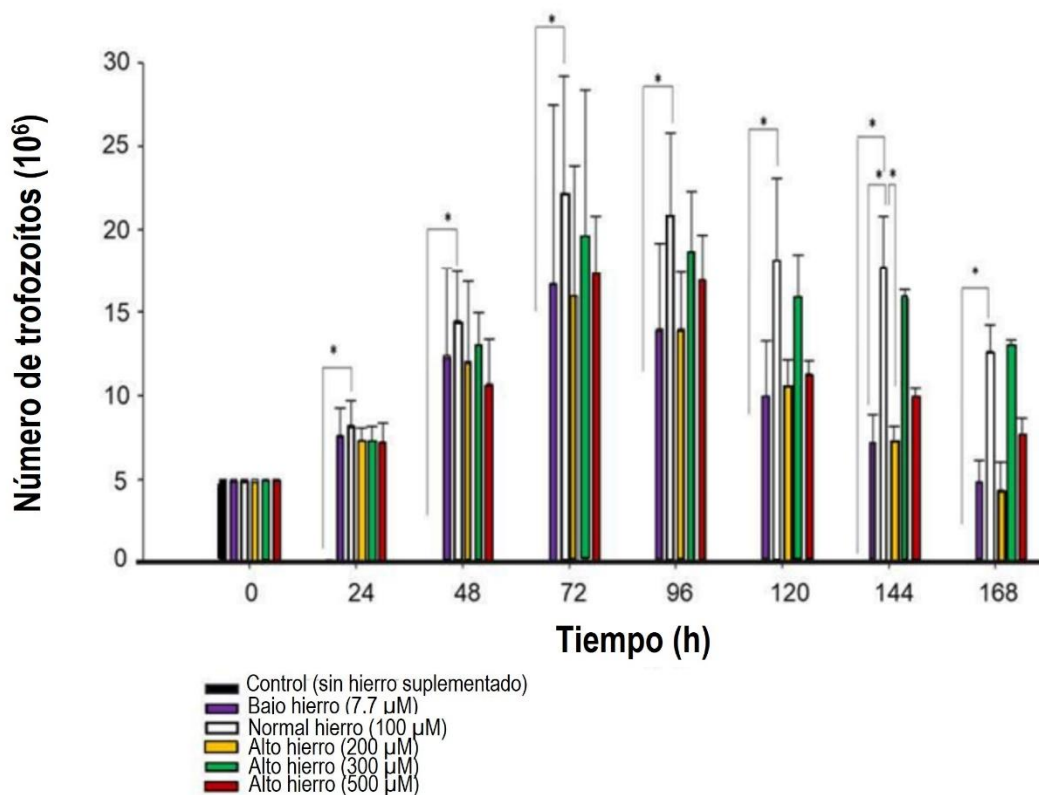


Figura 20. Efecto del hierro sobre el crecimiento poblacional de *G. duodenalis*. Para la cinética de crecimiento de *G. duodenalis* se inocularon 5×10^6 trofozoítos en diferentes condiciones de hierro: 7.7 μ M (en color morado, Bajo), 100 μ M (en color blanco, Normal), 200 μ M (en color amarillo, Alto), 300 μ M (en color verde, Alto), 500 μ M (en color rojo, Alto) y como control (en color negro), sin hierro suplementado. Los trofozoítos se incubaron a 37 °C durante los tiempos t1=0, t2=24, t3=48, t4=72, t5=96, t6=120, t7=144 y t8=168.

B Efecto del hierro en la adhesión y citotoxicidad de *G. duodenalis* a células HT-29

La adhesión de los trofozoítos de *G. duodenalis* a las células epiteliales intestinales permite la aparición y el mantenimiento de la giardiasis. Durante estas interacciones, las células epiteliales pueden comprometerse a la apoptosis por enzimas secretadas por los parásitos, incluidas las cisteín proteasas que se identifican cada vez más como factores de virulencia en los parásitos protozoarios (Ortega-Pierres y col., 2019). Además, los trofozoítos de *Giardia* se adhieren fuertemente a las células epiteliales intestinales a través de un disco adhesivo ventral, causando un daño significativo, así como la interrupción de las células gastroepiteliales en ausencia de la invasión celular, secreción de toxinas e inflamación (Emery y col., 2016). Se ha reportado que la actividad de algunas proteínas secretadas por *Giardia* juegan un papel importante en la adhesión (Jenkins y col., 2009; Hernández-Sánchez y col., 2008; Rodriguez-Fuentes y col., 2006). Para evaluar el efecto del hierro en la adhesión de *G. duodenalis*, se realizaron interacciones de trofozoítos del parásito crecidos en medios de cultivo en diferentes concentraciones de hierro con células intestinales HT-29 (Figura 21). Primeramente, los trofozoítos de *Giardia* se cosecharon a diferentes concentraciones de hierro (Bajo= 7.7 μ M, Normal= 100 μ M y Alto= 300 μ M). Posteriormente, los parásitos se incubaron con las células intestinales a diferentes tiempos (t_1 = 0 h, t_2 = 3 h, t_3 = 6 h, t_4 = 12 h, t_5 = 24 h y t_6 = 48 h). La cinética se realizó en una relación de 1:4 (células HT-29: Giardias). Después de 3 h (t_2) se observó una adhesión de 17.21% en los trofozoítos crecidos en bajo hierro, 14.43 % en los parásitos crecidos en medio normal y 14.96 % en los crecidos en alto hierro. Posteriormente, a las 6 h de interacción se siguió observando un poco más adhesión en los parásitos crecidos en

condiciones bajas de hierro, sin embargo, fue hasta las 12 h (t4) que se visualizó mayor adhesión en los parásitos crecidos en alto hierro. Después de 24 h (t5) se obtuvo una adhesión de 16.02 % en los trofozoítos crecidos en bajo hierro, 24.29 % en los parásitos crecidos en medio normal y 27.05 % en los crecidos en alto hierro. Finalmente, a las 48 h se observó una disminución en la adhesión del parásito a las células HT-29, sin embargo, se obtuvo un mayor porcentaje en las condiciones de alto hierro. Los resultados obtenidos muestran mayor adhesión de las *Giardias* crecidas en alto hierro con las células intestinales. Estos hallazgos muestran un comportamiento similar con la cinética de crecimiento del parásito mostrada en la Figura 20. Estos resultados coinciden con lo reportado en *E. histolytica*, donde se realizó una cinética similar a la mostrada en este trabajo (Lee y col., 2008). Además, nuestro grupo de laboratorio identificó homólogos de adhesinas en el genoma de *G. duodenalis*: Enzima málica GL50803_14285, PFO GL50803_17063 GL50803_114609 y precursores de catepsina B GL50803_14019 GL50803_16160 GL50803_16779 GL50803_10217 GL50803_16468 GL50803_15564 GL50803_17516. Algunos homólogos son proteínas de metabolismo, lo cual podría sugerir que son bifuncionales como en el caso de AP65 y AP120 en *T. vaginalis*. Los precursores de catepsina B podrían facilitar la adhesión al degradar mucina en el intestino y proteger al parásito de inmunoglobulinas de forma similar a *E. histolytica* (León- Beltrán y col., 2023).

Durante la interacción del trofozoíto con las células epiteliales intervienen diversas moléculas de superficie del parásito; como las giardinas (alfa, beta, delta y gamma), así

como una compleja red de proteínas contráctiles que desempeñan un papel clave en la adhesión del trofozoíto (Cotton y col., 2011).

Otro mecanismo de patogenicidad es la citotoxicidad, la estrecha unión entre los trofozoítos de *Giardia* y las células epiteliales intestinales desencadena una serie de eventos que culminan en la producción de diarrea. Hasta la fecha, se cree que estas etapas fisiopatológicas implican mayores tasas de apoptosis de enterocitos, disfunción de la barrera del intestino delgado, activación de linfocitos del huésped, acortamiento de las microvellosidades del borde en cepillo con o sin atrofia vellosa concomitante, deficiencias de disacaridasas, malabsorción intestinal, hipersecreción aniónica y aumento de la velocidad del tránsito intestinal (Cotton y col., 2011). Por lo tanto, realizamos un ensayo para evaluar el daño citotóxico donde se interactuaron células HT-29 con trofozoítos de *Giardia* crecidos a diferentes condiciones hierro (Bajo= 7.7 μ M, Normal= 100 μ M y Alto= 300 μ M) durante 6 horas de incubación a 37 ° C, 5 % de CO₂ (Figura 22), observándose un mayor daño al monocapa celular ocasionada por los trofozoítos crecidos en altas condiciones de hierro. Por lo tanto, este ensayo nos sugiere que el hierro es un elemento clave para la citotoxicidad a células intestinales, además del crecimiento y adherencia por lo tanto es esencial para la virulencia del parásito.

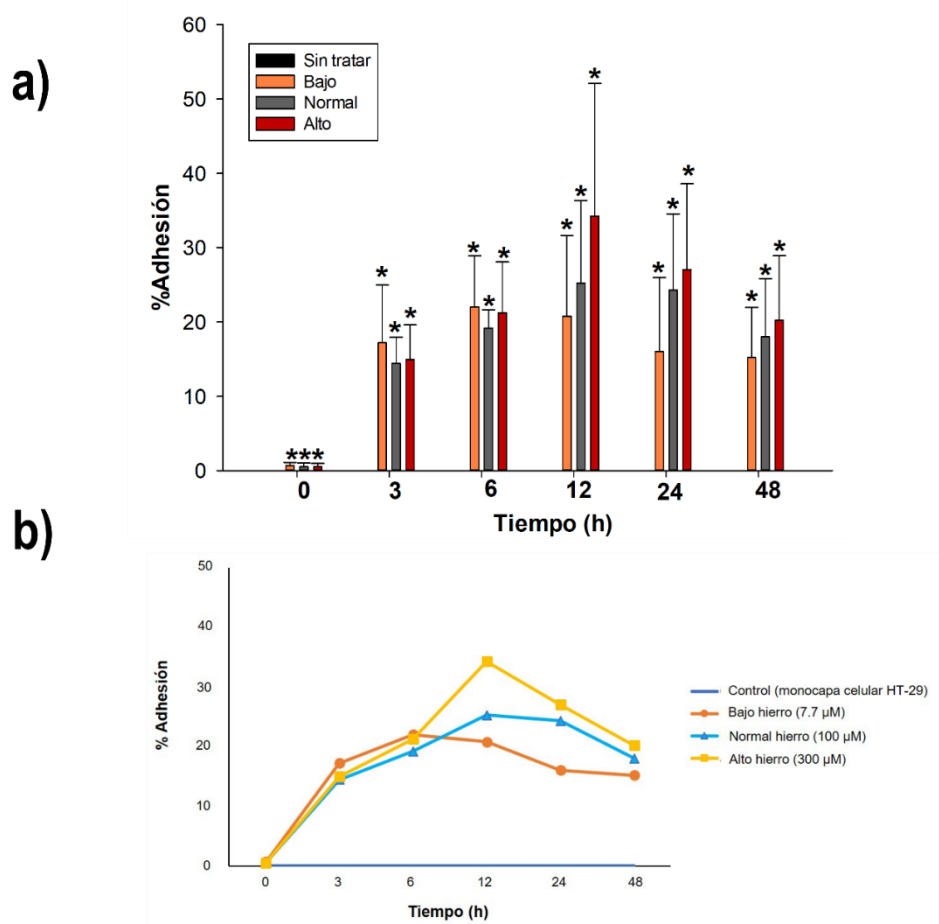


Figura 21 Efecto del hierro en la adhesión de *Giardia* a células HT-29. a) Para la cinética de adhesión se inocularon 2.4×10^6 trofozoítos crecidos en diferentes condiciones de hierro: $7.7 \mu\text{M}$ (en color naranja, Bajo), $100 \mu\text{M}$ (en color gris, Normal), $300 \mu\text{M}$ (en color rojo, Alto) y como control (en color negro, sin hierro suplementado). Los trofozoítos se incubaron a 37°C , 5% CO_2 durante los tiempos $t_1=0$, $t_2=3$, $t_3=6$, $t_4=12$, $t_5=24$, $t_6=48$. b) Gráfico para representar los ensayos de otra manera. El ensayo de adhesión se inició mediante la interacción de 2.4×10^6 trofozoítos en diferentes condiciones de hierro: $7.7 \mu\text{M}$ (O en color naranja; Bajo), $100 \mu\text{M}$ (Δ en color azul; Normal), $300 \mu\text{M}$ ($\square$ en color amarillo, Alto) y como control (en color azul, monocapa celular HT-29), se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 durante los tiempos $t_1=0$, $t_2=3$, $t_3=6$, $t_4=12$, $t_5=24$ y $t_6=48$ h. Los ensayos se realizaron por triplicado.

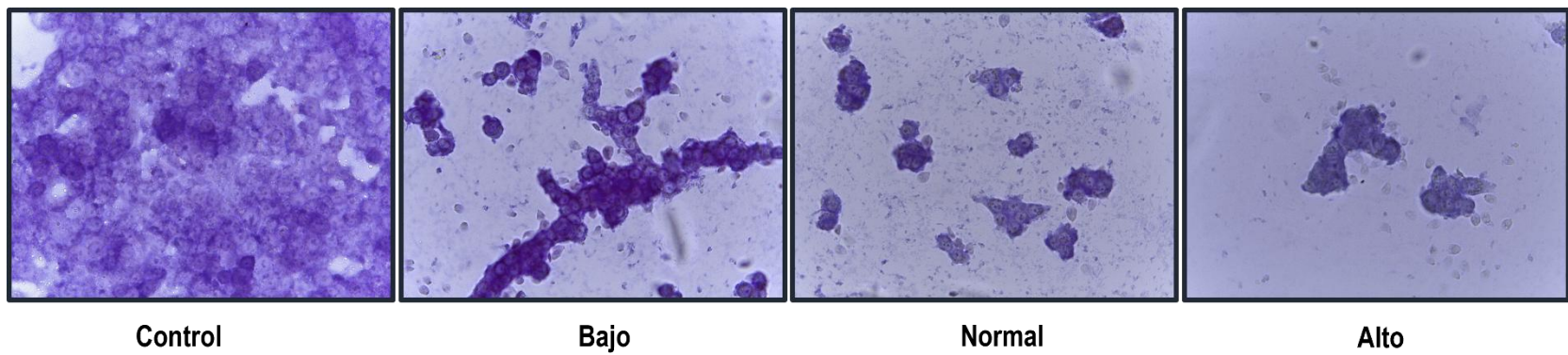


Figura 22. Efecto del hierro en la citotoxicidad de *Giardia* a células HT-29. La interacción se inició con 1.2×10^6 trofozoitos de *G. duodenalis* crecidos en diferentes condiciones de hierro (Bajo= 7.7 μM , Normal= 100 μM y Alto= 300 μM) durante 6 horas de incubación a 37 ° C, 5 % de CO_2 .

C La expresión de los RNAm de Actina, Citocromo b5, Glucosamina 6 fosfato desaminasa y Subtilisina son moduladas diferencialmente por hierro

Para investigar si el hierro afecta la expresión de los genes de virulencia de *G. duodenalis* como se ha reportado en *E. histolytica* y *T. vaginalis* (Park y col., 2001; Solano-González y col., 2007; Lee y col., 2008; Torres-Romero y Arroyo, 2009; Soto-Castro y col., 2019), se realizaron ensayos semicuantitativos de RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para los genes de Actina, Citocromo b5 y Glucosamina 6 fosfato desaminasa y RNA de cultivos de parásitos crecidos en las diferentes condiciones de hierro. Es importante mencionar primero porqué se estudió la expresión de dichos genes. Actina es necesaria para conservar las funciones celulares y participa en el control de la morfología celular de *Giardia* (Paredes y col., 2014). Además, participa en el proceso de crecimiento y enquistamiento de este parásito (Castillo-Romero y col., 2009). Por otro lado, el parásito protista *Giardia* carece de mitocondrias, confiando en vías de fosforilación y fermentación a nivel de sustrato para satisfacer su necesidad de energía, y en su huésped de biomoléculas complejas (Jarroll y col., 1989), sin mitocondrias *Giardia* carece de un centro de producción y demanda de hemo, sin embargo, posee genes que codifican proteínas de hemo (Morrison y col., 2007). Por lo tanto, se analizó la expresión de hierro del Citocromo b5 porque es una proteína hemo con un papel importante en el metabolismo del hierro en el parásito *G. duodenalis* (Rafferty y col., 2015). Por otra parte, la Glucosamina 6 fosfato desaminasa es una enzima con una función específica crucial en el ciclo de vida y el metabolismo de *G. duodenalis* (Kwiatkowska-Semrau y col., 2015). Además, esta enzima participa en el proceso de enquistamiento del parásito (Lopez y col.,

2002). Finalmente, analizamos la expresión por hierro del gen de Subtilisina debido a que pertenece a la familia de las serin proteasas y juega un rol importante en el proceso de desenquistamiento de *Giardia* (Davids y col., 2011). Nuestros resultados mostraron que los cuatro genes están regulados negativamente por hierro, debido a que se sobreexpresaron en condiciones de bajo contenido de este metal (Figuras 23-26). La expresión de estos genes es similar a la de *Ehhmbp26*, además, esta secuencia de RNA puede formar dos estructuras tipo IRE en ambas UTR; sin embargo, la estructura tipo IRE en el 3'-UTR parece más estable (Soto-Castro y col., 2019). Esta estructura contiene la A-U conservada en el tallo superior (como se reporta en eucariotas superiores) (Volz, 2008; 2021) y los residuos AUU en el tallo que podrían ser una variante del motivo GUU el cual es específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo, 2009) o un nuevo motivo específico de *E. histolytica*. Además, se ha reportado que es negativamente regulado por hierro (Sánchez-Cruz y col., 2012); por lo tanto, la estructura tipo IRE ubicada en el 3'-UTR podría ser funcional. Posiblemente, estos genes que están regulados por el hierro en *Giardia* tienen estructuras tallo-burbuja en sus RNAm.

Los resultados de este trabajo muestran que los cuatro genes están regulados negativamente por el hierro. Además, pueden formar estructuras tallo burbuja (similares a IRE) en ambas UTR. Debido a la presencia de una estructura similar a IRE en el 3'-UTR del RNAm y la regulación negativa observada del hierro, estos genes podrían ser regulados a nivel postranscripcional por el sistema IRE/IRP, así como ocurre con el receptor de transferrina, que contiene cinco estructuras IRE en la región 3'-UTR, y en condiciones de bajo contenido de hierro, la proteína similar a IRP se puede unir a las

estructuras de tallo burbuja, dando estabilidad al RNAm y llevando a cabo su traducción (Pantopoulos, 2004).

Al ser *G. duodenalis* un organismo ancentral que divergió muy tempranamente en la evolución, el hecho que regule sus genes de acuerdo a las condiciones de hierro en el medio ambiente podría representar un modelo de estudio interesante para la evolución del mecanismo regulador IRE/IRP, en sus primeras etapas de evolución.

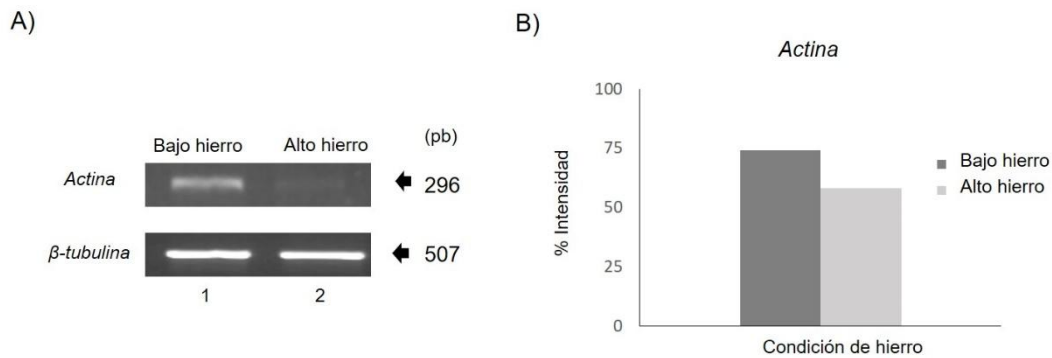


Figura 23. La expresión del RNAm de *Actina* de *G. duodenalis* se modula diferencialmente por condiciones de hierro. A) Ensayo semicuantitativo de RT-PCR con oligonucleótidos específicos para el gen de *Actina* utilizando ADNc de parásitos cultivados en condiciones bajas de hierro (7,7 μ M; carril 1) y altas en hierro (300 μ M; carril 2). El gen de *β -tubulina* se utilizó como control interno. Los tamaños de los amplicones se dan en pb. B) Análisis densitométrico utilizando un GelDoc (BioRad) con el software de análisis Quantity One 4.6.3.1-D. Los valores de expresión de *β -tubulina* se usaron para normalizar los resultados de la expresión de RNAm de *Actina* en ambas condiciones de hierro.

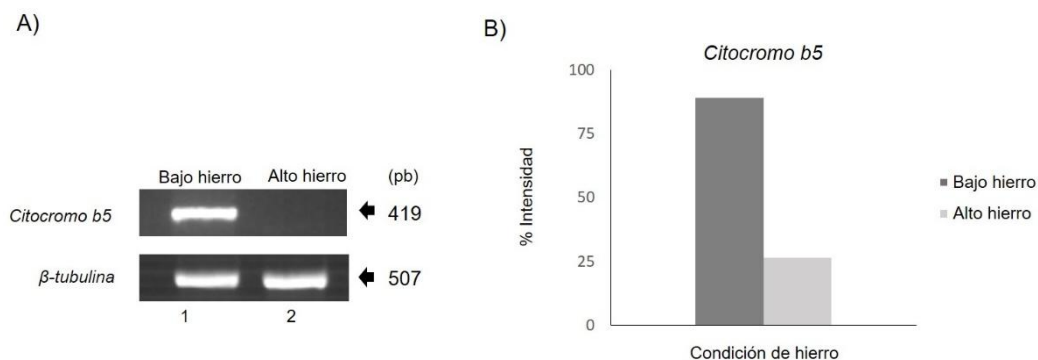


Figura 24. La expresión del RNAm de *Citocromo b5* de *G. duodenalis* se modula diferencialmente por condiciones de hierro. A) Ensayo semicuantitativo de RT-PCR con oligonucleótidos específicos para el gen de *Citocromo b5* utilizando ADNc de parásitos cultivados en condiciones bajas de hierro (7,7 μ M; carril 1) y altas en hierro (300 μ M; carril 2). El gen de β -tubulina se utilizó como control interno. Los tamaños de los amplicones se dan en pb. B) Análisis densitométrico utilizando un GelDoc (BioRad) con el software de análisis Quantity One 4.6.3.1-D. Los valores de expresión de β -tubulina se usaron para normalizar los resultados de la expresión de RNAm de *Citocromo b5* en ambas condiciones de hierro.

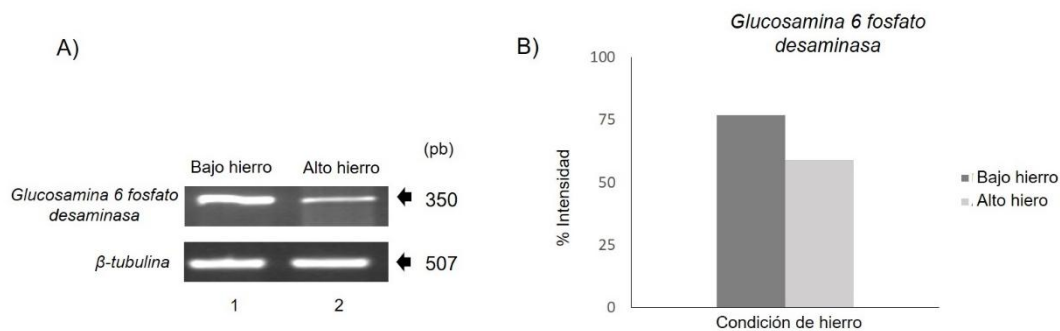


Figura 25. La expresión del RNAm de *Glucosamina 6 fosfato desaminasa* de *G. duodenalis* se modula diferencialmente por condiciones de hierro. A) Ensayo semicuantitativo de RT-PCR con oligonucleótidos específicos para el gen de *Glucosamina 6 fosfato desaminasa* utilizando ADNc de parásitos cultivados en condiciones bajas de hierro (7,7 μ M; carril 1) y altas en hierro (300 μ M; carril 2). El gen de *β-tubulina* se utilizó como control interno. Los tamaños de los amplicones se dan en pb. B) Análisis densitométrico utilizando un GelDoc (BioRad) con el software de análisis Quantity One 4.6.3.1-D. Los valores de expresión de *β-tubulina* se usaron para normalizar los resultados de la expresión de RNAm de *Glucosamina 6 fosfato desaminasa* en ambas condiciones de hierro.

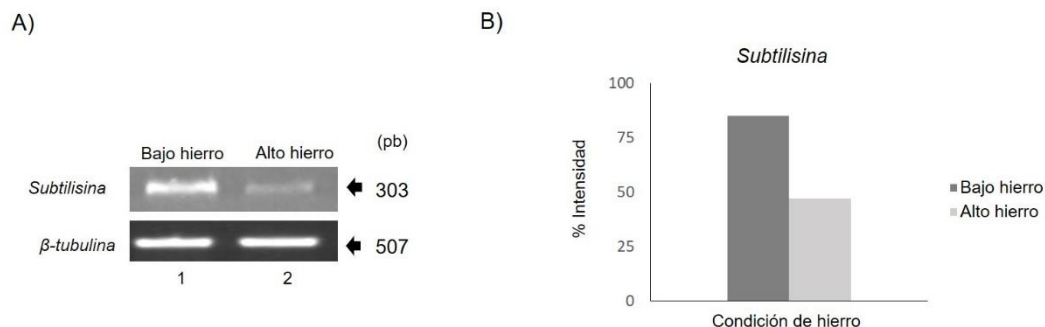


Figura 26. La expresión del RNAm de *Subtilisina* de *G. duodenalis* se modula diferencialmente por condiciones de hierro. A) Ensayo semicuantitativo de RT-PCR con oligonucleótidos específicos para el gen de *Subtilisina* utilizando ADNc de parásitos cultivados en condiciones bajas de hierro (7,7 μ M; carril 1) y altas en hierro (300 μ M; carril 2). El gen de β -tubulina se utilizó como control interno. Los tamaños de los amplicones se dan en pb. B) Análisis densitométrico utilizando un GelDoc (BioRad) con el software de análisis Quantity One 4.6.3.1-D. Los valores de expresión de β -tubulina se usaron para normalizar los resultados de la expresión de RNAm de *Subtilisina* en ambas condiciones de hierro.

D Presencia de estructuras tallo-burbuja en RNAm de *G. duodenalis*

El hierro forma parte importante en el crecimiento y virulencia de *Giardia*, la gran necesidad del parásito por dicho catión se refleja en la anemia causada sobre todo en niños con giardiasis (Bartelt y col., 2013), donde, después del tratamiento con metronidazol se observa un aumento de hemoglobina en la sangre (Monajemzadeh y Monajemzadeh, 2008; Olivares y col., 2004) por lo que la presencia de *Giardia* en niños está estrechamente relacionada con malnutrición y se ha considerado un marcador de dicha condición (Bartelt y col., 2013; Al-Mekhlafi y col., 2005). Por lo tanto, el hierro podría desempeñar un papel clave en la virulencia de *Giardia* (Monajemzadeh y Monajemzadeh, 2008; Al-Mekhlafi y col., 2005; Olivares y col., 2004; Suchan y col., 2003). A pesar de esto, casi no hay estudios sobre el efecto del hierro en el crecimiento, expresión génica, o mecanismos reguladores en *Giardia*. Recientemente, Peirasmaki y col., (2020) reportaron sobre la expresión de posibles factores de virulencia en *Giardia* en los niveles de hierro libre detectados por experimentos RNAseq (Peirasmaki y col., 2020); sin embargo, el mecanismo de regulación del hierro sigue siendo desconocido. Para buscar los elementos tallo-burbuja en RNA involucrados en este mecanismo regulador, realizamos un análisis bioinformático de las secuencias en la base de datos del genoma de *Giardia*. Se analizaron diferentes grupos de RNAm's: de virulencia, ribosomales, citoesqueleto y enzimas metabólicas. Primero, las regiones no traducidas se delimitaron como se ha reportado (Xu y col., 2020; Franzèn y col., 2013; Tolba y col., 2013; Aurrecoechea y col., 2009; Tasca y col., 2005; Zuker, 2003; Elmendorfs y col., 2000; Knodler y col., 1999; Que y col., 1996; Peattie y col., 1987; Keister, 1983). Como se mencionó en antecedentes, los genes

de *Giardia* tienen una secuencia corta de 6 nt en el RNAm de la región 5'UTR que podría actuar como un sitio de anclaje ribosómico para la síntesis de proteínas (Adedoja y col., 2020). Además, las regiones promotoras de este parásito parecen ser muy compactas y las regiones intergénicas son muy cortas (a veces menos de 250 pb). Este parásito también contiene regiones cortas (1-6 nt) no traducidas. Sin embargo, se ha demostrado que estas regiones tienen los elementos necesarios para la regulación transcripcional, que son una región rica en A-T. El elemento iniciador de este parásito consiste en 8-11 nt (posición -30 en ATTA AAA) (Franzén y col., 2013; Tolba y col., 2013; Elmendorfs y col., 2000; Knodler y col., 1999; Henderson y col., 1996; Que y col., 1996; Peattie y col., 1989) con sus variantes. Una A en el medio de la secuencia rica en A-T podría ser el mejor sitio de inicio de la transcripción (Tolba y col., 2013; Knodler y col., 1999). Además, Holberton y Marshall (Henderson y col., 1996) sugieren que la secuencia del sitio de inicio de la transcripción está compuesta de nueve bases (AATTAAAA) y está asociada con otras secuencias como el promotor CAATTT. Además, ha sido reportada una señal de poliadenilación de 20-30 nt río abajo del codón de paro (AGTPuAApy) (Que y col., 1996). En la región 3'-UTR, se encuentra la señal consenso poliA AGTPuAA (Xu y col., 2020), que está ligeramente degenerada en las posiciones 1, 2 y 3, así como una señal ATGGAA ubicada 9-13-nt río arriba del sitio de poliadenilación (Tolba y col., 2013). Adicionalmente, Franzén y col., (2013) reportaron posibles señales de poliadenilación a los motivos AGUGAA y GUGAAC, de los cuáles el motivo AGUGAA es el más común identificado en *G. duodenalis* (Franzen y col., 2013). Además, en ese estudio, a un subconjunto de genes le faltaba un claro motivo, lo que sugiere que es posible que no se

requiera un estricto motivo de poliadenilación para la formación adecuada del extremo 3', como ocurre en las eucariotas superiores (Franzen y col., 2013) (Figura 27).



Figura 27. Delimitación de secuencias de *G. duodenalis* que codifican a proteínas de virulencia, ribosomales, del citoesqueleto y del metabolismo. (Adedoja y col., 2020; Xu y col., 2020; Franzèn y col., 2013; Tolba y col., 2013; Elmendorfs y col., 2000; Knodler y col., 1999; Henderson y col., 1996; Que y col., 1996; Peattie y col., 1989).

De acuerdo con reportes previos, en este trabajo, las regiones 5' y 3'-UTRs fueron delimitadas (Cuadro 9-12). De este modo, las regiones 5' y 3'-UTR se delimitaron para buscar la formación de estructuras tallo-burbuja utilizando el software Zuker mfold (Zuker, 2003). En este análisis, 91 secuencias formaron estructuras secundarias tipo IRE. Interesantemente, 38 de los 91 RNAm mostraron estructuras tallo-burbuja en los extremos 5' y 3'-UTR en todos los grupos analizados. Sin embargo, observamos más estabilidad en una de las dos estructuras formadas de las UTR para cada RNAm. Esta estabilidad se basa en el dG y la presencia de motivos reportados [una reducción en dG (dG negativa) es una condición necesaria para la espontaneidad de la formación de la estructura] (Zuker, 2003; Mathews y col., 1999). Además, los cuatro genes regulados por el hierro; la *Actina* (GL50803_40817), el *Citocromo b5* (GL50803_9089), la *Glucosamina 6 fosfato desaminasa* (GL50803_10839) y la *Subtilisina* (GL50803_114625) pueden formar dos estructuras similares al IRE en ambas UTR, incluida la región codificante, tal como se reporta en la *tvcp4*-IRE, *actin*-IRE y *Ehhmbp26* -IRE de *E. histolytica* (Solano-González y col., 2007; Soto-Castro y col., 2019). El extremo 3' de *Actina*-IRE posee en la burbuja una secuencia atípica al consenso humano (Franzen y col., 2013), residuos U-A conservados en el tallo superior (Volz, 2021; Henderson y col., 1996). Por otro lado, los IRE-like en los extremos 3'-UTR de Citocromo b5 y Glucosamina 6 phosphato deaminasa tiene un nucleótido no apareado en el tallo, así como el motivo AUU en el bucle de manera similar al motivo GUU que es específico para parásitos protozoarios (Torres-Romero y Arroyo, 2009) (Figura 34). Solo diez secuencias compartieron similitud con el bucle humano conservado (CAGUGN) (Henderson y Kuhn, 1995), correspondiente a la

proteína relacionada con la actina (en la región codificadora 3' y UTR) y la membrana mitocondrial externa del citocromo B5 (GL50803_9089, en el 5'CR), así como algunas secuencias anotadas como proteínas ribosómicas (Figuras 30-32). La mayoría de las estructuras de horquilla contienen los nucleótidos conservados A-U en el tallo superior y algunos bucles del tallo tienen residuos en las posiciones 1-5 que forman un pseudotriloop, como se ha informado en eucariotas superiores (Volz, 2021; 2008; Vanacova y col., 2003; Mathews y col., 1999; Henderson y col., 1996). Además, algunas secuencias contienen el motivo similar al IRE de *tcp4* (GGCACA) como el precursor de la catepsina L (GL50803_9548, estructura similar a IRE en la región de codificación 5') (Solano-González y col., 2007). Curiosamente, el motivo del bucle GUU informado como un motivo similar a IRE específico de protozoos (Torres-Romero y Arroyo, 2009) estuvo presente en todos los grupos analizados (Figuras 28-34). Además, también se encontraron dos nuevos motivos en las estructuras tipo IRE de *Giardia*, las secuencias CUU / AUU que están presentes en 28 de los 91 RNAm analizados (Figuras 28-34), lo que sugiere la presencia de nuevos motivos para este parásito o una nueva variante del motivo del bucle GUU reportado como un motivo específico de protozoos (Torres-Romero y Arroyo, 2009). Sin embargo, algunas estructuras no exhiben ninguno de estos motivos en el *loop*; estas secuencias se encontraron en la estructura del tallo. Piccinelli y Samuelson (2007) llevaron a cabo un análisis bioinformático de RNAm's para más de 100 nuevas secuencias, por ejemplo, ferritina, receptor de transferrina, aconitasa mitocondrial, ferroportina y DMT1 de diferentes especies. Estas secuencias formaron estructuras tipo IRE en la burbuja, presentando la secuencia CAGUGN y en algunos IREs presentaron un bulto con

los nucleótidos UGC/C en el tallo con una citosina no apareada. A pesar de la ausencia de la secuencia canónica CAGUGN en la burbuja, en algunas estructuras tipo IRE de *G. duodenalis* encontradas en nuestro análisis bioinformático, se observó el abultamiento UGC/C, como en el precursor de la catepsina L (*Cathepsin L precursor*) (5'CR) (GL50803_9548), la dipeptidil dipeptidasa (*Dipeptidyl peptidase III*) (5'UTR/CR) (GL50803_3822), y la proteína ribosomal L37 (*Ribosomal protein L37*) (3'CR/UTR) (GL50803_14171). Además, en el tallo de las secuencias del precursor de catepsina B (*Cathepsin B precursor*) (5'CR) (GL50803_14019) y otro locus del precursor de catepsina B (*Cathepsin B precursor*) (5'CR) (GL50803_16779) presentaron el loop CGC, que es similar al UGC reportado por Piccinelli y Samuelsson (2007). Estos datos sugieren que en *Giardia* existen algunas estructuras tallo burbuja similares al UGC/C, que podrían representar una versión ancestral al IRE de ferritina.

Cuadro 9. Delimitación de secuencias de *G. duodenalis* que codifican a proteínas de virulencia

Nombre común	Gen ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_14019	5'CR	cuuuuccucca <u>uuu</u> [u]aaaAUGaagcucu <u>uuuccuc</u> gccgcugcag cuuucucugcgcgcgc ccugacggucuccgagc
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_14019	3'UTR	ugagUAAgca <u>augaa</u> uacucu <u>UGUAAAC</u> ggaaga[u]cuca
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_16160	5'UTR	guauuc <u>uagcagguuuuu</u> a[u]g <u>uuuc</u> uaccaguuAUGgaugcauu gauugagccaa aacugcuuuagcuaaagucuuu
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_16160	3'UTR	acuaugcagacguagagUGAuccgcuuuu <u>uguccuca</u> aacugugucugg ugguccggguu aagcuaaaaaguuacagcgggcauggaccuugaucuccg gAUGAACGccgaa/g/agauuagca
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_16779	5'CR	aagcuuacggaa <u>uu</u> [u]uaaAUGaagcucu <u>uuuccuc</u> gccgcugcagc uuucucugcgcgcgc ccugacggucuccgagcu
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_16779	3'CR/UTR	cauugaagagcaaguuauagguggguucuuugagaacUAAcugguga auccauuuu auAGUAAAUcaugg[c]/caggaggggu
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_10217	3'UTR	gacAUGgcgcugucuucauacauagcuacc <u>auugcc</u> uaauggguag aAGUAAACguuuuu[c]ugguccaugcauuaaaa
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_15564	5'CR	cuagcauggcuuuuuu[u]uugcuc <u>uuu</u> auggucagacggcaccAU Gcgcgcggga auccucuggguggcgcugucggg
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_16468	3'UTR	uggcagguagcagugaagUAAacguccaaagc <u>uuuu</u> ugggaaaaAG UCAUGcccggg[u]guaucuuugcugcagcgccgc
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_17516	5'CR	cuuauacaggaa <u>uu</u> ugcuccuuugaaggaacagagaa <u>uccu</u> [u]uaaaA UGaggc <u>uu</u> cugauccuucugauugcauccua
<i>Cathepsin B-like cysteine proteinase 3</i>	GL50803_114165	5'CR	ugcuccgggaacggccacggaa[a]uaaaAUGaugguacuuc <u>uacc</u> au ucuugcuauugcuauauggcacacuuggcagaga
<i>Cathepsin B-like cysteine proteinase 3</i>	GL50803_114165	3'UTR	acu <u>uuc</u> acggua <u>cu</u> agaugacacucauUGAcacacucugaugaac <u>uag</u> auGGUAAAU cuaucc[u]aagcaaagauguuguc

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas de virulencia en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

Continuación

Nombre común	Gen ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Cathepsin L precursor</i>	GL50803_3169	5'CR	aauaguuaacaacugcaau <u>cuaagac</u> [a] <u>ucucac</u> AUG uuagcgcuaau gcucuuuuauug ucugcuguguuuccaugaucc
<i>Cathepsin L precursor</i>	GL50803_3169	3'UTR	ugcugcaggaagUAGgugcggaugacuucua <u>aacuaauagugaauagu</u> agugaauAGUAAUA gacuag[u]ggacaacuuagg
<i>Cathepsin L precursor</i>	GL50803_16380	3'CR/UTR	uacgugaugguag UAA auugcccggguuggugaauugcucuggc cuug <u>GUCAAAA</u> aaug[u]ccuugccaagucuaaaa
<i>Cathepsin L precursor</i>	GL50803_14983	3'CR/UTR	agcuacgcgguauguuaacaaaagaaaaagc UAA aguaaaaucugugg acgcugucuaauu <u>AGUGCAA</u> ucagg[u]gacuugg
<i>Cathepsin L precursor</i>	GL50803_17607	3'UTR	uugggUGAcuaauau <u>augguacuuaaggagcgcuaauagccccucaa</u> acuggcca accuuugc <u>AUGGUAC</u> ucugc[u]gugu
<i>Cathepsin L-like protease</i>	GL50803_3099	5'CR	guaaaauacgaaaau <u>auau</u> [u] <u>uaaaaga</u> accaua AUG uaucuuug uugguguuacau acugucgaauccucugcauucc
<i>Cathepsin L-like protease</i>	GL50803_137680	5'UTR/CR	guguaaaaccugaagg <u>acuuu</u> [a] <u>uaaaaguagug</u> AUG ugguugucc uauuuu cugguuacuuuuugcuugaacucuuug
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_112831	5'UTR/CR	cggcuaccuaccgcggcccaa[a] <u>aaaggaccgg</u> AUG uugcugcuu acuuugucuuu uccucugcgcggcaucggccgagc
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_112831	3'CR/UTR	uacaucuuccacagcccgcuaaccugaaccuuccgcacaagggcgug UA GcgccuagcgCCCGAA Cucccg[u]cguaga
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_113656	5'UTR/CR	cggcuaccuaccgcggcccaa[a] <u>aaaggaccgg</u> AUG uugcugcuu accuugucuuu uccucugcgcggcgucggccgagc
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_113656	3'CR/UTR	uacaucuuccacagccccucaaccugaaccuuccgcacaagggcgug UA GcgccuagcgCCCGAA Cucccg[u]cguaga
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_114773	5'UTR/CR	cggcuaccuaccgcagcccaa[a] <u>aaaggaccgg</u> AUG uugcugcuu ccuugucuuu uccucugcgcggcaucggccgagc
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_114773	3'CR/UTR	ccucaaccugaaccuuccgcacaagggcgug UAGcgccuagcgCCCG AA Cucccc[g] <u>ucguagaggguggu</u> cagguagaug

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas de virulencia en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

Continuación

Nombre común	Gen ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_114915	5'UTR/CR	cggcuaaccuaucgcgcggcccaa[a] aaaggau cggAUG <u>Guugcugcuu</u> acuuugucu uuuccucugcgcggcgucggccgagc
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_114915	3'CR/UTR	uacaucuccacagcccgcucaaccugaaccuuccgcaca agggcgugUA Ggccuagcg <u>CCCGAAC</u> uccccg[u]cguaga
<i>Dipeptidyl-peptidase III</i>	GL50803_3822	5'UTR/CR	agggggggaauauaa[a] uuuccAUGcugccugaga aguauauuugcc cgacagaugg acccguuucuaacuugaagccaucg
<i>Dipeptidyl-peptidase III</i>	GL50803_3822	3'UTR	ggaaaUAAaug cgacguuguaaguug auuguaauaacugcuuagauca caucuauucuaagggga <u>GGUAAA</u> Gaugg[u]augg
<i>Dipeptidyl-peptidase I precursor</i>	GL50803_14566	5'CR	aacaauaagaagccggccagaa[a] aaaau cAUGcuuuuac <u>uucggcg</u> cuccuggga cucuuaauaauacagauacuccagca
<i>Dipeptidyl-peptidase I precursor</i>	GL50803_28651	3'UTR	cugaccaugcauuaUAGaug cacugaguguuu aacugagugcuuau gc <u>CAUAAA</u> Gacucaccuau[u]cucuacaauaaua
<i>Dipeptidyl-peptidase III</i>	GL50803_33689	5'CR	gcuagcuuuuacugugaauuauucauuu[u] ucuaAUG cuaac gaau gcccuaucuggagcuuu cacggucaaccugaagc
<i>Dipeptidyl-peptidase III</i>	GL50803_33689	3'UTR	guaacaacaucuuuguuuuccucugcuaacUG Acua uacagugucuaua uucucga <u>GCUUAAU</u> cagcaac[u]gcuugugaau
<i>Encystation-specific protease</i>	GL50803_22553	3'CR/UTR	caggaggagagugaggagcuaagcaug cuuu caaa <u>uuccaUGA</u> <u>AGUA</u> <u>AAU</u> gauuccacaag[u]acaauuacaaaacagccau
<i>Hypothetical protein</i>	GL50803_6369	5'UTR/CR	ccucuagagauga[u] gaaac gagagauagacuc <u>auAUG</u> gacuacug gauugcucgua aacucuuggggagaagagugggga
<i>Hypothetical protein</i>	GL50803_113303	3'UTR	uucacggauuuggaugacacuc <u>auUG</u> Acacacucugaugaacuagau <u>GGUAAA</u> Ucuaucc[u]aagcaaagauguugcggg
<i>Sentrin specific protease</i>	GL50803_16438	3'UTR	aagaucuggacgagcucug cUAG gccuau gggucuggu gucuaaguug ugu <u>UUGAAAA</u> cccuac[u]cugcccguguuaggg

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas de virulencia en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

Continuación

Nombre común	Gen ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Variant-Specific Surface Protein 150 (VSP-150)</i>	GL50803_135831	5'CR	ugugcucaaggg <u>uacu</u> [u]cuuauacAUGauggcuguuacaagguug gucaagaaccaggu agucauauugugcaagacagc
<i>Variant-Specific Surface Protein 150 (VSP-150)</i>	GL50803_135831	3'UTR	cuggugguucauauaguagagggagggcaUG AcucagguAGUGAAU gcua[u]acaauugugauaauggguaauagagggg
<i>Variant-Specific Surface Protein 5 (VSP-5)</i>	GL50803_113797	5'UTR	ccccgggcuuugcguuggaagcgcca[c]ccagc aggucggcgcc cuaAU Guucggcagauuuuugcucgcgaucgucaucc
<i>Variant-Specific Surface Protein 5 (VSP-5)</i>	GL50803_113797	3'UTR	ugcuggugguuccucugcagggggaaggcgUAGauguacuuagau AG UAAAC cgua[u]cgaugggucugcucggugucug
<i>Variant-Specific Surface Protein 277 (VSP-277)</i>	GL50803_14307	5'UTR/CR	cagggggccugcgacgccaucgugguc[g]gcaacgacggcagcAUGcuc ucuu acuguucaaaguguguuggcgccggcuau
<i>Variant-Specific Surface Protein 277 (VSP-277)</i>	GL50803_14307	3'UTR	ccucugcuggugguucguguguagaggggaaggcgUG AcuuagguAG UGAAU gcug[u]gcagugugugauagugggugauau

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas de virulencia en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

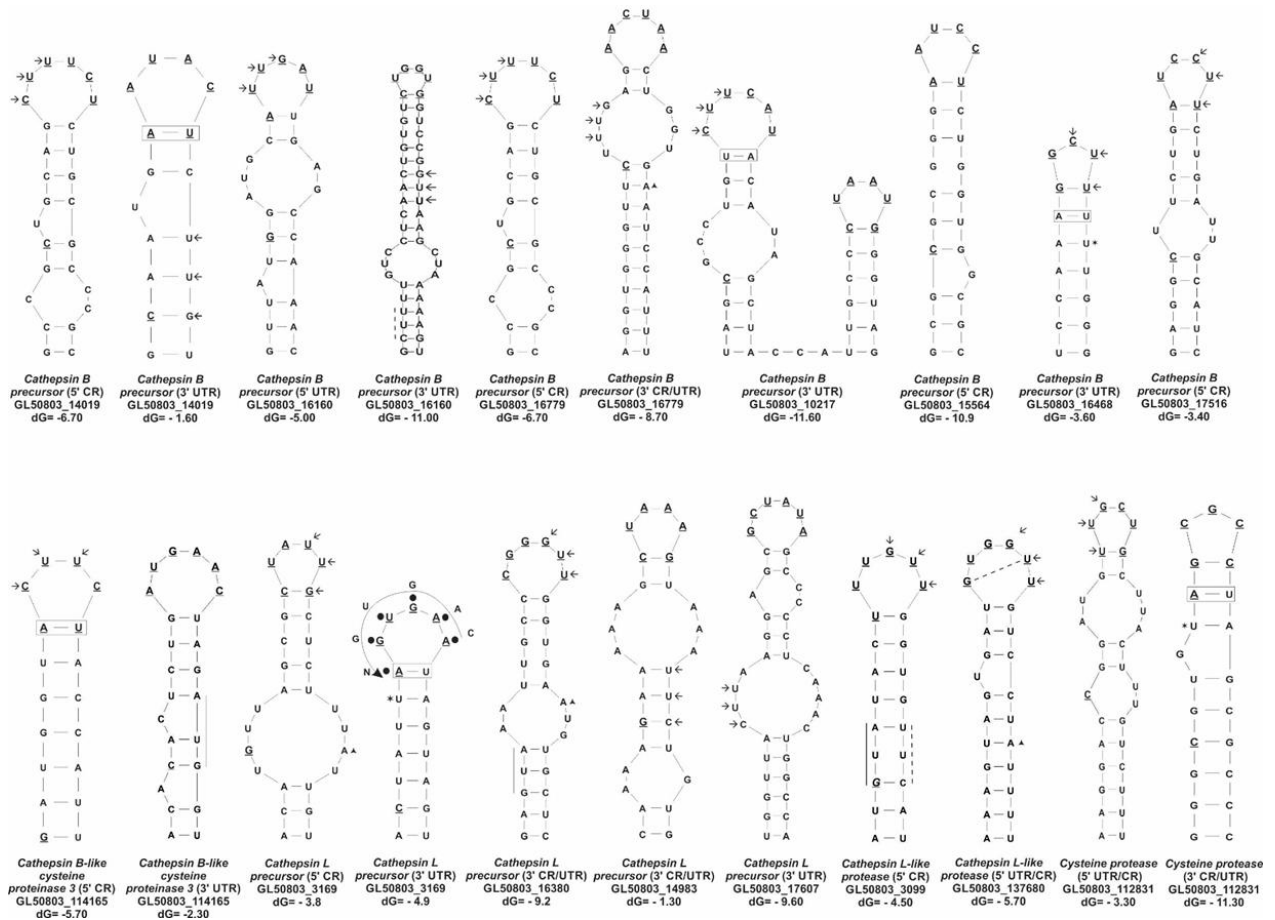


Figura 28. Predicción de estructuras tallo-burbuja en RNAm de *G. duodenalis* que codifican proteínas de virulencia. Los seis nucleótidos que forman el bucle apical de los IRE canónicos están subrayados. La línea de puntos en el bucle indica los residuos en la posición 1-5 que forman un pseudotripleo (G-C/C-G o G-U). Los nucleótidos U-A/A-U en rectángulo indican nucleótidos conservados en el tallo superior. Los círculos negros rellenos indican nucleótidos similares al motivo humano consenso CAGUGN y una flecha curva grande indica la orientación de la secuencia de 5' a 3' o de 3' a 5'. El motivo específico de protozoos GUU/UUG se indica con flechas pequeñas. Los cuadrados negros rellenos muestran residuos similares a los informados para la burbuja del IRE- *tcp4*. Asterisco: El residuo U conservado en IRE canónicos. Los pequeños triángulos muestran el residuo A conservado en un motivo específico de protozoos. El residuo C o G subrayado indica el residuo desapareado en la posición 8. dG, energía libre de Gibbs o entalpía libre; en este caso, una reducción de dG (dG negativa) es una condición necesaria para la espontaneidad de la formación de la estructura.

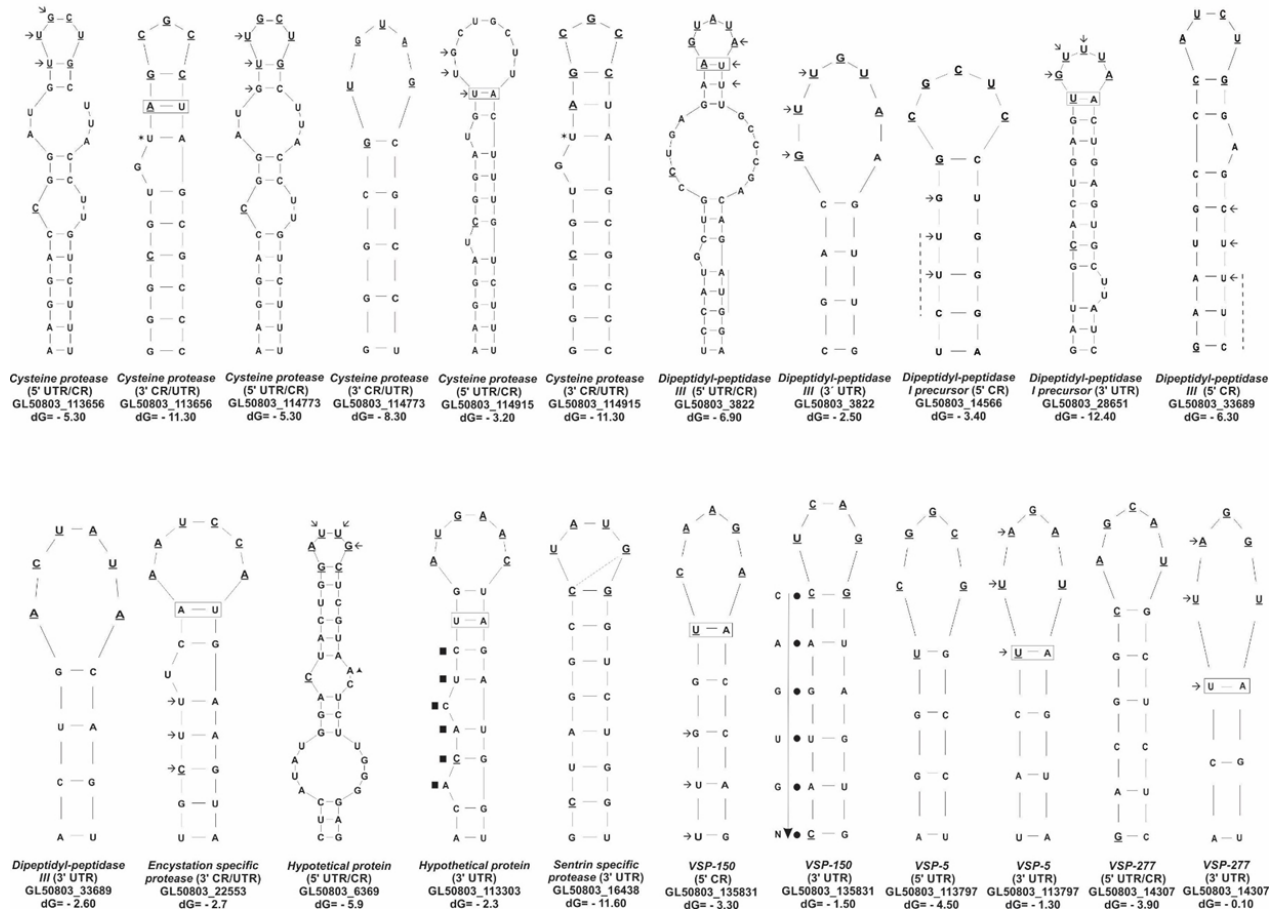


Figura 29. Predicción de estructuras tallo-burbuja en RNAm de *G. duodenalis* que codifican proteínas de virulencia. Los seis nucleótidos que forman el bucle apical de los IRE canónicos están subrayados. La línea de puntos en el bucle indica los residuos en la posición 1-5 que forman un pseudotriloop (G-C/C-G o G-U). Los nucleótidos U-A/A-U en rectángulo indican nucleótidos conservados en el tallo superior. Los círculos negros rellenos indican nucleótidos similares al motivo humano consenso CAGUGN y una flecha curva grande indica la orientación de la secuencia de 5' a 3' o de 3' a 5'. El motivo específico de protozoos GUU/UUG se indica con flechas pequeñas. Los cuadrados negros rellenos muestran residuos similares a los informados para la burbuja del IRE- *tvcp4*. Asterisco: El residuo U conservado en IRE canónicos. Los pequeños triángulos muestran el residuo A conservado en un motivo específico de protozoos. El residuo C o G subrayado indica el residuo desapareado en la posición 8. dG, energía libre de Gibbs o entalpía libre; en este caso, una reducción de dG (dG negativa) es una condición necesaria para la espontaneidad de la formación de la estructura.

Cuadro 10. Delimitación de secuencias de *G. duodenalis* que codifican a proteínas ribosomales

Nombre común	Gen ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Ribosomal protein L3</i>	GL50803_16525	5'UTR/CR	uuccgggucugaaaag[a]caaggcccgcgAUGuccaccgcaaguucucgugc ugccgcaagggcaaccucggcuaccu
<i>Ribosomal protein L4</i>	GL50803_17547	3'CR/UTR	cgcucgaucccagcggacggucaugcccaagUAAaucgcuggCGCAAAAcg uu[u]gcacaaugaggagccucgagga
<i>Ribosomal protein L7a</i>	GL50803_17244	5'UTR/CR	uggguuca[a]uaaaacagggccucgacAUGuccaagguuucuggcagcgacauu aagagggcccucgccguaccgagaa
<i>Ribosomal protein L7a</i>	GL50803_17244	3'CR/UTR	ggcguucgccgaggaugagggccagcagaugUAAaugccuuacauuucuuuA GUGCAUguccuu[u]gcugcuugguc
<i>Ribosomal protein L7Ae</i>	GL50803_2825	5'UTR/CR	uggaaauguaauaaauu[a]aaacucaaugaacaaggAUGccagaugcagcg gcuguuuccuuuggccucagaggccc
<i>Ribosomal protein L7Ae</i>	GL50803_2825	3'CR/UTR	acaagcuaaacauauuccuuacggagcuaggacacUGAuccggAGUAAAUgg ugg[u]gaagcaguguggccugcccauc
<i>Ribosomal protein L7Ae</i>	GL50803_11287	3'UTR	gcacugguauagacgggagugcguuuacagugcaagcaucacuaguaaaugcucac cgguacaugcuacacacuacuaguauuuggAGUGCAcuaua[u]acgaagg
<i>Ribosomal protein L9</i>	GL50803_17056	5'CR	aaucgcguuucgaugcucuuuu[u]uuagaggucgcgaagcaAUGccccucuguu ccuccaugacgaucaagguccecgac
<i>Ribosomal protein L10</i>	GL50803_10428	3'CR/UTR	ggaagggggcccucaacuugaagcucUGAucgggucccaagcacaAGUAAAU aaugccaggcauu[u]acuccucugcc
<i>Ribosomal protein L10a</i>	GL50803_1345	3'UTR	uucUAAgaucuucUGAGAGguucccgggguuu[u]gcau

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas ribosomales en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

Continuación

Nombre común	Gen ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Ribosomal protein L12</i>	GL50803_14938	5'CR	uuauaguuaaagcauuuu <u>aaunugau</u> [a] <u>uuu</u> augucagagugguaguuuuccaggc gacaAUGccccccagagcugauccuaacgcagagauaguucuguaauuugcgcg caagggcgagg
<i>Ribosomal protein L12</i>	GL50803_14938	3'CR/UTR	uugcugaggagcaagagacagagUAAacaaggugcccugcgugucacggauccggu ccuauucugcuugggacuguuuucgccuacgggggCUUAAAAuauu[u]cgaug gccgaggcgagg
<i>Ribosomal protein L13</i>	GL50803_14622	5'UTR/CR	uggaagcucgugcaauugc[a]cuuauuAUGgcaaguuaugcuuuuuuauau ugagauuuauuacuuuuuuuuuugaauu
<i>Ribosomal protein L13a</i>	GL50803_11247	5'UTR/CR	uuuuuuuggauuuagcgcaaauuc[u]guuugcucacggcgagccAUGucgcgaau cguaucgacugcaaggggcacauuc
<i>Ribosomal protein L15</i>	GL50803_8001	5'CR	ucauaggaucauu[u]uuuacccggccugaaauucgAUGggugccuacaaguacg uucaggagcucugggcgcaagaagcaa
<i>Ribosomal protein L15</i>	GL50803_8001	3'CR/UTR	aaccacaccgcuccucgcgcgcuaacagaUAGccuugcugcugcgAGUAAAC aucccgucuuu[u]acacuagaggaag
<i>Ribosomal protein L17</i>	GL50803_98056	3'UTR	gaaggcguccagUGAgucugucgggaguuuuuugcgcugcuucuuuccaacuuc uAAUAAUugaaugucuaauguggggguacauuccgauu[u]cgggccuucccg uuuuuucugcggaacu[u]uuucgaccucccgacAUGgcuaaucugaggcugcag
<i>Ribosomal protein L19</i>	GL50803_16431	5'UTR/CR	uuuuuucugcggaacu[u]uuucgaccucccgacAUGgcuaaucugaggcugcag aagcgccugggcgagacguccucaa
<i>Ribosomal protein L21</i>	GL50803_15520	5'CR	uuuuuuuuuacuuuu[u]caauugcugcccgaauagcgaggacgacucgAUGacgca cagccagggguacagguguuagac
<i>Ribosomal protein L21</i>	GL50803_15520	3'UTR	cgacauacccccacuaagauagacggaguuuucUAGgcuccgacgaaguuuug ggcugcgggggcgcuAGUGGAggcugggcu[u]ccaccgguuccucgacgcgcu

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas ribosomales en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

Continuación

Nombre común	Gen ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Ribosomal protein L23</i>	GL50803_10091	5'UTR/CR	acaacuuuaauuucgcuuuu[u]acucguuuccuaaugacggaucgaggagAUGg cgucgaagcgugggcagguccggagg
<i>Ribosomal protein L23</i>	GL50803_10091	3'CR/UTR	cgacggcugagugcguccacUAGgcAGUAAACgaa[u]uc
<i>Ribosomal protein L23A</i>	GL50803_7870	5'CR	aaauucgccgucua[a]uaucucgugccggcgagacAUGuccgagaaggcgagg cacugaaggcccaaaaggcgauuu
<i>Ribosomal protein L24</i>	GL50803_14869	5'UTR/CR	aguguuucucuaaccauuuaauacuuaa[a]uaauucaggaacaAUGccucgca uagagcauugcucuuucgucuccaa
<i>Ribosomal protein L26</i>	GL50803_15046	5'UTR/CR	aaauaaucgauuugaaauaggaaauuggcccauuuuuugaauacccggcgagccu ggaAUGaagcuaacuccgccgucaccggucggcgaaguccgcaaggcu uacuucaca
<i>Ribosomal protein L27a</i>	GL50803_16310	5'UTR/CR	accaaaaaaguauauuaauuuuauuuuacuuuuccccacggucu[a]aaaagggggcc ucgagAUGccgaccagaauacagg
<i>Ribosomal protein L31B</i>	GL50803_16368	5'UTR/CR	ucugaaauuguccugcaa[a]aaacgggguccuccgaagcgugAUGgguauugua uauagagcauacgaucggccuacaa
<i>Ribosomal protein L31B</i>	GL50803_16368	3'CR/UTR	gcagcgaagacggcagcgagUAAacuugugcagcucgcacuuuacauaugcuuu uuugcCGUAAGUggg[u]cguccug
<i>Ribosomal protein L34</i>	GL50803_36069	5'UTR/CR	uuuuaauuac[u]aaagagcugcccgcccgagAUGgccgacugucgcgucacuu gccguuccacuccacauacaggacu
<i>Ribosomal protein L34</i>	GL50803_36069	3'CR/UTR	agcuaagacggccaagcagaccgccggcaaggggcaugcggaagUAAaucgaucag cauuuacgucucacuucgggcucuuuccgaacccgccugggacuucagggggaacu ucggcuucuggggcuUUGAAGcugcuu[u]ccccggggcgccugccuugau

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas ribosomales en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

Nombre común	Gen ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Ribosomal protein L35</i>	GL50803_6133	5'CR	ucucgcacaccgaagag[u]caacuugccAUGgcauccuguuugccccuaccaga uagauguuauucaaugauuuuuuuuu
<i>Ribosomal protein L35</i>	GL50803_6133	3'CR/UTR	cuccaguucccgaagcugaagauugcu <u>guaaaggucUG</u> Agcaccuccgguguuag <u>uaaaauac</u> ucuciuugcuuccuuucaccgcguagaacauagcagaugcggagugcgua uggcgcacgu <u>GUGAAA</u> cucgccagguuu[u]gcaaggguagcgagguggagc
<i>Ribosomal protein L35a</i>	GL50803_5947	3'CR/UTR	gagcgcuguagcgggaaccccaac <u>cgcgacgguaaccuacgaguaaaauagucagggc</u> ggcuuguggc <u>GUGAUG</u> cugggggucucgccucggugguu[u]acugcuuugc
<i>Ribosomal protein L36-1</i>	GL50803_16114	5'CR	uuuuuuuccaauccauuuuuuuuuuucauuucaaauuccg <u>auuu</u> [a]gaaggagcggg gugguAUGccaggcaaaguuucaaaccugaagaaggggcggcaguguuucgca uuguccgca
<i>Ribosomal protein L37</i>	GL50803_14171	5'CR	ccuccaugccggacauagcauuuuuuuuuuggaauuagucgcuguu[a]aaaacggga acucgAUGuccaagggcacagcguucguuacgguaagcgccacacgcgc <u>cauucacg</u> gcagcugcc
<i>Ribosomal protein L37</i>	GL50803_14171	3'CR/UTR	gcaaacgccaggaaguaccuugccaagUAAuuuugcagcaggucgguccgAUG <u>GAUG</u> ccuacacgc[c]ggugcgucgcg
<i>Ribosomal protein L37a</i>	GL50803_5517	5'CR	ucuggaaauuuauuuuuuu[u]aaaauugaauucuuugcaagcgaaaagcggcucaggc gagcuAUGccaagaggacuuuuuagguuggucacccgggaaguacggcacuc gcuauggga
<i>Ribosomal protein L37a</i>	GL50803_5517	3'CR/UTR	cacgauccgccgcc <u>uccgcucugggcccgugaagacgcacagUAA</u> Aguaaacagag <u>ugga</u> accuggcacucgcggu <u>UUGCAA</u> cugucugcauagcucguu[u]acucgucc
<i>Ribosomal protein L44</i>	GL50803_9810	5'UTR/CR	aaaugcaauuugaauuagcuuugcaugcuacu[u]aacagcagcggccgaaggacA UGgugacauauccggcagagcgca
<i>Ribosomal protein SA</i>	GL50803_7766	3'UTR	cucuucgacgaguacUAAggcgggcucuuguuu <u>agcugaaaguguaaacgcuuug</u> <u>cuc</u> gguaugcaucccucguuucaccagagagguuucacaacuccaggacgguuccuu cugcgauuccgaggauuuCGUAAAgucuggcuauca[u]ggcacuacaagugu

Continuación

Nombre común	Gen ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Ribosomal protein S2</i>	GL50803_8118	5'CR	uaauuuugauuuugacuuguagcccaaac[u]aacguccauggcguagc AUGca ggcugaaagugcucccaggcc cagaa
<i>Ribosomal protein S4</i>	GL50803_11359	5'CR	ggau <u>ggua</u> uuc[u]gguuuagcagcgaAUG gccc guggagucc gca agcaccuua agcgc <u>cu</u> caacgcaccgaagcacug
<i>Ribosomal protein S5</i>	GL50803_12981	3'UTR	uauagccguuuccaaccgcUAAacgccc aggaguaaaccgccccu cugagagau ggugucaguccucaaa AAUCAU auuuggaugaguugcgguu[u]cuccuugcug
<i>Ribosomal protein S6</i>	GL50803_14620	5'UTR/CR	uggugagaaagcauuuuauuucuuuaguuuc[a]ua aaauggccccgggguga AUGccaaagggcua uucgcaag
<i>Ribosomal protein S6</i>	GL50803_14620	3'CR/UTR	aagccugcu aaggagcgg uugagUAAacagacgucuuuacgcgggc CUG AAUC guuucgu[u]gcagcguugccuua
<i>Ribosomal protein S8</i>	GL50803_5845	3'CR/UTR	ggaccugagcuucucuucacagaaga aguuggcaccuaagUAA acaucc AG UGCUU cgugguc[u]ccccacucuucg
<i>Ribosomal protein S9</i>	GL50803_4547	5'UTR/CR	uaauuu aaauucaauu uggcuuucgccaau[u]cuccccugacgauucc AUGccc cgcauuagccgccauagga acucgu
<i>Ribosomal protein S10B</i>	GL50803_10919	3'CR/UTR	aag caaagUAA aucugagcccauagcuuccacgcacagaugauccccagcggaau guugg AGUAAA Ucaagucc[u]gg
<i>Ribosomal protein S11</i>	GL50803_14827	5'UTR/CR	cuugagagagccgagacucugcgcaaggcugc[u]uacgagAUG gcugagaacca gcacgagc gagcguaucacaagcaa
<i>Ribosomal protein S11</i>	GL50803_14827	3'CR/UTR	gagccugucag cgaggccgcc aagaagcgc <u>uucgc</u> cccuucUAG gcagcacuA GUAAA Uaaggg[u]cauucacaaggc

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas ribosomales en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

Continuación

Nombre común	Gen ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Ribosomal protein S12</i>	GL50803_33862	3' CR	gggacgucgacagcuuccu <u>uacuaagcuggacgagcag</u> UAAacgacauacuu <u>AGUCGUG</u> cggca[u]cgguagugggauu
<i>Ribosomal protein S13</i>	GL50803_16652	5' UTR/CR	<u>auagcauuu</u> [u]agcgggcacgugacaaagccAUGggccgcaugcacucgaagguaagggua <u>uaucccgucuc</u> gccau
<i>Ribosomal protein S13</i>	GL50803_16652	3' CR/UTR	guccgaccaggccgccgcuccuu <u>gcgacguacgcgUG</u> Aguaa <u>acacgcgc</u> cuacggggcucgaacccgcgaccguugg <u>AUUAAA</u> aguccaacgcuc[u]accaacugaguuuugaaugacuuagaaggacaaa[u]uugaggugggcugaAUGucucgcaa
<i>Ribosomal protein S14</i>	GL50803_7878	5' CR	aguaaccuacgcgcgggagaau <u>cuuc</u>
<i>Ribosomal protein S15</i>	GL50803_15260	3' CR/UTR	ccgcugcguUAGucccgcacc <u>AGUAAA</u> Cauucc[u]cg
<i>Ribosomal protein S15A</i>	GL50803_15228	5' UTR/CR	cgcacaucgcgugccggcgugcugggaagcaga[u]ccaguaggcAUGguucgcauacguucuccgugacgcacuaa
<i>Ribosomal protein S16</i>	GL50803_4652	5' CR	uuuauuccacuuccgguccca[u]aaaaagcggcuccccgAUGgcgaagggaacagaagagacuacuggaaaggaac
<i>Ribosomal protein S16</i>	GL50803_4652	3' CR/UTR	uuugguggccguggugcucgugcccgcgucgccaagucguaccguUAAGcgggcuucguccuaaguaa <u>acauac</u> ugcauccaauucacacgcugcaucucaccacugaccugggccuccugggccguuguuguaguaggaggcuugggugucguagccauaugacugccguacc <u>cauuuuGUGAUC</u> accauaagcgcugcu[u]ccauaguccugccuaaaaugaauucu[u]uaaguacgaaaacgcggccaccgaggcuAUGgcagagagcugucgacuggaggcgugaauuu

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas ribosomales en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

Continuación

Nombre común	Gen ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Ribosomal protein S21</i>	GL50803_7082	5'CR	uaaaaugauuuu <u>uguccuacaa</u> [a] <u>uuggacccgaaacgacugagcc</u> AUG <u>caauc</u> ggaugacaucggg gaugaagaacagc
<i>Ribosomal protein S21</i>	GL50803_7082	3'CR/UTR	cggucucauggaac <u>gccuuUAGguugccgc</u> auacacc ggccaaguaaacgc ucu gauacuugcuguaauuccugcguugauuuacacagccuucggguucagagcgagcacc uggcugcuagguc <u>GUAAAC</u> ggccuccaugacagcaucguuu[u]ggggaacc cgugcgcguUA <u>Agcacggg</u> cguguaaacug ccacuggc ugugcauuuu <u>AGUU</u> <u>UA</u> cucuucuagcgcu[u]gagccacacuccauacagaauuucgcugugucugaa
<i>Ribosomal protein S23</i>	GL50803_14699	3'UTR	uuuuuuuucugaaauuucguuguc[a]uuuagcggggcuagcgAUG ccc gagauc acaguuaaggugaggaagg uccuca
<i>Ribosomal protein S24</i>	GL50803_10367	5'CR	gcgaggaaggcgcgccacggcacgccccg[g]gccccaggaAUG gcg cagugc cacug gacaccggcg uag cggcg uaccgc
<i>Ribosomal protein S29a</i>	GL50803_39483	5'UTR/CR	auauccaagacaaa[u]aaggagcgucacccgagcucguucguAUGcagag ucaa gaaaccgcg uguguuu uggccg cua
<i>Ribosomal protein P1B</i>	GL50803_17337	5'CR	agucuuccgacUGAgucugcaugcacaaggacgagggcuuuacuguaaagg AGU GAA caccgauuu[u]auuguuacgcu

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas ribosomales en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

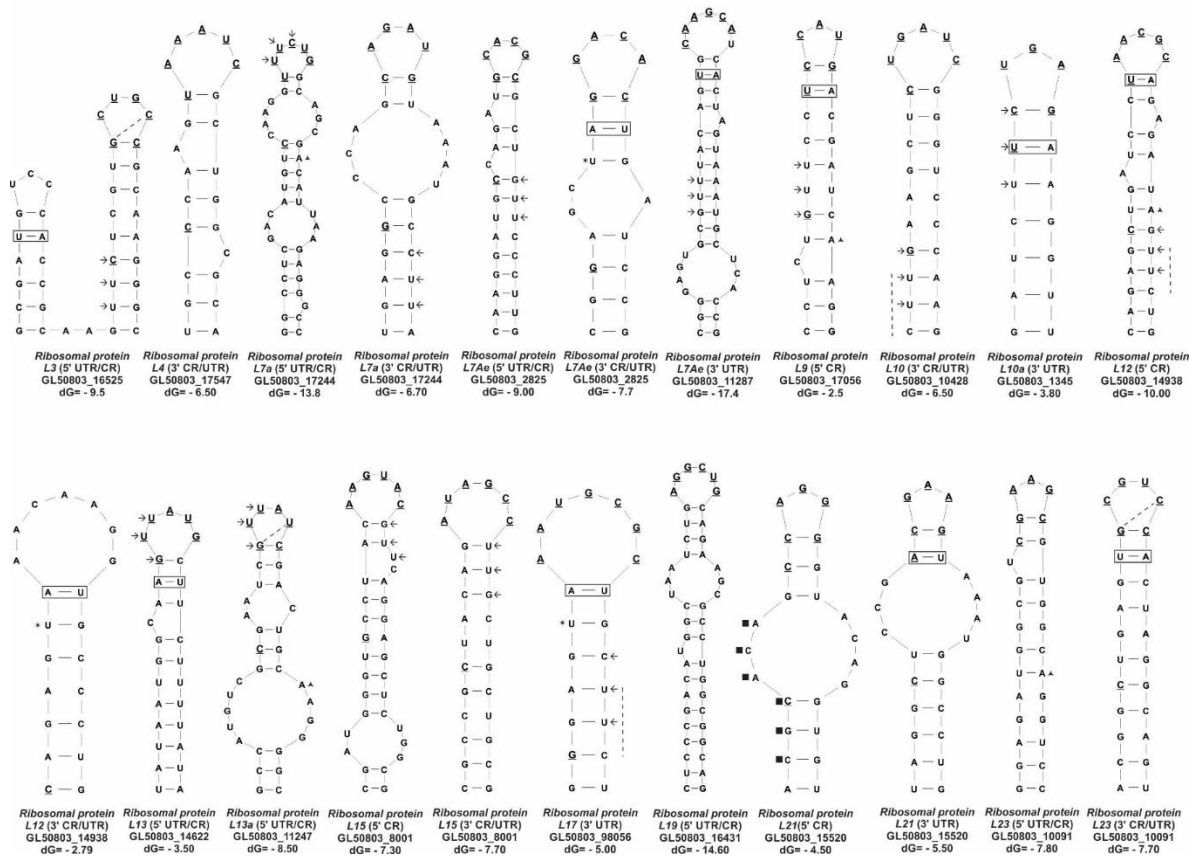


Figura 30. Predicción de estructuras tallo-burbuja en RNAm de *G. duodenalis* que codifican proteínas ribosomales. Los seis nucleótidos que forman el bucle apical de los IRE canónicos están subrayados. La línea de puntos en el bucle indica los residuos en la posición 1-5 que forman un pseudotripleo (G-C/C-G o G-U). Los nucleótidos U-A/A-U en rectángulo indican nucleótidos conservados en el tallo superior. Los círculos negros rellenos indican nucleótidos similares al motivo humano consenso CAGUGN y una flecha curva grande indica la orientación de la secuencia de 5' a 3' o de 3' a 5'. El motivo específico de protozoos GUU/UUG se indica con flechas pequeñas. Los cuadrados negros rellenos muestran residuos similares a los informados para la burbuja del IRE- *tvcp4*. Asterisco: El residuo U conservado en IRE canónicos. Los pequeños triángulos muestran el residuo A conservado en un motivo específico de protozoos. El residuo C o G subrayado indica el residuo desapareado en la posición 8. dG, energía libre de Gibbs o entalpía libre; en este caso, una reducción de dG (dG negativa) es una condición necesaria para la espontaneidad de la formación de la estructura.

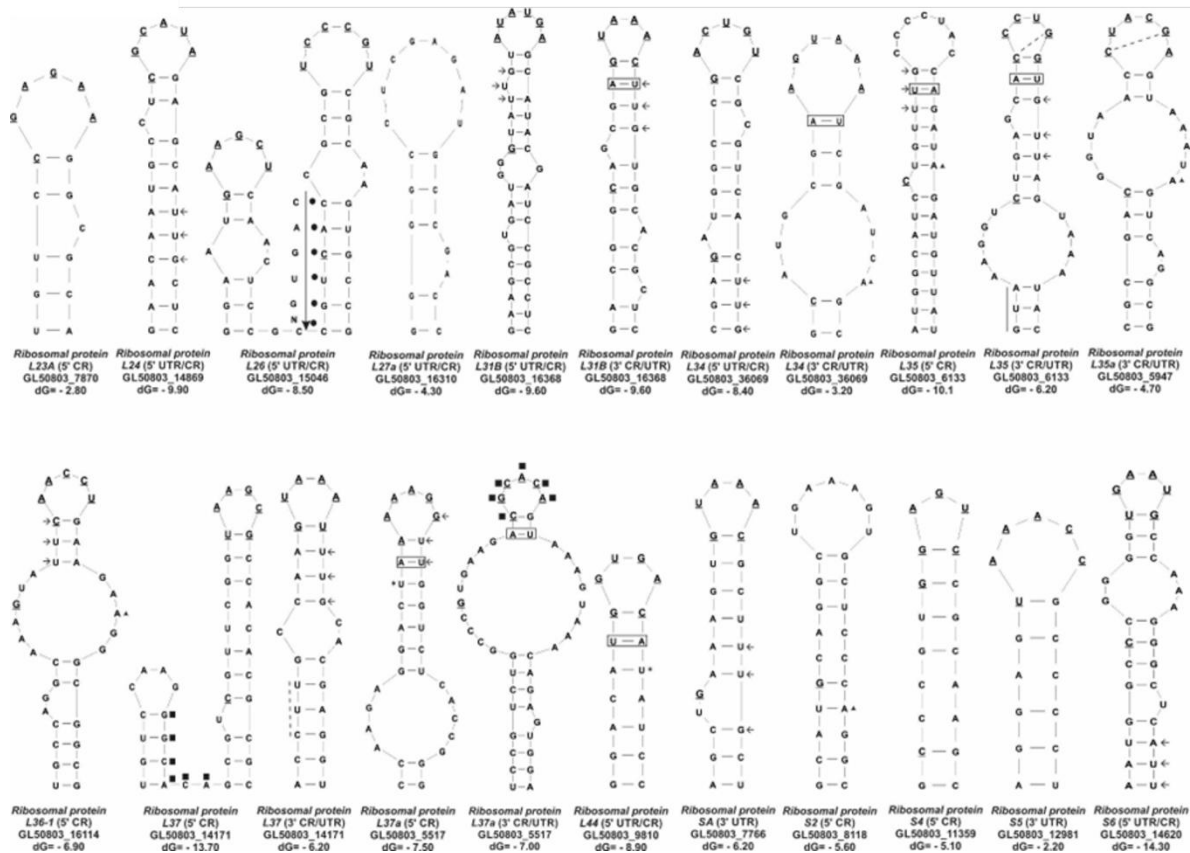


Figura 31. Predicción de estructuras tallo-burbuja en RNAm de *G. duodenalis* que codifican proteínas ribosomales. Los seis nucleótidos que forman el bucle apical de los IRE canónicos están subrayados. La línea de puntos en el bucle indica los residuos en la posición 1-5 que forman un pseudotripleo (G-C/C-G o G-U). Los nucleótidos U-A/A-U en rectángulo indican nucleótidos conservados en el tallo superior. Los círculos negros rellenos indican nucleótidos similares al motivo humano consenso CAGUGN y una flecha curva grande indica la orientación de la secuencia de 5' a 3' o de 3' a 5'. El motivo específico de protozoos GUU/UUG se indica con flechas pequeñas. Los cuadrados negros rellenos muestran residuos similares a los informados para la burbuja del IRE- *tvcp4*. Asterisco: El residuo U conservado en IRE canónicos. Los pequeños triángulos muestran el residuo A conservado en un motivo específico de protozoos. El residuo C o G subrayado indica el residuo desapareado en la posición 8. dG, energía libre de Gibbs o entalpía libre; en este caso, una reducción de dG (dG negativa) es una condición necesaria para la espontaneidad de la formación de la estructura.

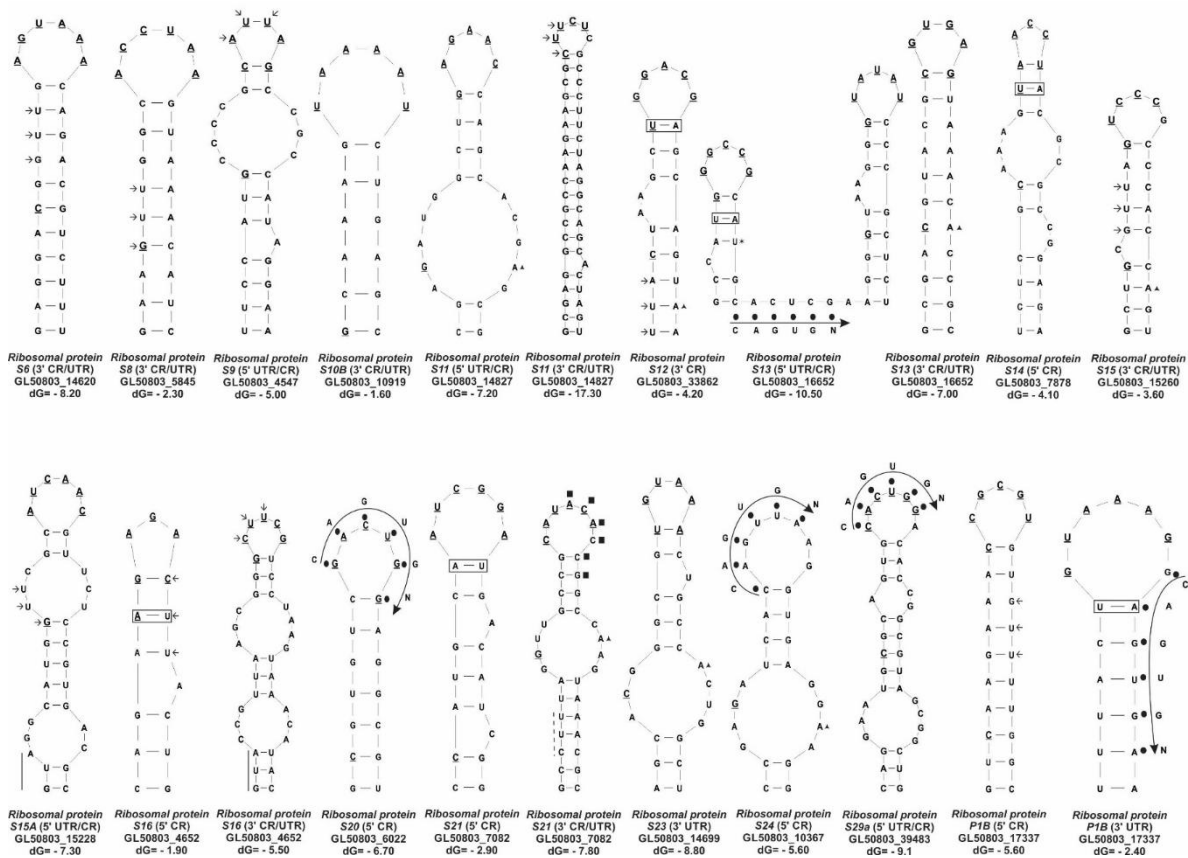


Figura 32. Predicción de estructuras tallo-burbuja en RNAm de *G. duodenalis* que codifican proteínas ribosomales. Los seis nucleótidos que forman el bucle apical de los IRE canónicos están subrayados. La línea de puntos en el bucle indica los residuos en la posición 1-5 que forman un pseudotripleo (G-C/C-G o G-U). Los nucleótidos U-A/A-U en rectángulo indican nucleótidos conservados en el tallo superior. Los círculos negros rellenos indican nucleótidos similares al motivo humano consenso CAGUGN y una flecha curva grande indica la orientación de la secuencia de 5' a 3' o de 3' a 5'. El motivo específico de protozoos GUU/UUG se indica con flechas pequeñas. Los cuadrados negros rellenos muestran residuos similares a los informados para la burbuja del IRE- *tvcp4*. Asterisco: El residuo U conservado en IRE canónicos. Los pequeños triángulos muestran el residuo A conservado en un motivo específico de protozoos. El residuo C o G subrayado indica el residuo desapareado en la posición 8. dG, energía libre de Gibbs o entalpía libre; en este caso, una reducción de dG (dG negativa) es una condición necesaria para la espontaneidad de la formación de la estructura.

Cuadro 11. Delimitación de secuencias de *G. duodenalis* que codifican a proteínas del citoesqueleto

Nombre común	Gen ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Actin-related protein</i>	GL50803_8726	3'CR/UTR	ccgaaaccaguugccuu ugagguuUGAaaggccucgugucu <u> AUGGUAAUa</u> uacuaau[u]ccgaugaauaaaucgcu
<i>Actin-related protein</i>	GL50803_16172	3'CR/UTR	ugaaaucuu aaugaaagugauaaugUGAcacucuuacaaaagacucuuaga gcggaucaucguugcccucauacuugucuc <u>UGUAAGC</u> gauccugccuuu[u]acagcacuu
<i>Actin-related protein</i>	GL50803_11039	3'CR/UTR	gaaaaggcaacaa agUAAGuacauaagagu <u>aaaauaacu</u> aucuaucuaaaagaua uauaguguggggugcauguuuuu aaAGUGAA uccaacagaaccaa augcgggac cuuguauacauauaagccuauaaaaua uggaaucuuuu [u]aguuuaua
<i>Hypothetical protein</i>	GL50803_17591	3'UTR	cuggacuggaacacaac UGAuuaaaaggauuAGAAUA accguggaagau[u]cugcuugcuauuuuu uggcuuugcu

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas del citoesqueleto en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

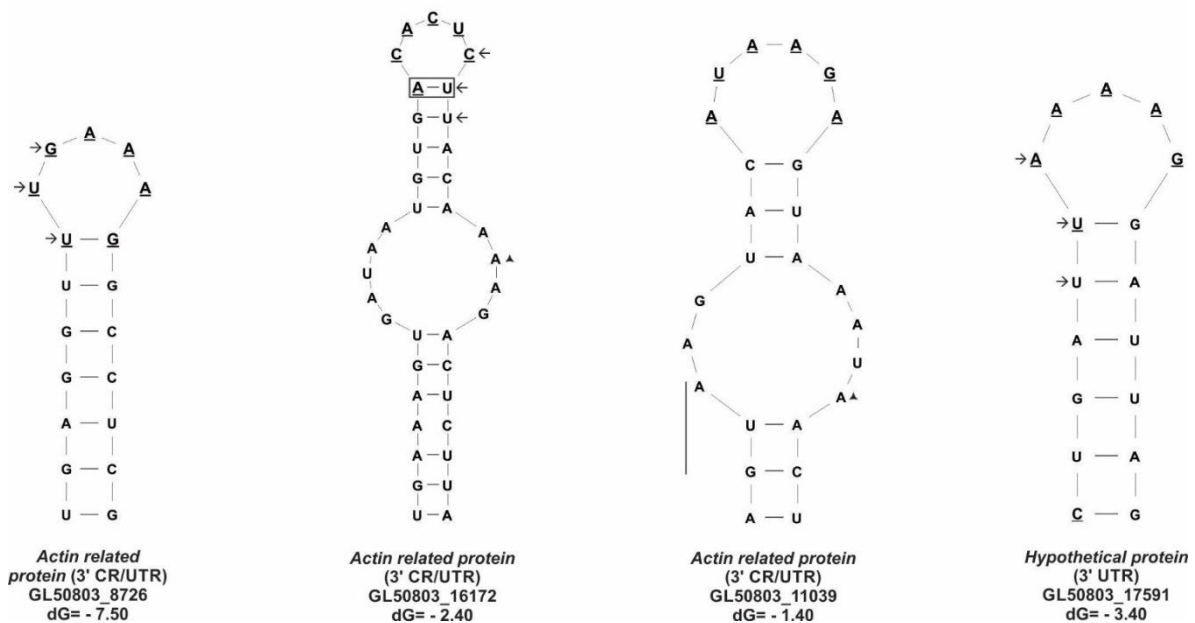


Figura 33. Predicción de estructuras tallo-burbuja en RNAm de *G. duodenalis* que codifican proteínas del citoesqueleto. Los seis nucleótidos que forman el bucle apical de los IRE canónicos están subrayados. La línea de puntos en el bucle indica los residuos en la posición 1-5 que forman un pseudotripleo (G-C/C-G o G-U). Los nucleótidos U-A/A-U en rectángulo indican nucleótidos conservados en el tallo superior. Los círculos negros rellenos indican nucleótidos similares al motivo humano consenso CAGUGN y una flecha curva grande indica la orientación de la secuencia de 5' a 3' o de 3' a 5'. El motivo específico de protozoos GUU/UUG se indica con flechas pequeñas. Los cuadrados negros rellenos muestran residuos similares a los informados para la burbuja del IRE- *tvc4*. Asterisco: El residuo U conservado en IRE canónicos. Los pequeños triángulos muestran el residuo A conservado en un motivo específico de protozoos. El residuo C o G subrayado indica el residuo desapareado en la posición 8. dG, energía libre de Gibbs o entalpía libre; en este caso, una reducción de dG (dG negativa) es una condición necesaria para la espontaneidad de la formación de la estructura.

Cuadro 12. Delimitación de secuencias de *G. duodenalis* que codifican a proteínas del metabolismo

Nombre común	Gen ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Glucosamine-6-phosphate deaminase</i>	GL50803_8245	5'CR	ccuegcacaaa[u]aaaaAUGccguccauccacgucuccaaa augcgcuga uccagccauaaagcuugcccaccguauc
<i>Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase</i>	GL50803_17063	5'CR	cgaagugaaaauacaacauuuugccccaauaa[a]uuuaAUGucugugg uccacgcgccuauagacggcugucacgcg
<i>Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase</i>	GL50803_17063	3'CR	cuacaagaaguacagcgaaugcaggcg accgccaaggcggag UAAgc AG UGAA cuuuc[u]uucaugucugggcgg
<i>Thioredoxin reductase</i>	GL50803_9827	5'CR	acgagcauu[u]uuuaAUGuccacucagcgccacgucaggauccggaucau cggcggaggccugcaggccucacugc
<i>Thioredoxin reductase</i>	GL50803_9827	3'CR/UTR	aaggcggcacucgacgccgagcgcug gcuugccaugcaggagUAAGUA AA uggcagcggggccug[u]ggcuccaguucagccgaaaggauagcuggggg aggggaugu

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas del metabolismo en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

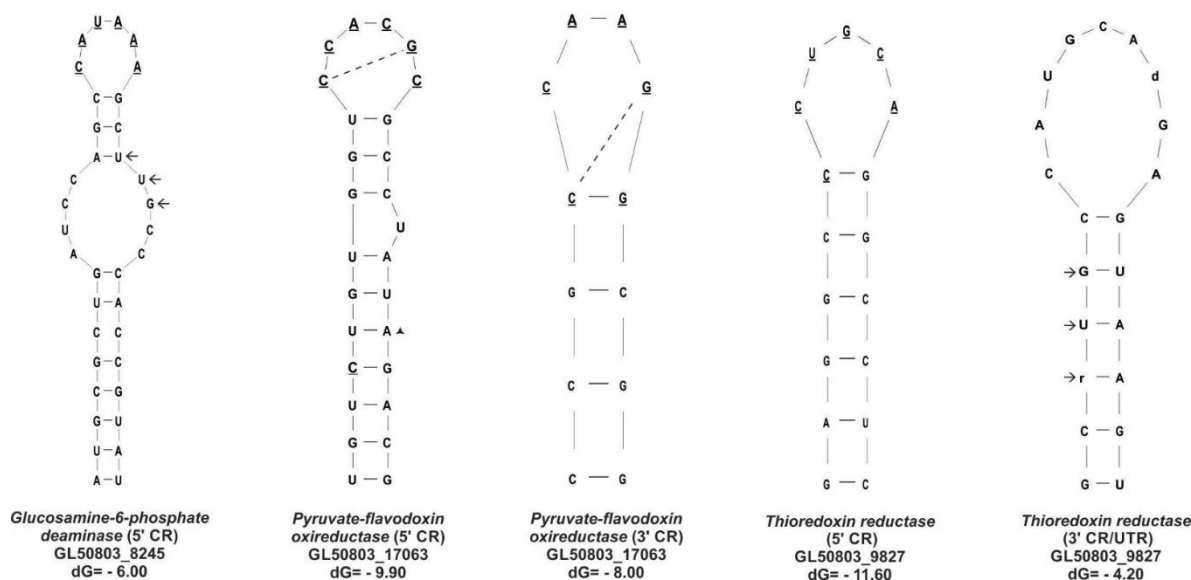


Figura 34. Predicción de estructuras tallo-burbuja en RNAm de *G. duodenalis* que codifican proteínas del metabolismo. Los seis nucleótidos que forman el bucle apical de los IRE canónicos están subrayados. La línea de puntos en el bucle indica los residuos en la posición 1-5 que forman un pseudotri-loop (G-C/C-G o G-U). Los nucleótidos U-A/A-U en rectángulo indican nucleótidos conservados en el tallo superior. Los círculos negros rellenos indican nucleótidos similares al motivo humano consenso CAGUGN y una flecha curva grande indica la orientación de la secuencia de 5' a 3' o de 3' a 5'. El motivo específico de protozoos GUU/UUG se indica con flechas pequeñas. Los cuadrados negros rellenos muestran residuos similares a los informados para la burbuja del IRE- *tvcp4*. Asterisco: El residuo U conservado en IRE canónicos. Los pequeños triángulos muestran el residuo A conservado en un motivo específico de protozoos. El residuo C o G subrayado indica el residuo desapareado en la posición 8. dG, energía libre de Gibbs o entalpía libre; en este caso, una reducción de dG (dG negativa) es una condición necesaria para la espontaneidad de la formación de la estructura.

Es posible que *G. duodenalis* contenga diferentes tipos de estructuras similares al IRE en los primordios que evolucionaron hasta alcanzar la secuencia canónica reportada para los metazoos. Además, se realizó un análisis en el servidor web SIREs, aunque no todas las estructuras tallo-burbuja analizadas por zucker mostraron la formación de IREs en el servidor web SIREs, algunos de ellos (Cuadro 13), como *Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase* GL50803_114609 (Figura 35), *Cathepsin L precursor* GL50803_3169 (Figura 36), *Cathepsin L-like protease* GL50803_3099 (Figura 37), *Hypothetical protein* GL50803_113303 (Figura 38), *Ribosomal protein L7a* GL50803_17244 (Figura 39), *Ribosomal protein L12* GL50803_14938 (Figura 40), y *Actin-related protein* GL50803_8726 (Figura 41) mostraron la formación IREs típicos de metazoos. Por lo tanto, es posible que una proteína de unión al RNA o tipo IRP de *Giardia* reconozca la secuencia en la estructura de bucle o tallo. Los datos en este trabajo muestran evidencia *in silico* de elementos cis tales como estructuras similares a IRE en *G. duodenalis*, que están presentes en los RNAm que codifican varios grupos de proteínas, incluidos aquellos involucrados en la virulencia. Como se mencionó anteriormente, nuestros resultados muestran que los cuatro genes están regulados negativamente por hierro, además, pueden formar estructuras tipo IRE. El gen de *Actina* (GL50803_40817) formó en el extremo 3' una estructura que posee en la burbuja una secuencia atípica al consenso de humano (Henderson y col, 1996), así como los residuos U-A conservados en el tallo superior (Volz, 2008). Por otro lado, *Glucosamina 6 fosfato desaminasa* (GL50803_10829) en el extremo 3' presentó una estructura tipo IRE, con un motivo AUU en la burbuja similar al motivo GUU que es específico para parásitos protozoarios (Torres-Romero y Arroyo, 2009). Además, en el extremo 3' del gen de *Citocromo b5* (GL50803_9089) se encontró una estructura tallo-burbuja con un nucleótido no apareado en el tallo, así como el motivo AUU en la burbuja similar al motivo GUU que es específico para parásitos protozoarios (Torres-Romero y Arroyo, 2009) Finalmente, en el gen de *Subtilisina* (GL50803_114625) se formó una estructura tallo-burbuja en la región 3' no codificante, donde se encontró en el tallo un motivo similar al GGCACA reportado en la *tvcp-4* (Solano-González y col, 2007). Por lo tanto, debido a la presencia de una estructura similar al IRE en el extremo

3'UTR del RNAm y la regulación negativa observada por hierro, estos genes podrían ser regulados a nivel postranscripcional por el sistema IRE / IRP (Figura 42), así como el receptor de transferrina que contiene cinco estructuras IRE en la región 3'-UTR y en condiciones de bajo hierro, la proteína similar a IRP se puede unir a las estructuras tallo-burbuja, dando estabilidad al RNAm y llevando a cabo su traducción (Pantapoulos, 2004). Probablemente, el hecho de que *G. duodenalis* regule varios genes de acuerdo con las condiciones del hierro representa un mecanismo regulador tipo IRE / IRP primitivo, en sus primeras etapas de evolución.

Cuadro 13. Estructuras IRE-like predichas por el servidor web SIRES de algunos RNAm de *G. duodenalis*

Nombre común	Gen ID	Secuencia del IRE
<i>Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase</i>	GL50803_114609	TGCCTGCCACGCGCAGAGCTACGTGAGCAAG
<i>Cathepsin L precursor</i>	GL50803_3169	GAAAGGTTCGCAACCAGGGGGTCTGCGGGTGCT
<i>Cathepsin L-like protease</i>	GL50803_3099	GTAATTCCCACTGTAGAATTGGAGGAAAAC
<i>Hypothetical protein</i>	GL50803_113303	CCTTCCCCCTTGCGGGAGGGTGACGACCAGA
<i>Ribosomal protein L7a</i>	GL50803_17244	TCTTATGCGCGAGGAGCCGTCCGCTGACCGC
<i>Ribosomal protein L12</i>	GL50803_14938	GGTCTTCCGCCCAAAGTTGTTGGTGAGAAGA
<i>Actin-related protein</i>	GL50803_8726	AGCAGAGCCAGGTGGGAGCATCTAGCATGCCG

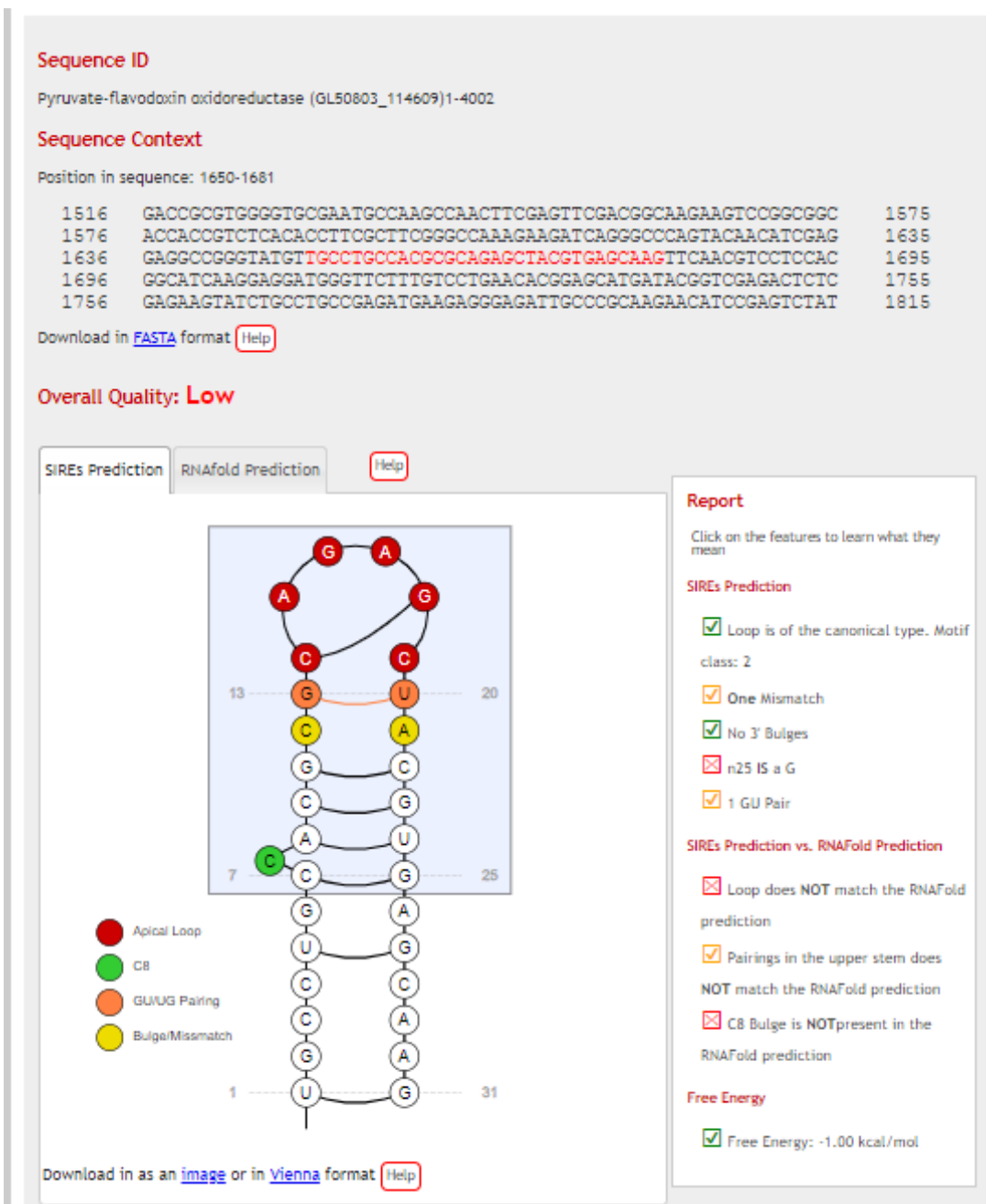


Figura 35. Análisis en SIREs de la secuencia *Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase* (GL50803_114609) de *G. duodenalis*. El servidor web SIREs formó una estructura tallo burbuja en la secuencia GL50803_114609 del nucleótido 1649 al1680, el extremo 5' es el más estable (Campillos y col., 2010).

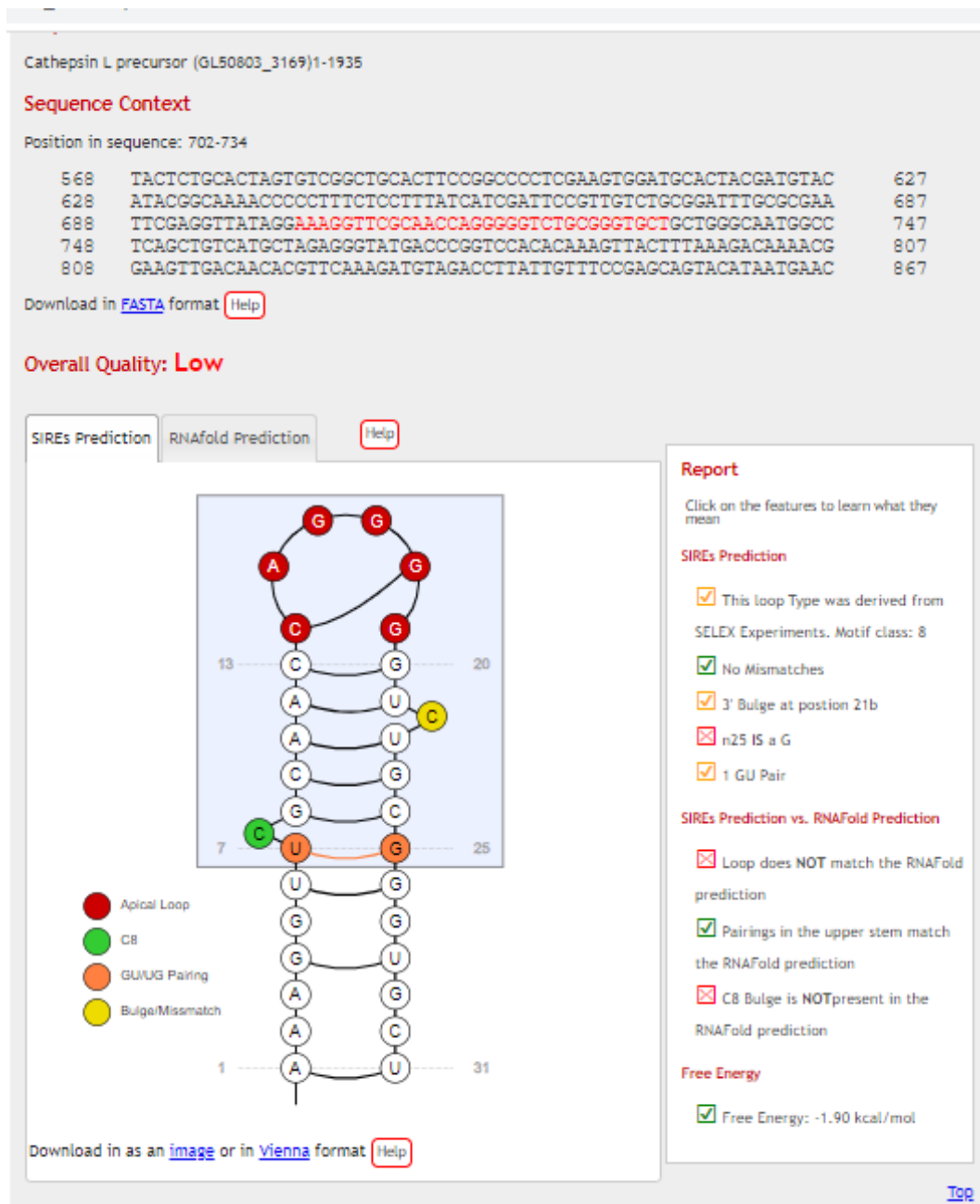


Figura 36. Análisis en SIREs de la secuencia *Cathepsin L precursor* (GL50803_3169) de *G. duodenalis*. El servidor web SIREs formó una estructura tallo burbuja en la secuencia GL50803_3169 del nucleótido 700 al 733, el extremo 3' es el más estable (Campillos y col., 2010).

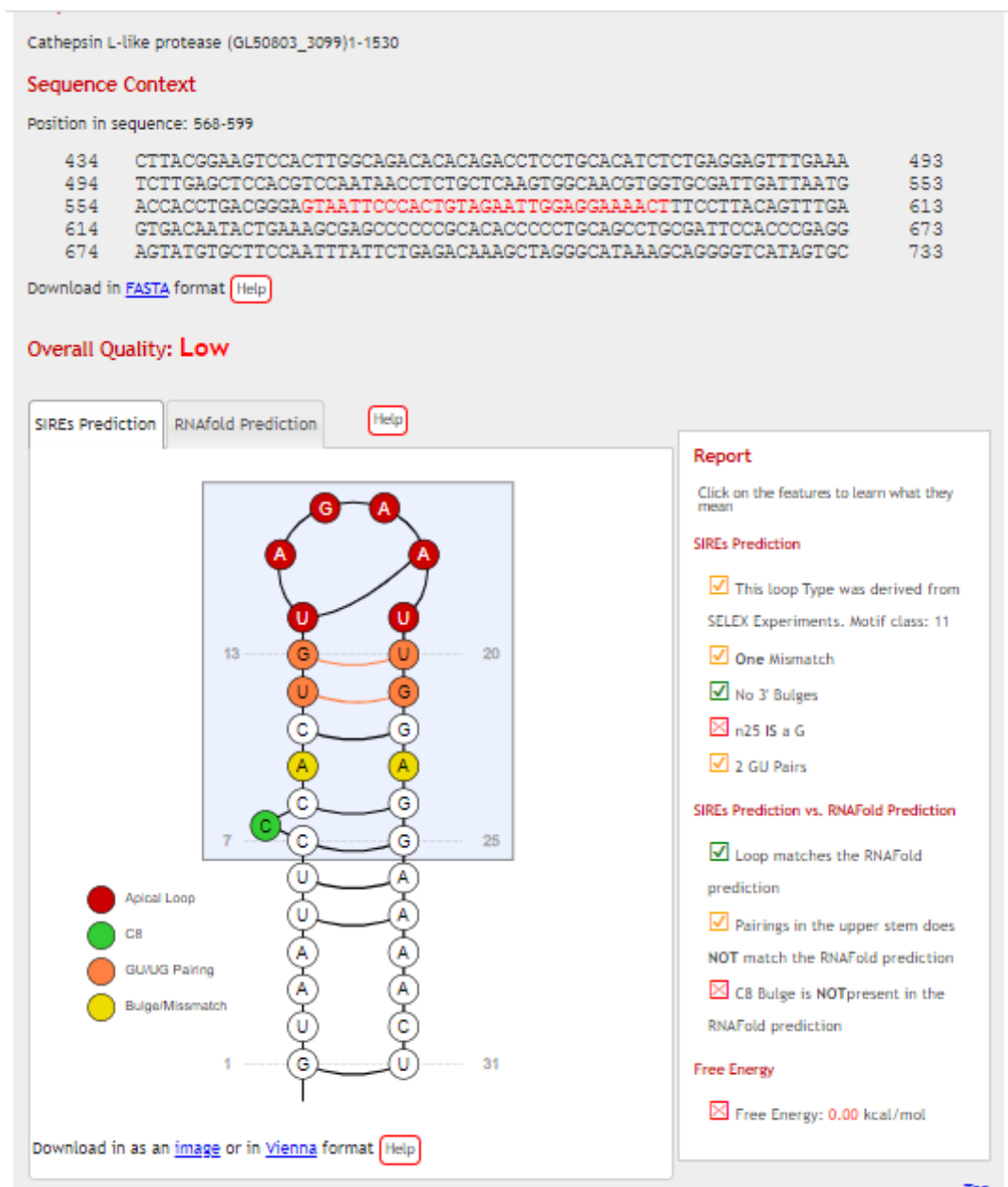


Figura 37. Análisis en SIREs de la secuencia de *Cathepsin L-like protease* (GL50803_3099) de *G. duodenalis*. El servidor web SIREs formó una estructura tallo burbuja en la secuencia GL50803_3099 del nucleótido 567 al 598, el extremo 5' es el más estable (Campillos y col., 2010).

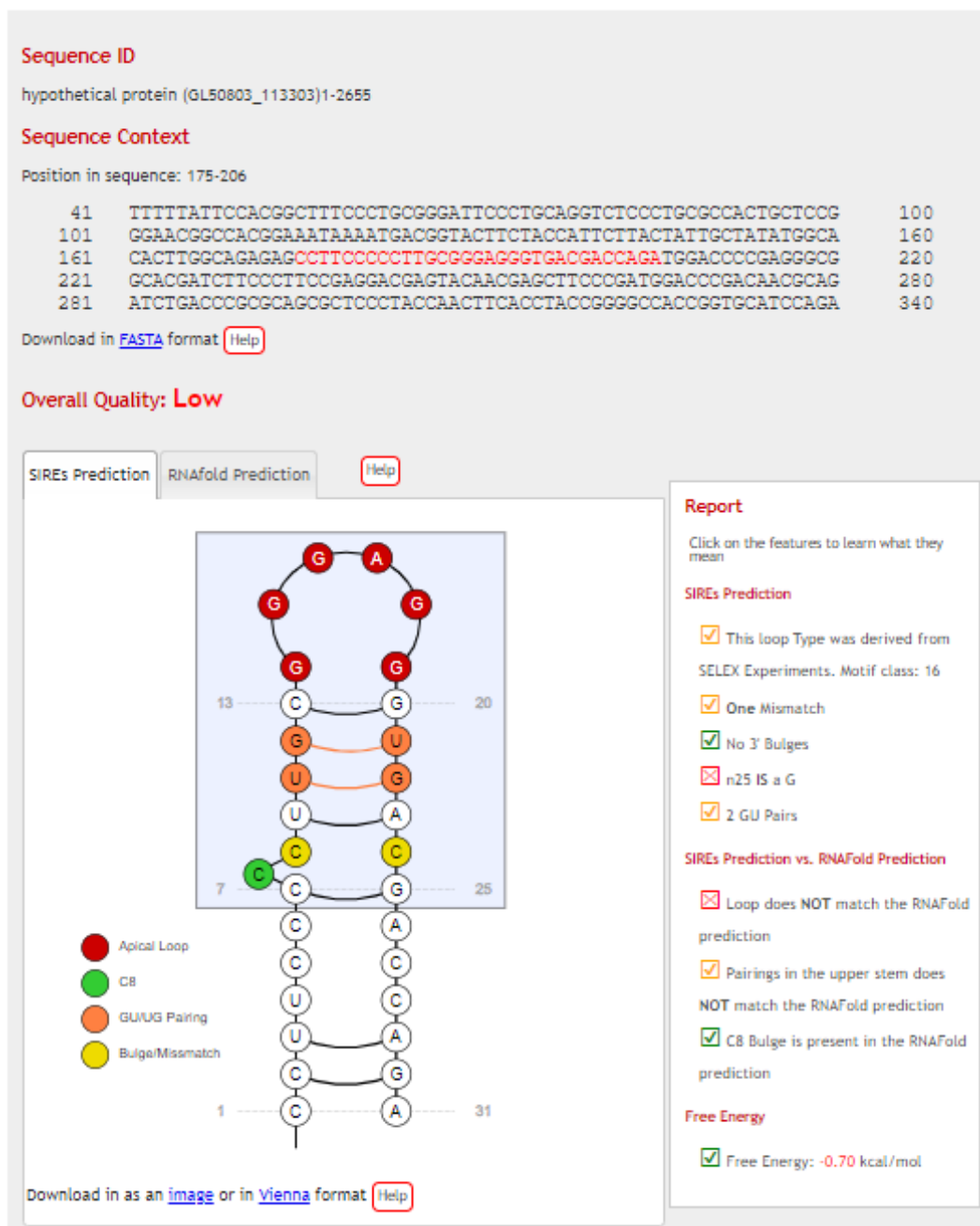


Figura 38. Análisis en SIREs de la secuencia de *Hypothetical protein* (GL50803_113303) de *G. duodenalis*. El servidor web SIREs formó una estructura tallo burbuja en la secuencia GL50803_113303 del nucleótido 174 al 205, el extremo 3' es el más estable (Campillos y col., 2010).

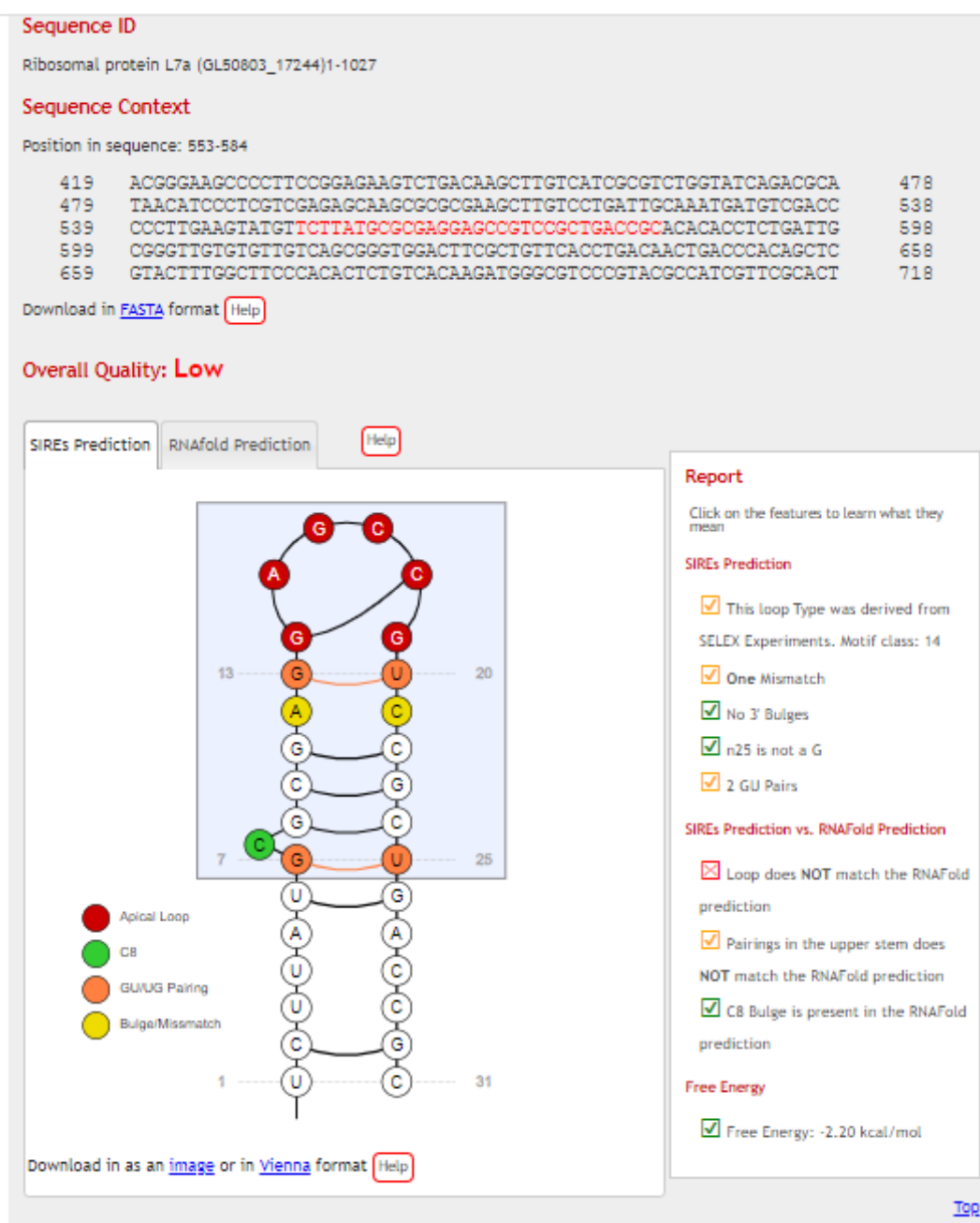


Figura 39. Análisis en SIREs de la secuencia de *Ribosomal protein L7a* (GL50803_17244) de *G. duodenalis*. El servidor web SIREs formó una estructura tallo burbuja en la secuencia GL50803_17244 del nucleótido 552 al 583, el extremo 5' es el más estable (Campillos y col., 2010).

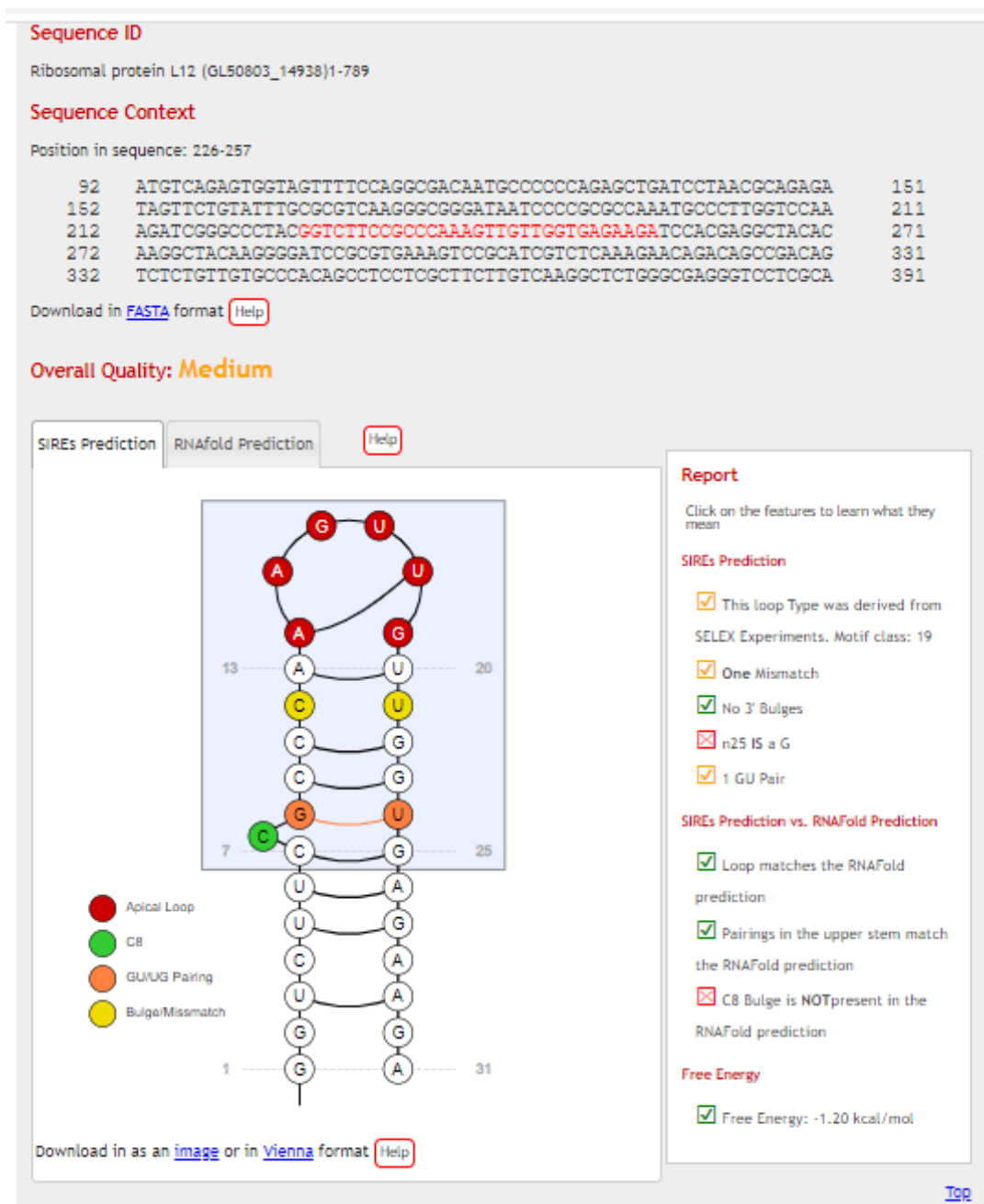


Figura 40. Análisis en SIREs de la secuencia de *Ribosomal protein L12* (GL50803_14938) de *G. duodenalis*. El servidor web SIREs formó una estructura tallo burbuja en la secuencia GL50803_14938 del nucleótido 225 al 256, el extremo 5' es el más estable (Campillos y col., 2010).

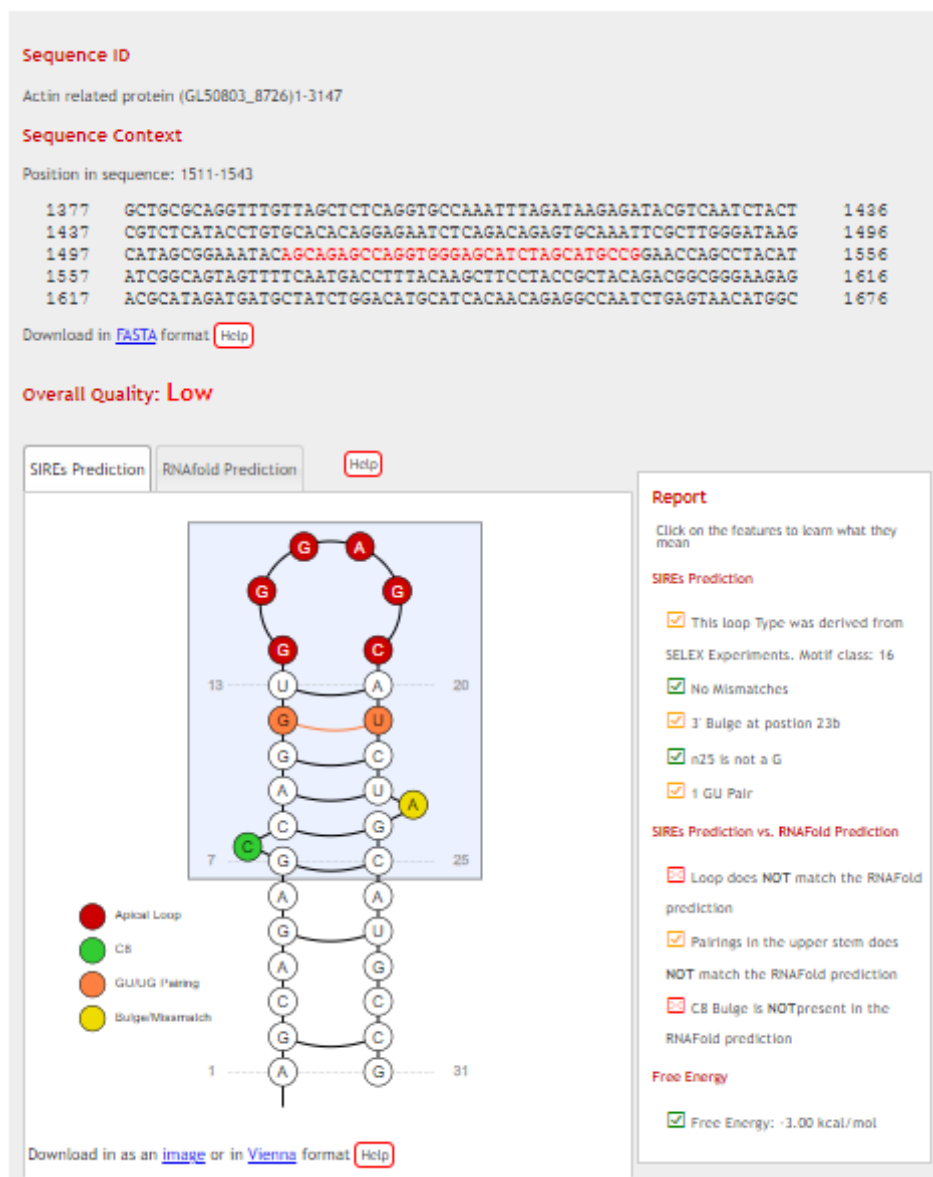
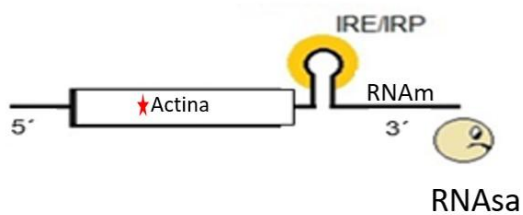
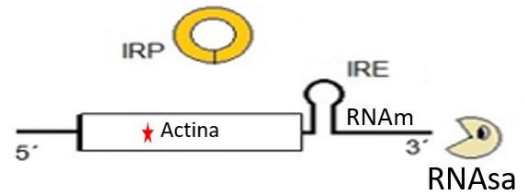


Figura 41. Análisis en SIREs de la secuencia de *Actin-related protein* (GL50803_8726) de *G. duodenalis*. El servidor web SIREs formó una estructura tallo burbuja en la secuencia GL50803_8726 del nucleótido 1510 al 1542, el extremo 3' es el más estable (Campillos y col., 2010).

A)

Bajo Hierro

B)

Alto hierro

- ★ *Glucosamina 6 fosfato desaminasa*
- ★ *Citocromo b5*
- ★ *Subtilisina*

Figura 42. Posible mecanismo de regulación tipo IRE/IRP en *G. duodenalis*.

Regulación postranscripcional por hierro sugerida para los transcritos *Actina*, *Glucosamina 6 fosfato desaminasa*, *Citocromo b5* y *Subtilisina*, los cuales poseen un IRE-like en su extremo 3'-UTR. A) En bajas concentraciones de hierro IRP-like tiene una conformación adecuada que le permite unirse al IRE-like del transcrito estabilizándolo y permitiendo la traducción. B) Sin embargo, en altas concentraciones de hierro del medio IRP-like no puede unirse al IRE-like del RNAm, exponiéndolo a la acción de las RNAsas permitiendo su degradación.

IX CONCLUSIONES

1. El hierro afecta el crecimiento y la viabilidad de *G. duodenalis* ya que en condiciones restringidas de hierro no se observó crecimiento en el cultivo mientras que en condiciones de alto hierro (300 μ M) se observó un aumento en el crecimiento y la viabilidad. Además, el parásito puede adaptarse a las diferentes concentraciones de este metal.
2. El hierro es un elemento que afecta los mecanismos de citoadherencia y citotoxicidad de *G. duodenalis* ya que al interaccionar el parásito con células HT-29, se observó una mayor adhesión y mayor daño sobre las células intestinales.
3. Los transcritos *Actina*, *Citocromo b5*, *Glucosamina 6 fosfato desaminasa* y *Subtilisina* son regulados negativamente por hierro, debido a que se sobreexpresaron en condiciones de bajo contenido de este metal.
4. La presencia de estructuras tallo-burbuja en diversos RNAm de virulencia, ribosomal, citoesqueleto y enzimas metabólicas, específicamente en *Actina*, *Citocromo b5*, *Glucosamina 6 fosfato desaminasa* y *Subtilisina* que son regulados por el hierro, sugieren la existencia de un mecanismo de regulación postranscripcional tipo IRE/IRP en este protozoario en su forma más primitiva.

X BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Shady O, El Raziky MS, Zaky MM y Mohamed RK. 2011. Impact of *Giardia lamblia* on growth, serum levels of zinc, copper, and iron in egyptian children. *Biological Trace Element Research* 140(1): 1-6.
- Adam RD. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology*.14.3: 447-475.
- Adam RD. 2021. *Giardia duodenalis*: Biology and Pathogenesis. *Clinical Microbiology*. 34 (4): 1-35.
- Adedija AN, McMahan T, Neal JP, Hamal DS, Jois S, Romo D, Hull K y Garlapati S. 2020. Translation initiation factors GleIF4E22 and GleIF4A can interact directly with the components of the pre-initiation complex to facilitate translation initiation in *Giardia lamblia*. *Molécula Biochemical Parasitology*; 236:111258.
- Aisen P y Listowsky I. 1980. Iron transport y storage proteins. *Annual Review of Biochemistry*; (49):357-93.
- Alam S, Yee J, Couture M, Takayama SJ, Tseng WH, Mauk AG y Rafferty S. 2012. Cytochrome b5 from *Giardia lamblia*. *Metallomics*; 4: 1255e1261.
- Ali SA y Hill DR. 2003. *Giardia intestinalis*. *Current Opinion in Infectious Diseases* 16(5): 453-60.
- Al-Mekhlafi MS, Azlin M, NorAini U, Shaik A, Saiah A, Fatmah MS, Ismail MG, Ahmad Firdaus MS, Aisah MY, Rozlida AR y Norhayati M. 2005. Giardiasis as a predictor of childhood malnutrition in Orang Asli children in Malaysia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine y Hygiene*; (9): 686-91.
- Álvarez-Sánchez ME. 2001. Participación de la cisteín proteinasa de 65 KDa (CP65) de *T. vaginalis* en la citotoxicidad a la célula blanco. Tesis de Doctorado. Departamento de Patología Experimental. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F., México.

- Álvarez-Sánchez ME, Ávila-González L, Becerril-García C, Fattel-Facenda L y Arroyo R. 2000. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial Pathogenesis*; 28: 1-10.
- Ankarklev J, Jeriström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K y Svärd SG. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Reviews Microbiology*; 8: 413-422.
- Argüello-García R, Argüello-López C, González-Robles A, Figueroa AM y Ortega-Pierres MG. 2002. Sequential exposure y assembly of cyst wall filaments on the surface of encysting *Giardia duodenalis*. *Parasitology*; (125): 209-219.
- Arroyo R, Ochoa T, Tai, JH y de la Garza, M. 2015. Iron and Parasites. *Biomedical Research International*; 29: 1672.
- Aurrecoechea C, Brestelli J, Brunk BP, Carlton, JM, Dommer J, Fisher S, Gajria B, Gao X, Gingle A, Grant G, Harb OM, Heiges M, Innamorato F, Lodice J, Kissinger JC, Kraemer E, Li W, Miller JA, Morrison HG, Nayak V, Pennington C, Pinney DF, Roos DS, Ross C, Stoeckert Jr CJ, Sullivan S, Treatman C y Wang H. 2009. GiardiaDB and TrichDB: Integrated genomic resources for the eukaryotic protist pathogens *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. *Nucleic Acids Research*; 37: D526- D530.
- Bagchi S, Oniku A, Topping K, Mamhoud ZN y Paget TA. 2012. Programmed cell death in *Giardia*. *Parasitology*; 139(7): 894-903.
- Bartelt LA, Roche J, Kolling G, Bolick D, Noronha F, Naylor C, Hoffman P, Warren C, Singer S y Guerrant R. 2013. Persistent *Giardia lamblia* impairs growth in a murine malnutrition model. *Journal of Clinical Investigation*; 123(6): 2672-84.
- Basilion JP, Rouault TA, Massinople CM, Klausner RD y Burgess WH. 1994. The iron-responsive element-binding protein: localization of the RNA-binding site to the aconitase active-site cleft. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 91: 574-578.

- Bazán-Tejada ML, Argüello-García R y Ortega-Pierres G. 2008. La Biogénesis del quiste de *Giardia duodenalis*, como modelo de diferenciación unicelular. Departamento de Genética y Biología Molecular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Disponible en (<http://bq.unam.mx/mensajebioquímico>).
- Bernander R, Palm JE y Svard SG. 2001. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cellular Microbiology*; 3(1): 55-62.
- Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL, Black MM. 2002. Effects of stunting, diarrheal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet*; 359: 564–71.
- Bermudez BJC y China PD. 2025. Perspectivas actuales en estudios de la giardiasis: una revision integral con enfoque inmunologico, diagnostico y terapeutico. *Revista Latinoamericana de Ciencias Sociales y Humanidades; Volumen VI*: 2789-3855.
- Brazzalotto X, Timmins P, Dupont Y y Moulis JM. 2002. Structural changes associated with switching activities of the human iron regulatory protein 1. *The Journal of Biological Chemistry*; (277): 11995-12000.
- Buret AG. 2007. Mechanism of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut*; 56(3): 316-7.
- Buret AG, Mitchell K, Muench DG y Scott KG. 2002. *Giardia lamblia* disrupt tight junctional ZO-1 y increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology*; 125(Pt 1): 11-9.
- Burrola-Barraza ME. 2001. ¿Existen secuencias IRES en Trichomonas? Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Busatti HG, Alves RJ, Santana-Anjos KG, Gil FF, Cury MC, Vannier-Santos MA y Gomes MA. 2013. Effects of metronidazole analogues on *Giardia lamblia*: experimental infection y cell organization. *Diagnostic Microbiology y Infectious Disease*; 75(2): 160-164.

- Butt J, Kim HY, Basilion JP, Cohen S, Iwai K, Philpott C, Altschul S, Klausner R y Rouault TA. 1996 Differences in the RNA binding sites of iron regulatory proteins and potential target diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 93: 4345-4349.
- Caccio SM, Thompson RCA, McLauchlin J y Smith HV. 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitology*; 21: 430–437.
- Calla-Choque JS, Figueroa-Angulo EE, Ávila-González L y Arroyo R. 2014. α -Actinin TvACTN3 of *Trichomonas vaginalis* is an RNA-binding protein that could participate in its posttranscriptional iron regulatory mechanism. *Biomed Research International*; volume 2014: 1-20.
- Campillos M, Cases I, Hentze MW y Sánchez M. 2010. SIREs: searching for iron-responsive elements. *Nucleic Acids Research*; 38: web server issue. Doi:10.109/nar/gkq371.
- Carpenter ML, Assaf ZJ, Gourguechon S y Cande WZ. 2012. Nuclear inheritance y genetic exchange without meiosis in the binucleate parasite *G. intestinalis*. *Journal of Cell Science*; 125(10): 2523-32).
- Castillo-Romero A, León-Ávila G, Pérez-Rangel A, Cortes-Zárate R, García-Tovar C y Hernández JM. 2009. Participation of Actin on *Giardia lamblia* Growth and Encystation. *Plos One*; 4: e7156.
- Cedillo-Rivera R, Leal YA, Yépez-Mulia L, Gómez-Delgado A, Ortega-Pierres G, Tapia-Conyer R, Muñoz O. 2009. Seroepidemiology of giardiasis in Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 80: 6-10.
- CDC (Centers for Disease Control y Prevention). 2010. Parasites-*Giardia*. 07 de enero del 2012. Disponible en web <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/biology.html>.
- CDC (Centers for Disease Control y Prevention). 2016. Parasites-*Giardia*. 15 de junio del 2016. Disponible en web <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/biology.html>.

- Cernikova L, Faso C, Hehl A.B. 2018. Five facts about *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog.* 14, e1007250 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007250>.
- Chávez B, Knaippe F, Gonzalez-Mariscal L y Martínez-Palomo A. 1986. *Giardia lamblia*: electrophysiology y ultrastructure of cytopathology in cultured epithelial cells. *Experimental Parasitology*; (3): 379-89.
- Coradi ST y Guimaraes S. 2006. *Giardia duodenalis*: protein substrates degradation by trophozoite protease. *Parasitology Research*; 99(2): 131-136.
- Cotton JA, Beatty JK y Buret AG. 2011. Host parasite interactions y pathophysiology in *Giardia* infections. *International Journal for Parasitology*; 41(9): 925-33.
- Craun GF. 1986. Waterborne giardiasis in the United States 1965-84. *The Lancet*; (8505): 513-4.
- Crossley R y Holberton DV. 1983. Characterization of proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Journal of Cell Science*; (59): 81-103.
- Cruz-Castañeda A y Olivares-Trejo J. 2008. Ehhmbp45 is a novel hemoglobin-binding protein identified in *Entamoeba histolytica*. *FEBS Letters*; 582: 2806-2010.
- Danquah I, Gahutu JB, Ignatus R, Musemakweri A y Mockenhaupt FP. 2014. Reduced prevalence of *Giardia duodenalis* in iron-deficient Rwandan children. *Tropical Medicine & International Health*; 19(5): 563-7.
- Das S, Stevens T, Castillo C, Villaseñor A, Arredondo H y Reddy K. 2002. Lipid metabolism in mucous-dwelling amitochondriate protozoa. *International Journal for Parasitology*; 32 (6): 655-75.
- David MB, Jacqueline AU y Peter U. 1996. A H₂O-producing NADH oxidase from the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. *European Journal of Biochemistry*; 241;155–161.
- Davids BJ, Gilbert MA, Liu Q, Reiner DS, Smith AJ, Lauwet T, Lee C, McArthur AG y Gillin FD. 2011. An atypical proprotein convertase in *Giardia lamblia* differentiation. *Molecular y Biochemical Parasitology*; 1750(2): 169-180.

- De Carvalho TB, David EB, Coradi ST y Guimaraes S. 2008. Protease activity in extracellular products secreted in vitro by trophozoites of *Giardia duodenalis*. *Parasitology Research*; 104(1): 185-190.
- De Vizia B, Poggi V, Vajro P, Cucchiara S y Acampora A. 1985. Iron malabsorption in giardiasis. *Journal of Pediatrics*; 107(1): 75-8.
- Dolezal P, Smid O, Rada P, Zubáková Z, Bursac D, Suták R, Nebesárová J, Lithgow T y Tachezy J. 2005. *Giardia* mitosomes y trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 102(31): 10924-9.
- DuBois KN, Abodeely M, Sakanari J, Craik CS, Lee M, McKerrow JH y Saij M. 2008. Identification of the major cysteine protease of *Giardia* and its role encystation. *The Journal of Biological Chemistry*; 283(26): 18024-18031.
- Dupuy J, Volbeda A, Carpentier P, Darnault C, Moulis JM y Fontecilla-Camps JC. 2006. Crystal Structure of Human Iron Regulatory Protein 1 as Cytosolic Aconitase. *Structure*; 14: 129–139.
- Duque S, Nicholls RS, Arévalo A y Guerrero R. 2001. Serodiagnóstico de Giardiasis: identificación de inmunoglobulina G anti-*Giardia duodenalis* en suero mediante ELISA. *Biomedica* 21(3): 228-33.
- Eckmann L, Laurent F, Langford TD, Hetsko ML, Smith JR, Kagnoff MF y Gillin FD. 2000. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *Journal of Immunology*; 164(3): 1478-87.
- Eligio-García L, Cortés-Campos A, Cota-Guajardo S, Gaxiola S y Jiménez-Cardoso E. 2008. Frequency of *Giardia intestinalis* assemblage isolates from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, México using beta-giardin restriction gene. *Veterinary Parasitology* 156(3-4): 205-09.

- Elmendorf, H. G., Dawson, S. C. y McCaffery, J. M. 2003. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *International Journal Parasitology*; 33: 3–28.
- Elmendorf H, Singer S, Pierce J, Cowan J y Nash T. 2000. Initiator y upstream elements in the α 2-tubulin promoter of *Giardia lamblia*. *Molecular y Biochemical Parasitology*; (113): 157-169
- Emelyanov VV. 2003. Phylogenetic affinity of a *Giardia lamblia* cysteine desulfurase conforms to canonical pattern of mitochondrial ancestry. *FEMS Microbiology Letters*; 226(2): 257-66.
- Emery SJ, Mirzaei M, Vuong D, Pascovici D, Chick JM, Lacey E y Haynes PA. 2016. Induction of virulence factors in *Giardia duodenalis* independent of host attachment. *Scientific Reports*; 6:20765: DOI: 10.1038/srep20765.
- Esch KJ y Petersen CA. 2013. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews* 26(1): 62.
- Erlandsen SL, Sherlock LA, Januschka M, Schupp DG, Schaefer FW, Jakubowski W, Bemrick WJ. 1988. Cross-species transmission of *Giardia* spp: inoculation of beavers and muskrats with cyst of human, beaver, mouse and muskrat origin. *Applied and Environmental Microbiology*; 54 (11): 2777-85.
- Ertan P, Yereli K, Kurt O, Balcioglu C y Onag A. 2002. Serological levels of zinc, copper and iron elements among *Giardia lamblia* infected children in Turkey. *Pediatric International*; 44(3): 286-8.
- Feng Y y Xiao L. 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 24(1): 110-40.
- Fernandes PD y Assreuy J. 1997. Role of nitric oxide and superoxide in *Giardia lamblia* killing. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 30: 93–99.
- Figueroa-Angulo EE, Calla-Choque JS, Mancilla-Olea MI y Arroyo R. 2015. RNA-Binding in *Trichomonas vaginalis*: Atypical Multifunctional Proteins Involved in a Posttranscriptional Iron Regulatory Mechanism. *Biomolecules*; 5: 3354-3395.

- Fink MY, Shapiro D y Singer SM. 2020 *Giardia lamblia*: Laboratory Maintenance, Lifecycle Induction, and Infection of Murine Models. *Currents Protocols in Microbiology*; 57(1): e102. doi: 10.1002/cpmc.102.
- Fonte GL. 2009. *Giardia lamblia*. Aspectos de su biología. Fonte GL y Almannoni SAS. Giardiasis: Entre realidades y mitos. La Habana: Ed. Ciencias Médicas. ISBN: 978-959-212-476-9. Consultado en: 02 de septiembre del 2009. Disponible en: <http://gsdl.bvs.sld.cu>.
- Franzén O, Jerlstrom-Hultqvist J, Einarsson E, Ankarklev J, Ferella M, Andersson B y Svard SG. 2013. Transcriptome profiling of *Giardia intestinalis* using strand-specific RNA-seq. *PLOS Computational Biology*; 9: e1003000. doi:10.1371/journal.pcbi.1003000.
- Galkin A, Kulakova L, Lim K, Chen CZ, Zheng W, Turko IV y Herzberg O. 2014. Structural basis for inactivation of *Giardia lamblia* carbamate kinase by disulfiram. *The Journal of Biological Chemistry*; 289(15): 10502-09.
- Gascón J. 2006. Epidemiology, etiology y pathophysiology of traveler's diarrhea. *Digestion*; Vol 73 Suppl 1:102-8.
- Gardner PR, Gardner AM, Martin LA y Salzman AL. 1998. Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 95, 10378e10383.
- Gegout V, Schlegl J, Schlanger B, Hentze MW, Reinbolt J, Ehresmann B, Ehresmann C y Romby P. 1999. Ligand-induced structural alterations in human iron regulatory protein-1 revealed by protein footprinting. *The Journal Biological Chemistry*; (274): 15052-15058.
- Gillon J. 1984. Giardiasis: review of epidemiology, pathogenetic mechanisms y host responses. *QJM: International Journal of Medicine*; 53(209): 29-39.

- Giraldo-Gómez JM, Lora F, Henao LH, Mejía S y Gómez-Marín JE. 2005. Prevalencia de giardiasis y parásitos intestinales en preescolares de hogares atendidos en un programa estatal en Armenia, Colombia. *Revista de Salud Pública*; 7(3): 327-38.
- Good MF, Powell LW, Halliday JW. 1988. Iron status y cellular immune competence. *Blood Reviews*; (1): 43-9.
- Goyal N, Rishi P y Shukla G. 2013. *Lactobacillus rhamnosus* GG antagonizes *Giardia intestinalis* induced oxidative stress y intestinal disaccharidases: an experimental study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*; 29(6):1049-57.
- Guo B, Phillips JD, Yu Y y Leibold EA. 1995. Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *The Journal Biological Chemistry*; (270): 21645-21651.
- Hahn J, Seeber F, Kolodziej H, Ignatius R, Laue M, Aebischer T y Klotz C. 2013. High sensitivity of *Giardia duodenalis* to tetrahydrolipstatin (Orlistat) *in vitro*. *Public Library of Science*; 8(8): 1-10.
- Haile DJ, Rouault TA, Harford JB, Kennedy MC, Blondin GA, Beinert H y Klausner RD. 1992. Cellular iron regulation of the iron-responsive element binding protein: disassembly of the cubane iron-sulfur cluster results in high affinity RNA binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; (89): 11735-11739.
- Haile DJ, Rouault TA, Tang CK, Chin J, Harford JB y Klausner RD. 1992. Reciprocal control of RNA-binding y aconitase activity in the regulation of the iron-responsive element binding protein: role of the iron-sulfur cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; (89): 7536-7540.
- Halliez MC y Buret AG. 2013. Extra-intestinal y long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World Journal of Gastroenterology*; 19(47): 8974-85.
- Halliday CEW, Clark C y Farthing MJG. 1988. *Giardia*-bile salt interactions *in vitro* y *in vivo*. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine y Hygiene*; (82): 428-432.

- Hantke K. 2001. Iron y metal regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*; (4):172-177.
- Heinz E y Lithgow T. 2013. Back to basics: A revealing secondary reduction of the mitochondrial protein import pathway in diverse intracellular parasites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Research*; 1833(2):295–303.
- Henderson B y Kuhn L. 1995. Differential modulation of the RNA binding proteins IRP1 y IRP2 in response to iron: IRP2 requires translation of another protein. *The Journal Biological Chemistry*; (270): 20509-20515.
- Hentze MW, Muckenthaler MU y Andrews NC. 2004. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *The Journal Cell*; (3):285-97.
- Hentze M y Kuhn L. 1996. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, y oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 93:8175-8182.
- Hernández-Cortez C, Aguilera-Arreola MG, Castro-Escarpulli G. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*; 31(4): 137-151.
- Hernández-Gutiérrez R, Ávila-González L, Ortega-Lopez J, Cruz-Talonia F, Gómez-Gutiérrez G y Arroyo R. 2004. *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental Parasitology*; 107: 125-135.
- Hernández-Gutiérrez R, Ortega-López J y Arroyo R. 2003. A 39 kDa cysteine proteinase CP39 from *Trichomonas vaginalis*, which is negatively affected by iron may be involved in trichomonal citotoxicity. *Journal of Eukaryotic Microbiology*: 696-698.
- Hernández-Sánchez J, Liñan RF, del Rosario Salinas-Tobón M y Ortega-Pierres G. 2008. *Giardia duodenalis*: Adhesion-deficient clones have reduced ability to establish

- infection in Mongolian gerbils. *Experimental Parasitology*. 119(3), 364–372.
- Hernández Y, Castillo C, Roychowdhury S, Hehl A, Aley SB y Das S. 2007. Clathrin-dependent pathways y the cytoskeleton network are involved in ceramide endocytosis by a parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology*; 37(1): 21-32.
- Hill DR. 1993. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. *Infectious Disease Clinics of North America*; 7 (3): 503-25
- Holberton DV y Marshall J. 1995. Analysis of consensus sequence patterns in *Giardia* cytoskeleton gene promoters. *Nucleic Acids Research*; 23 (15): 2945-53.
- Humen MA, Pérez PF y Liévin-Le Moal V. 2011. Lipid raft-dependent adhesión of *Giardia intestinalis* trophozoites to a cultured human enterocyte-like Caco-2/TC7 cell monolayer leads to cytoskeleton-dependent functional injuries. *Cell Microbiology*; 13(11): 1683-702.
- Ignatius R, Gahutu JB, Klotz C, Steininger C, Shyirambere C, Lyng M, Musemakweri A, Aebischer T, Martus P, Harms G, Mockenhaupt FP. 2012. High prevalence of *Giardia duodenalis* Assemblage B infection and association with underweight in Rwandan children. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 6 (6), e1677.
- Inoue K, Nakai Y, Ueda S, Kamigaso S, Ohta KY, Hatakeyama M, Hayashi Y, Otagiri M y Yuasa H. 2008. Functional characterization of PCFT/HCP1 as the molecular entry of the carrier-mediated intestinal folate transport system in the rat model. *Gastrointestinal and Liver Physiology*; 294(3); 660-8.
- Ivanov AI. 2010. *Giardia* and giardiasis. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*; 13 (2): 65-80.
- Iwai K, Klausner R y Rouault T. 1995. Requeriments for iron-regulated degradation of the RNA binding proteins, iron regulatory protein 2. *European Molecular Biology Organization*; (21): 5350-5357.

- Jahan N, Khatoon R y Ahmad S. 2014. A comparison of microscopy and enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of *Giardia lamblia* in Human faecal specimens. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*; 8(11): DC04-DC06.
- Jarroll EL, Manning P, Berrada A, Hare D y Lindmark DG. 1989. Biochemistry and metabolism of *Giardia*. *The Journal of Protozoology*; 36: 190e197.
- Jedelsky PL, Dolezal P, Rada P, Pyrih J, Smíd O, Hrdy I, Sedinová M, Marcincikova M, Voleman L, Perry AJ, Beltrán NC, Lithgow T y Tachezy J. 2011. The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protest *Giardia intestinalis*. *PLoS One*; 6(2): e17285.
- Jenkins MC, O'Brien CN, Murphy C, Schwarz R, Miska K, Rosenthal B, y Trout JM. 2009. Antibodies to the Ventral Disc Protein δ -giardin Prevent *in Vitro* Binding of *Giardia lamblia* Trophozoites. *Journal of Parasitology*. 95(4), 895–899.
- Jex AR, Koehler AV, Ansell BR, Baker L, Karunajeewa H y Gasser RB. 2013. Getting to the guts of the matter: The status y potential of “omics” research of parasitic protists of the human gastrointestinal system. *International Journal for Parasitology*; 3564: 1-12.
- Johnson DC, Dean DR, Smith AD y Johnson MK. 2005. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry*; 74, 247e281.
- Kaldy P, Mwnotti E, Remy M y Kuhn L. 1999. Identification of RNA-binding surfaces in iron regulatory protein-1. *European Molecular Biology Organization*; 18 (21): 6073-6083.
- Kaur H, Ghosh S, Samra H, Vinayak VK y Ganguly NK. 2001. Identification y characterization of an excretory-secretory product from *Giardia lamblia*. *Parasitology*; 123 (Pt4): 347–356.

- Knodler L, Svard S, Silberman J, Davids B y Gillin F. 1999. Developmental gene regulation in *Giardia lamblia*: first evidence for an encystation-specific promoter y differential 5' mRNA processing. *Molecular Microbiology*; 34(2):327-340.
- Koehler AV, Jex AR, Haydon SR, Stevens MA y Gasser RB. 2014. *Giardia*/giardiasis a perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnology Advances*; 32(2): 280–89.
- Kuick CJ, Martin GL y Sortor BV. 2004. Common Intestinal Parasites. *American Family Physician*; 69(5): 1161-1168.
- Kwiatkowska-Semrau K, Czarnecka J, Wojciechowski M y Milewski S. 2015. Heterogeneity of quaternary structure of glucosamine-6-phosphate deaminase from *G.lamblia*. *Parasitology Research*; 114: 175-184.
- Lagunas-Rangel FA, Yee J y Bermúdez-Cruz RM. 2021. An update on cell division of *Giardia duodenalis* trophozoites. *Microbiological Research*; 250 (2021): 1-10.
- Lane S y Lloyd D. 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Critical Reviews in Microbiology*; 28(2): 123-47.
- Layer G, Reichelt J, Jahn D y Heinz DW. 2010. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Science*. 19, 1137e1161.
- Lee J, Park S y Yong TS. 2008. Effect of iron on adherence y cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* to CHO cell monolayers. *The Korean Journal of Parasitology*; 46: 37-40.
- Lehker M, Arroyo R y Alderete JF. 1991. The regulation by iron of the synthesis of adhesions y cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Experimental Medicine*; 174: 311-318.
- Leipuviene R y Theil C. 2007. The family of iron responsive RNA structures regulated by changes in cellular iron y oxygen. *Cellular y Molecular Life Sciences*; (64): 2945-2955.

- Lenaghan SC, Davis CA, Henson WR, Zhang Z y Zhang M. 2011. High-speed microscopic imaging of flagella motility and swimming in *Giardia lamblia* trophozoites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 108(34): 550-558.
- León- Beltrán JG. 2023. Regulación por Hierro de Homólogos de Adhesinas en *Giardia duodenalis*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- León-Sicairos CR, León-Félix J y Arroyo, R. 2004. Tvcp12, a novel *Trichomonas vaginalis* cathepsin L-like cysteine proteinase-encoding gene. *Microbiology*; 150 (5): 1131-1138.
- León-Sicairos CR, Figueroa-Angulo EE, Calla-Choque JS y Arroyo R. 2023. The Non-Canonical Iron-Responsive Element of IRE-tvcp12 Hairpin Structure at the 3'-UTR of *Trichomonas vaginalis* TvCP12 mRNA That Binds TvHSP70 and TvACTN-3 Can Regulate mRNA Stability and Amount of Protein. *Pathogens*; 12(4): 586. doi: 10.3390/pathogens12040586.
- Leung AKC, Leung AAM, Wong AHC, Sergi CM y Kamsites JKM. 2019. Giardiasis: An overview. *Recent Advances in Inflammation Allergy Drug Discovery*; 13: 134-143.
- Lev BI, Ward HD, Keusch GT, Pereira MEA. 1986. Lectin activation in *Giardia lamblia* by host protease: a novel host–parasite interaction. *Science*; 23: 71–73.
- Lopez AB, Hossan MT, Keulen HV. 2002. *Giardia intestinalis* glucosamine 6-phosphate isomerase: The key enzyme to encystment appears to be controlled by ubiquitin attachment. *Journal Eukaryotic Microbiology*; 49: 134-136.
- Loyevsky M, Mompoin F, Yikilmaz E, Altscgul SF, Madden T, Wootton JC, Kurantsin-Mills J, Kassim OO, Gordeuk VR y Rouault TA. 2003. Expression of a recombinant IRP-like *Plasmodium falciparum* protein that specifically binds putative IREs. *Molecular y Biochemical Parasitology*; (126): 231-38.

- Lujan HD, Mowatt MR, Wu JJ, Lu Y, Lees A, Chance MR y Nash TE. 1995. Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. *The Journal of Biological Chemistry*; 270: 13807–13.
- Mach J y Sutak R. 2020. Iron in parasitic protists - from uptake to storage and where we can interfere. *Metallomics*; 12: 1335-1347.
- Mahmoud A, Attia R, Said S y Ibraheim Z. 2014. Ginger and cinnamon: can this household remedy treat giardiasis? Parasitological and histopathological studies. *Iranian Journal of Parasitology*; 9(4): 530-40.
- Makiuchi T y Nozaki T 2013. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie*; 100:3-17.
- Malquori L, Carsetti L y Ruberti G. 2008. The 3' UTR of the human CTLA4 mRNA can regulate mRNA stability y translational efficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*; (1): 60-65.
- Mark-Carew MP, Adesiyun AA, Basu A, Georges KA, Pierre T, Tilitz S, Wade SE y Mohammed HO. 2013. Characterization of *Giardia duodenalis* infections in dogs in Trinidad y Tobago. *Veterinary Parasitology*; 196(1-2): 199-202.
- Martínez-Gordillo MN, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, Montijo-Barrios E, Ponce-Macotela M. 2014. Intraepithelial *giardia intestinalis*: a case report and literature review. *Medicine*; 93(29): e277.
- Martínez E, Cerpa L y Liu-Cam M. 2011. Prevalencia de giardiasis en guarderías de Tiabaya-Arequipa, Perú 2006. *Neotropical Helminthology*; 5(2): 257-64.
- Mastronicola, D., Falabella, M., Forte, E., Testa, F., Sarti, P., Giuffrè A. 2016. Antioxidant defence systems in the protozoan pathogen *Giardia intestinalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*; 206(2): 56-66.
- Mastronicola, D., Testa, F., Forte, E., Bordi, E., Pucillo, L.P., Sarti, P., Giuffrè, A. 2010. Flavohemoglobin and nitric oxide detoxification in the human protozoan parasite

- Giardia intestinalis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 399, 654e658.
- Mathews DH, Sabina J, Zuker M y Turner DH. 1999. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *Journal Molecular Biology*; 288: 911-940.
- Meyron-Holtz EG, Ghosh MC y Rouault TA. 2004. Mammalian tissue oxygen levels modulate iron-regulatory protein activities *in vivo*. *Science* 306, 2087–2090.
- Militello KT, Dodge M, Bethke L y Wirth DF. 2004. Identification of regulatory elements in the *Plasmodium falciparum* genome. *Molecular y Biochemical Parasitology*; 134(1): 75-88.
- Monajemzadeh S y Monajemzadeh M. 2008. Comparison of iron y hematological indices in *Giardia lamblia* before y after treatment in 102 children in Ahwaz, Iran. *Medical Science Monitor*; (1): 19-23.
- Montoya-Orozco LM y Roldán-Aristizábal LM. 2007. Prevalencia de giardiasis en perros de Medellín con un laboratorio de referencia. Tesis de licenciatura, Universidad CES; Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamaneck NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svard SG y Sogin ML. 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*; 317(5846):1921-6.
- Muckenthaler M, Gunkel N, Frishman D, Cyrklaff A, Tomancak P y Hentze MW. 1998. Iron-regulatory protein-1 (IRP-1) is highly conserved in two invertebrate species characterization of IRP-1 homologues in *Drosophila melanogaster* and *Caenorabditis elegans*. *European Journal of Biochemistry*; 254(2): 230-7.

- Müller N y Von Allmen N. 2005. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *International Journal for Parasitology*; 35(13):1339-47.
- Nakai Y, Inoue K, Abe N, Hatakeyama M, Ohta KY, Otagiri M, Hayashi Y and Yuasa H. 2007. Functional characterization of human proton-coupled folate transporter/heme carrier protein 1 heterologously expressed in mammalian cells as a folate transporter. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 322(2): 469-76.
- Nash TE. 2002. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Molecular Microbiology*; 45(3): 585-590.
- Núñez-Fernández FA, Finlay-Villalvilla CM y Sarracent-Pérez J. 2004. Estudio de factores asociados con la reinfección por *Giardia lamblia* en niños de círculos infantiles. Tesis Doctoral. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. La Habana.
- Olivares JL, Fernández R, Fleta J, Ruiz MY, Clavel A y Moreno LA. 2004. Iron deficiency in children with *Giardia lamblia* y *Enterobius vermicularis*. *Nutrition Research*; 24: 1-5.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) Ginebra. 1991. Modelo OMS de Información Sobre Prescripción de Medicamentos. Medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias. Disponible en página web: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/41855/1/9243401025_28part1%29.pdf.
- Ortega-Pierres MG y Argüello-García R. 2019 *Giardia duodenalis*: Role of secreted molecules as virulent factors in the cytotoxic effect on epithelial cells. *Advances in Parasitology*; 106: 129-169.
- Palm D, Weiland M, McArthur AG, Winiecka-Krusnell J, Cipriano MJ, Birkeland SR, Pacocha SE, Davids B, Gillin F, Linder E y Svard S. 2005. Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Molecular and Biochemical Parasitology*; 141(2): 199-207.

- Pantopoulos K. 2004. Iron metabolism y the IRE/IRP regulatory system: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences*; (1012): 1-13.
- Pantopoulos K, Weiss G y Hentze MW. 1996. Nitric oxide y oxidative stress (H₂O₂) control mammalian iron metabolism by different pathways. *Molecular y Cellular Biology*; (16): 3781-3788.
- Paredes AR, Nayeri A, Xu JW, Krtkova J y Cande WZ. 2014. Identification of Obscure yet Conserved Actin-Associated Proteins in *Giardia lamblia*. *Eukaryotic Cell*; 13: 776-784.
- Park SJ, Lee SM, Lee J y Yong TS. 2001. Differential gene expression by iron-limitation in *Entamoeba histolytica*. *Molecular y Biochemical Parasitology*; 114: 257-260.
- Peattie DA. 1990. The giardins of *Giardia lamblia*: genes y proteins with promise. *Parasitology Today*; 6(2): 52-6.
- Peattie D, Alonso R, Hein A y Caulfield J. 1989. Ultrastructural Localization of Giardians to the Edges of Disk Microribbons of *Giardia lamblia* the Nucleotide y Deduced Protein Sequence of Alpha Giardin. *The Journal of Cell Biology*; (109): 2323-2335.
- Pegado MG y de Souza W. 1994. Role of surface components in the process of interaction of *Giardia duodenalis* with epithelial cells in vitro. *Parasitology Research*; 80(4): 320-326.
- Peirasmaki D, Ma'ayeh SY, Xu FF, Ferella M, Campos S, Liu J y Svård SG. 2020. High Cystine Membrane Proteins (HCMP) are up-regulated during *Giardia*-host cells interactions. *Frontiers Genetic*; 11: 913.
- Pérez G, Vittori D, Pregi N, Garbossa G y Nesse A. 2005. Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*; 39(3): 301-314.
- Piccinelli P y Samuelsson T. 2007. Evolution of the iron-responsive element. *RNA Society*; (13):952-966.

- Plata-Guzmán LY. 2015. Efecto del hierro sobre el crecimiento de *Giardia duodenalis*, evidencias del mecanismo de regulación. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Ponka P, Beaumont C y Richardson DR. 1998. Function y regulation of transferring y ferritin. *Seminars in Hematology*; (35):135-154.
- Prucca CG y Lujan HD. 2009. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cellular Microbiology*; 11: 1706-1715.
- Pyrih J, Harant K, Martincova E, Sutak R, Lesuisse E, Hrdy I y Tachezy J. 2014. *Giardia intestinalis* incorporates heme into cytosolic cytochrome b(5). *Eukaryotic Cell*; 13: 231e239.
- Que X, Svard S, Meng T-C, Hetsko M, Aley S y Gillin F. 1996. Developmentally regulated transcripts y evidence of differential mRNA processing in *Giardia lamblia*. *Molecular y Biochemical Parasitology*; (81):101-110.
- Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, Goldman ID. 2006. Identification of an intestinal folate transporter y the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *The Journal Cell*; 127(5): 917-28.
- Rafferty SP y Dayer G. 2015. Heme proteins of *Giardia intestinalis*. *Experimental Parasitology*; 159: 13-23.
- Rafferty S, Luu B, March RE y Yee J. 2010. *Giardia lamblia* encodes a functional flavohemoglobin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 399, 347e351.
- Rana SV, Bhasin DK, Vinayak VK. 2005. Lactose hydrogen breathe test in *Giardia lamblia* positive patients. *Digestive Diseases and Sciences*; 50: 259–261.
- Rascón Jr AA y McKerrow JH. 2013. Synthetic y Natural Protease Inhibitors Provide Insights into Parasite Development, Virulence y Pathogenesis. *Current Medical Chemistry*; (20): 3078-3102.

- Ringqvist E, Palm JE, Skarin H, Hehl AB, Weily M, Davids BJ, Reiner DS, Griffiths WJ, Eckmann L, Gillin FD y Svard SG. 2008. Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Molecular y Biochemical Parasitology*; 159(2): 85-91.
- Rivera M, de la Parte M, Hurtado P, Magaldi L y Collazo M. 2002. Giardiasis intestinal. Mini-Revisión. *Investigación Clínica*; 43(2): 119-128
- Rodríguez-Fuentes GB, Cedillo-Rivera R, Fonseca-Liñán R, Argüello-García R, Muñoz O, Ortega-Pierres G y Yépez-Mulia L. 2006. *Giardia duodenalis*: analysis of secreted proteases upon trophozoite-epithelial cell interaction in vitro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 101(6):693-696.
- Rouault TA. 2006. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nature Chemical Biology*; 2: 406-414.
- Rouault T y Harford JB. 2000. Translational Control of ferritin synthesis. In translational control of gene expression. *Cold Spring Harbor Laboratory*; (4): 655-670.
- Roxström-Lindquist K, Ringqvist E, Palm D y Svärd S. 2005. *Giardia lamblia*-induced changes in gene expression in differentiated Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*; 73(12): 8204-8.
- Sánchez-Cruz C, López-Casamichana M, Cruz-Castañeda A y Olivares-Trejo JJ. 2011. Transferrin regulates mRNA levels of gene involved in iron utilization in *Entamoeba histolytica*. *Molecular Biology*; 39: 4545-51.
- Sánchez-Vega JT, Tay-Zavala J, Robert-Guerrero L, Romero-Cabello R, Ruíz-Sánchez D y Rivas-García C. 2000. Frecuencia de parasitosis intestinales en asentamientos humanos irregulares. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 43(3): 80-83.
- Said DE, Elsamad LM y Gohar YM. 2012. Validity of silver, chitosan, y curcumin nanoparticles as anti-*Giardia* agents. *Parasitol Research*; 111(2): 545-554.
- Saleh A. 2010. Manifestaciones cutáneas de la giardiasis, un problema de salud sobredimensionado. Tesis Doctoral, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí.

- Shant J, Ghosh S, Bhattacharyya S, Ganguly NK y Majumdar S. 2004. The alteration in signal transduction parameters induced by the excretory product from *Giardia lamblia*. *Parasitology*; 129(Pt 4):421-30.
- Scott KG, Yu LC y Buret AG. 2004. Role of CD8+ y CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infection y Immunity*; 72(6):3536-42.
- Shiflett AM y Johnson PJ. 2010. Mitochondrion-related organelles in eukaryotic protists. *Annual Review of Microbiology*; 64: 409-29.
- Simpson AG, Roger AJ, Silberman JD, Leipe DD, Edqcomb VP, Jerminn LS, Patterson DJ, Sogin ML. 2002. Evolutionary history of ‘early-diverging’ eukaryotes: the excavate taxon *Carpediemonas* is a close relative of *Giardia*. *Molecular Biology and Evolution*; 19: 1782–1791.
- Singer, SM, Angelova VV, DeLeon H y Miskovsky E. 2020. What's eating you? An update on *Giardia*, the microbiome and the immune response. *Current Opinion in Microbiology*; 58: 87-92.
- Singer SM, Elmendorf HG, Conrad JT y Nash TE. 2001. Biological Selection of Variant-Specific Surface Proteins in *Giardia lamblia*. *The Journal of Infectious Diseases*; 183: 119–24
- Smith HV, Caccio SM, Tait A, McLauchlin J y Thompson RC. 2006. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends Parasitology Journal*; 22:160–167.
- Solano-González E, Burrola-Barraza V, León-Sicairos CR, Ávila-González L, Gutiérrez-Escolano L, Ortega-López J y Arroyo R. 2007. The trichomonad cysteine proteinase *TVCP4* transcript contains an iron responsive element. *FEBS letters*; 581; (16):2919-2928.
- Soto-Castro L, Plata-Guzmán LY, Figueroa-Angulo EE, Calla-Choque JS, Reyes-López M, De la Garza M, León-Sicairos N, Garzón-Tiznado JA, Arroyo R y León-

- Sicairos CR. 2019. Iron Responsive-like Elements in the parasite *Entamoeba histolytica*. *Microbiology*; 165: 366.
- Suchan P, Vyoral D, Petrak J, Sutak R, Rasoloson D, Noynkova E, Dolezal P y Tachezy J. 2003. Incorporation of iron into *Trichomonas foetus* cell compartments reveals ferredoxin as a major iron-binding protein in hydrogenosomes. *Microbiology*; (149):1911-1921.
- SSA (Secretaría de Salud). 2025. Notificación Mensual Casos Nuevos de giardiasis. Disponible en web <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/>.
- Swenson GR y Walden WE. 1994. Localization of an RNA binding element of the iron responsive element binding protein within a proteolytic fragment containing iron coordination ligands. *Nucleic Acids Research*; 22, 2627.
- Tachezy J, Sánchez LB y Müller M. 2001. Mitochondrial Type Iron-Sulfur Cluster Assembly in the Amitochondriate Eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the Phylogen of IscS. *Molecular Biology and Evolution*; 18(10): 1919-1928.
- Tandara L y Salamunic I. 2012. Iron metabolism: current facts y future directions. *Biochemical Medicine*; 22(3): 311-28.
- Tasca T, Bonan CD, De Carli GA, Sarkis JJ y Alderete JF. 2005. Heterogeneity in extracellular nucleotide hydrolysis among clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*; 131(1):71-8.
- Tay-Zavala J. 2010. Parasitología Médica de Tay. 8 a ed. México. Mendez Editores.
- Tejman-Yarden N, Miyamoto Y, Leitsch D, Santini J, Debnath A, Gut J, Mckerrow JH, Reed SL y Eckmann L. 2013. A reprofiled drug, auranofin, is effective against metronidazole-resistant *Giardia lamblia*. *Journals American Society for Microbiology* 57(5): 2029-35.
- Thompson RCA. 2008. Giardiasis: Conceptos modernos sobre su control y tratamiento. *Annales Nestlé*; 66: 23-29. DOI:10.1159/000151270.

- Thompson RCA y Monis PT. 2004. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Advances in Parasitology*; 58: 69–137.
- Tolba MEM, Kobayashi S, Imada M, Suzuki Y y Sugano S. 2013. *Giardia lamblia* Transcriptome Analysis Using TSS-Seq y RNA-Seq. *PLoS ONE*; 8(10): e76184. doi:10.1371/journal.pone.0076184
- Torres-Romero JC y Arroyo R. 2009. Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: Evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE-IRP-like system. *Infection, Genetics y Evolution*; (602): 1-10.
- Touz MC, Nores MJ, Slavin I, Piacenza L, Acosta D, Carmona C y Lujan HD. 2002. Membrane-associated dipeptidyl peptidase IV is involved in encystation specific gene expresión during *Giardia* differentiation. *Biochemical Journal*; 364(Pt 3): 703-710.
- Tovar J, León-Avila G, Sánchez LB, Sutak R, Tachezy J, Van der Giezen M, Hernández M, Muller M y Lucocq JM. 2003. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*; 426(6963): 172-6.
- Townson SM, Upcroft JA y Upcroft P. 1996. Characterization y purification of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. *Molecular y Biochemical Parasitology*; Volume 79, Issue 2: 183-193.
- Traub RJ, Monis PT y Robertson ID. 2005. Molecular epidemiology: a multidisciplinary approach to understanding parasitic zoonoses. *International Journal Parasitology*; 35: 1295–1308.
- Troeger H, Eppe HJ, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard GD, Jelinek T, Zeitz M, Fromm M y Schulzke JD. 2007. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport y barrier function in human duodenum. *Gut*; 56(3):328-35.
- Uribarren, B.T. 2015. Giardiasis o Giardiosis. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/giardiasis.html> .

- Uribarren-Berrueta T. 2014. Giardiasis o giardiosis. UNAM, Facultad de Medicina; Departamento de Microbiología y Parasitología. Disponible en Web:<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/giardiasis.html>
- Vanacova S, Liston R, Tachezy J y Johson P. 2003. Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*. *International Journal for Parasitology*; (33):235-255.
- Vázquez-Tsuji O y Campos-Rivera T. 2009. Giardiasis la parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Revista del Centro de Investigación* 8(31): 75-90.
- Veenemans J, Mank T, Ottenhof, Baidjoe A, Mbugi EV, Demir AY, Wielders JP, Savelkoul hf, Verhoef H. 2011. Protection against diarrhea associated with *Giardia intestinalis* Is lost with multi-nutrient supplementation: a study in Tanzanian children. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 5 (6): e1158.
- Vila J, Álvarez-Martínez MJ, Buesa J, Castillo J. 2009. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*; 27: 406-411.
- Volz K. 2008. The functional duality of iron regulatory protein 1. *Current Opinion in Structural Biology*; 18: 106–111.
- Volz K. 2021. Conservation in the Iron Responsive Element Family. *Genes*; 12:1365. <https://doi.org/10.3390/genes12091365>.
- Watkins RR y Eckmann L. 2014. Treatment of giardiasis: current status and future directions. *Current Infectious Disease Reports*; 16(2): 396.
- Weiland ME, Palm JE, Griffiths WJ, McCaffery JM, Svärd SG. 2003. Characterisation of alpha-1 giardin: an immunodominant *Giardia lamblia* annexin with glycosaminoglycan-binding activity. *International Journal for Parasitology*; 33 (12): 1341-51.

- Wilkinson N y Pantopoulos K. 2014. The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. *Frontiers in Pharmacology*; 28(5): 176.
- Wilson BR, Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K y Tsuji Y. 2016. Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. *Trends Molecular Medicine*; 22(12): 1077-1090.
- Williams AG y Coombs GH. 1995. Multiple protease activities in *Giardia intestinalis* trophozoites. *International Journal for Parasitology*; 25(7): 771-778.
- Xu F, Jex A y Svârd SG. 2020. A chromosome-scale reference genome for *Giardia intestinalis* WB. *Science*; 4:38.
- Yaoyu F y Xiao L. 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*; 24: 110–140.
- Yichoy M, Duarte TT, De Chatterjee A, Mendez TL, Aguilera KY, Roy D, Roychowdhury S, Aley SB y Das S. 2011. Lipid metabolism in *Giardia*: a post-genomic perspective. *Parasitology*; 138(3): 267-78.
- Yoshida N, Tyler KM y Llewellyn MS. 2011. Invasión mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends in Parasitology*; 27(10): 459-66.
- Zahedi A, Monis P, Deere D y Ryan U. 2021. Wastewater-based epidemiology-surveillance and early detection of waterborne pathogens with a focus on SARS-CoV-2, *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Parasitology Research*; 120(12): 4167-4188. doi: 10.1007/s00436-020-07023-5.
- Zuker M. 2003. Mfold web Server for nucleic acid holding y hibridization prediction. *Nucleic Acids Research*; 31(13): 3406-3415.

XI ABREVIATURAS

A: adenina

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

APS: persulfato de amonio

C: citosina

°C: grados centígrados

DNA: ácido desoxirribonucleico

G: guanina

h: hora

H₂O: agua

HCl: ácido clorhídrico

IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopitanósido

IRE: elementos de respuesta al hierro

IRP: proteínas reguladoras por hierro

M: molar

Mbp: mega pares de bases

min: minutos

mL: mililitros

mM: milimolar

μL: microlitros

nt: nucleótidos

pb: par de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pH: potencial de hidrógeno

PBS: solución amortiguadora de fosfatos

RNA_m: ácido ribonucleico mensajero

rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

TBE: solución amortiguadora de Tris, borato y EDTA

UTR: región no codificante

UV: ultravioleta

V: voltios

XII ANEXOS

A. Artículos Científicos

1. Stem-Loop Structures in Iron-Regulated mRNAs of *Giardia duodenalis*



Communication

Stem-Loop Structures in Iron-Regulated mRNAs of *Giardia duodenalis*

Laura Y. Plata-Guzmán ¹, Rossana Arroyo ², Nidia León-Sicaïros ^{3,4}, Adrián Canizález-Román ³, Héctor S. López-Moreno ¹, Jeanett Chávez-Ontiveros ¹, José A. Garzón-Tiznado ¹ and Claudia León-Sicaïros ^{1,*}

- ¹ Programa Regional del Noroeste para el Posgrado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Av. de las Américas y Josefa Ortiz (Cd. Universitaria), Culiacán 80030, Mexico
 - ² Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), Av. IPN No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, Mexico City 07360, Mexico
 - ³ CIASaP Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Sinaloa, Cedros y Sauces Frac. Fresnos, Culiacán 80246, Mexico
 - ⁴ Departamento de Investigación, Hospital Pediátrico de Sinaloa, Boulevard Constitución S/N, Col. Jorge Almada, Culiacán 80200, Mexico
- * Correspondence: claudialeonsicaïros@uas.edu.mx

Abstract: *Giardia duodenalis* is a significant cause of waterborne and foodborne infections, day-care center outbreaks, and traveler's diarrhea worldwide. In protozoa such as *Trichomonas vaginalis* and *Entamoeba histolytica*, iron affects the growth, pathogenicity mechanisms, and expression of virulence genes. One of the proposed iron regulatory mechanisms is at the post-transcriptional level through an IRE/IRP-like (iron responsive element/iron regulatory protein) system. Recently, the expression of many putative giardial virulence factors in the free-iron levels has been reported in subsequent RNAseq experiments; however, the iron regulatory mechanism remains unknown. Thus, this work aimed to determine the effects of iron on the growth, gene expression, and presence of IRE-like structures in *G. duodenalis*. First, the parasite's growth kinetics at different iron concentrations were studied, and the cell viability was determined. It was observed that the parasite can adapt to an iron range from 7.7 to 500 µM; however, in conditions without iron, it is unable to survive in the culture medium. Additionally, the iron modulation of three genes was determined by RT-PCR assays. The results suggested that *Actin*, *glucosamine-6-phosphate deaminase*, and *cytochrome b5* mRNA were down-regulated by iron. To investigate the presence of IRE-like structures, in silico analyses were performed for different mRNAs from the Giardia genome database. The Zuker mfold v2.4 web server and theoretical analysis were used to predict the secondary structures of the 91 mRNAs analyzed. Interestingly, the iron-induced downregulation of the genes analyzed corresponds to the location of the stem-loop structures found in their UTR regions. In conclusion, iron modulates the growth and expression of specific genes, likely due to the presence of IRE-like structures in *G. duodenalis* mRNAs.

Keywords: *Giardia duodenalis*; foodborne disease; giardiasis etiology; anemia comorbidities; iron regulation; IREs



Citation: Plata-Guzmán, L.Y.; Arroyo, R.; León-Sicaïros, N.; Canizález-Román, A.; López-Moreno, H.S.; Chávez-Ontiveros, J.; Garzón-Tiznado, J.A.; León-Sicaïros, C. Stem-Loop Structures in Iron-Regulated mRNAs of *Giardia duodenalis*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2023**, *20*, 3556. <https://doi.org/10.3390/ijerph20043556>

Academic Editor: Timothy J. Wade

Received: 30 November 2022
Revised: 10 February 2023
Accepted: 15 February 2023
Published: 17 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Giardia duodenalis is the etiologic agent of giardiasis, one of the most common causes of waterborne and foodborne infections, which is characterized by extensive diarrhea [1]. Approximately 200 million people are infected with *G. duodenalis* annually, mainly in Latin America, Asia, and Africa [2,3]. *G. duodenalis* is of biological interest since this parasite occupies a key point of the evolutionary transition between prokaryotes and eukaryotes. It has similar properties to prokaryotic cells, such as a lack of mitochondria and peroxisomes as well as bacterial-type metabolic enzymes. However, it belongs to the first-known divergent eukaryotic lineage [4–6]. Moreover, in *G. duodenalis*, the great

need for iron is reflected in the anemia it causes, especially in children with giardiasis [7]. After treatment with metronidazole, an increase in hemoglobin in the cured children's blood is observed [8,9]. The likelihood of giardiasis occurring is higher in malnourished individuals [7,10]. Thus, iron could play a key role in *Giardia* virulence [8–11]. Despite this, there are almost no studies regarding the effect of iron on the growth, gene expression, or regulatory mechanisms in *Giardia*. Recently, Peirasmaki et al. (2020) [12] reported on the expression of many putative giardial virulence factors in free-iron levels detected by RNAseq experiments [12]; however, the iron regulatory mechanism remains unknown.

Iron is an essential element for all living organisms. Because both a deficiency in and surplus of iron are harmful, the absorption, concentration, and redox status should be carefully regulated [13–16]. The post-transcriptional regulation carried out by the IRE/IRP system is the most studied iron regulatory mechanism in mammalian cells. This mechanism consists of cytoplasmic iron regulatory proteins (IRPs) that interact with iron-responsive elements (IREs), which are conserved stem-loop structures found in untranslated regions (UTRs) of the mRNA-encoding proteins related to iron homeostasis [13–16]. In protozoans such as *T. vaginalis* and *E. histolytica*, iron affects growth and pathogenicity mechanisms [17–21], as well as the expression of some mRNA-encoding virulence proteins [18,22–26]. In *T. vaginalis*, the presence of IRE-like structures in *tvcp4* and *tvcp12* mRNAs that are differentially regulated by iron at the post-transcriptional level [23,27,28], as well as the presence of a 135 kDa α -actinin that behaves similarly to an RNA-binding protein under iron-restricted conditions and binds to these structures, have been reported [29].

However, in *G. duodenalis*, the presence of IRE-like structures in some of its mRNAs has not been reported. Infection with *G. duodenalis* is closely related to malnutrition in children, reflecting the clinical importance of the need for iron in the case of being infected with this parasite. Despite this, studies related to the effect of iron on the growth or pathogenicity of the parasite or the modulation of the gene expression under different iron concentrations have not been reported regarding this parasite. Thus, this work aimed to determine the effect of iron on parasite growth and gene expression and to search for the presence of IRE-like structures through an in silico analysis of *Giardia* mRNAs. The results suggest that iron modulates the growth and expression of specific genes, likely due to the presence of IRE-like structures in *G. duodenalis* mRNAs. This study on the effect of iron on the regulatory system in *G. duodenalis* aims to help us understand the evolutionary process of iron regulation and the biology of the parasite.

2. Materials and Methods

2.1. Parasite Cultures

The WB isolate of *G. duodenalis* was axenically grown in TYI-S-33 medium enriched with 10% fetal bovine serum (Gibco, Thermofisher, Lifetechnologies Corporation, Grans Island, NY, USA), 1 g/L bile (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pH 7.0, and 50 μ g/mL gentamicin and filtered through 0.45 μ m membrane (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Carrigtwohill, Co. Cork, IRL). The trophozoites of *Giardia* were harvested at 4 °C and centrifuged at 432 sp. gr. for 5 min [30]. Then, the supernatant was decanted; the pellet was resuspended in 1.5 mL of bovine fetal serum, homogenized and resuspended in 13.5 mL of a new culture medium, and incubated at 37 °C for 24 h [31]. To obtain high iron condition (HI) parasite cultures, 200, 300, and 500 μ M of ferrous ammonium citrate (Sigma-Aldrich) were added to the medium, or Chelex-100 resin (BioRad, Hercules, CA, USA) was added to obtain an iron-restricted (IR) parasite culture (7.7 μ M final concentration) [26,30,31]. The parasites were treated with 0.5 g/100 mL Chelex-100 and sterilized after the removal of the resin by filtration. The final concentration of iron in the cultures was measured by a spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

2.2. Iron Effect on the *G. duodenalis* Growth

To analyze the effect of iron on the *G. duodenalis* growth, the culture medium TYI-S-33 was obtained under normal iron conditions (NI, 100 μ M), as described above [30,31]. To

perform the growth kinetics, 5.0×10^6 trophozoites grown under NI conditions were inoculated in different iron conditions (0, HI, and IR) and incubated up to 120 h at 37 °C. Then, the cultures in the different iron conditions were centrifuged at 432 sp. gr. at 4 °C for 5 min. The pellet was washed with $1 \times$ PBS and homogenized, and the parasites were counted in the Neubauer chamber. The viability of *G. duodenalis* was evaluated by the trypan blue method in an inverted microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2.3. Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) Assays

The total RNA from 2×10^7 parasites grown in IR (7.7 μ M) and HI (300 μ M) conditions was obtained using the TRIzol reagent (Sigma-Aldrich). For RT-PCR assays, RNA treated with DNase I to remove contaminating DNA was reverse-transcribed using AMV (Avian Myeloblastosis Virus, MI, USA) reverse transcriptase and an oligo (dT) primer (Thermo Scientific). Primers for amplifying *Actin*, *cytochrome b5*, and *glucosamine-6-phosphate deaminase* mRNA fragments were designed using Oligo 7.2 Software (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO, USA), according to the published sequence in the database of the *G. duodenalis* genome [30,31] (ID GL50803_40817, ID GL50803_9089, and GL50803_114625, respectively). The primers were used to amplify a 296 bp fragment of the *Actin* gene (5'-GAGAAAAGATTGCGCAGA-3' forward and 5'-CTCTTTTATATCACGCAC-3' reverse), a 419 bp fragment of the *cytochrome b5* gene (5'-AATTTTAATGAGTGAACA-3' forward and 5'-ATTGTTTACTTCTCGCC-3' reverse), and a 350 bp fragment of the *glucosamine-6-phosphate deaminase* gene (5'-AGCAAGGTCAATATAAAG-3' forward and 5'-CCTCACACTTGCTCTCAC-3' reverse). A 507 bp amplicon of the *G. duodenalis* β -tubulin mRNA (5'-AGATCGTCCACATCCAGGCA-3' forward and 5'-CTTCGGGGACGGGACGACGG-3' reverse) was used as an internal control. The PCR conditions for *Actin* were 28 cycles of 94 °C for 45 s, 47.7 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, followed by a final extension step of a single cycle at 72 °C for 5 min. The PCR conditions for *cytochrome b5* were 28 cycles of 94 °C for 45 s, 50.6 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, followed by a final extension step of a single cycle at 72 °C for 5 min. The PCR conditions for *glucosamine-6-phosphate deaminase* were 26 cycles of 94 °C for 45 s, 47.8 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, followed by a final extension step of a single cycle at 72 °C for 5 min. The amplicons were analyzed on a 1% agarose gel with gel red staining (Biotium, Fremont, CA, USA). A densitometric analysis using a GelDoc (Bio-Rad) and Quantity One-4.6.3 1-D Analysis Software (BioLinx labsystems, Mahape, Navi Mumbai, India) was performed. The values for β -tubulin expression were used to normalize the results of the *Actin*, *cytochrome b5*, and *glucosamine 6 phosphate deaminase* mRNAs expression under both iron conditions tested [26].

2.4. Prediction of Stem-Loop Structures in *G. duodenalis* mRNAs

To obtain the sequences that encode the virulence, cytoskeleton, ribosomal, and metabolic proteins, we used the database of the *G. duodenalis* genome (<http://dgiardiadb.org/giardiadb/>, accessed on 18 July 2021) [32,33]. The ends of the sequences were delineated in the following manner. The 5'-UTR region was described according to the Knodler and Elmendorf reports [34,35]. These authors propose A/T-rich regions as a transcription initiator. An A in the middle of the A/T-rich sequence could be the best transcription start site [36]. In the 3'-UTR region, the polyA AGTPuAA consensus signal was searched [37], which is slightly degenerated in positions 1, 2, and 3, as well as the ATGGAA signal located 9–13 bp upstream from where polyadenylation is carried out [38]. In addition, the reported motifs, as putative polyadenylation signals (AGUGAA, GUGAAC, of which AGUGAA is the most common motif identified in *G. duodenalis*), were searched according to Franzen et al., 2013 [39]. Once the sequences were delineated, the secondary structures were analyzed by the Zuker mfold program (<http://www.unafold.org/mfold/applications/rna-folding-form.php>, accessed on 20 July 2021) [40].

3. Results

3.1. Iron Affects the Growth and Viability of *G. duodenalis*

To elucidate the effect of iron on the growth of *G. duodenalis*, the growth kinetics were determined at different iron culture concentrations (0, 7.7, 100, 200, 300, and 500 μM) for up to 120 h at 37 $^{\circ}\text{C}$; the number, viability, and morphology of the parasites were evaluated using an inverted microscope (Leica). After 24 h (t_1), the number of parasites was 7.6×10^6 trophozoites under IR (7.7 μM), 8.2×10^6 trophozoites in NI (100 μM), 7.2×10^6 , 7.1×10^6 , and 7.2×10^6 trophozoites under HI (200, 300, and 500 μM of iron), and 7.5×10^4 trophozoites in the control culture without iron. When the incubation time was extended ($t_2 = 48$ h), the number of parasites increased, meaning that there was a greater number of parasites under IR conditions than there was under HI conditions. The parasite number reached its maximum value after being cultured for 72 h: 16.6×10^6 trophozoites under IR (7.7 μM); 22.1×10^6 trophozoites in NI (100 μM); and 15.9×10^6 , 19.5×10^6 , and 17.2×10^6 trophozoites under HI (200, 300, and 500 μM of iron). However, after 96 h and 120 h, the number of parasites decreased in all iron conditions, possibly suggesting that the parasite can adapt to different iron conditions. Thus, in the absence of iron, a drastic reduction in parasite growth was observed in the 7.7 to 100 μM range (Figure 1), suggesting that iron is an important element for the growth of *G. duodenalis* trophozoites. However, the parasite can adapt to different iron concentrations from 7.7 up to 500 μM (Figure 1).

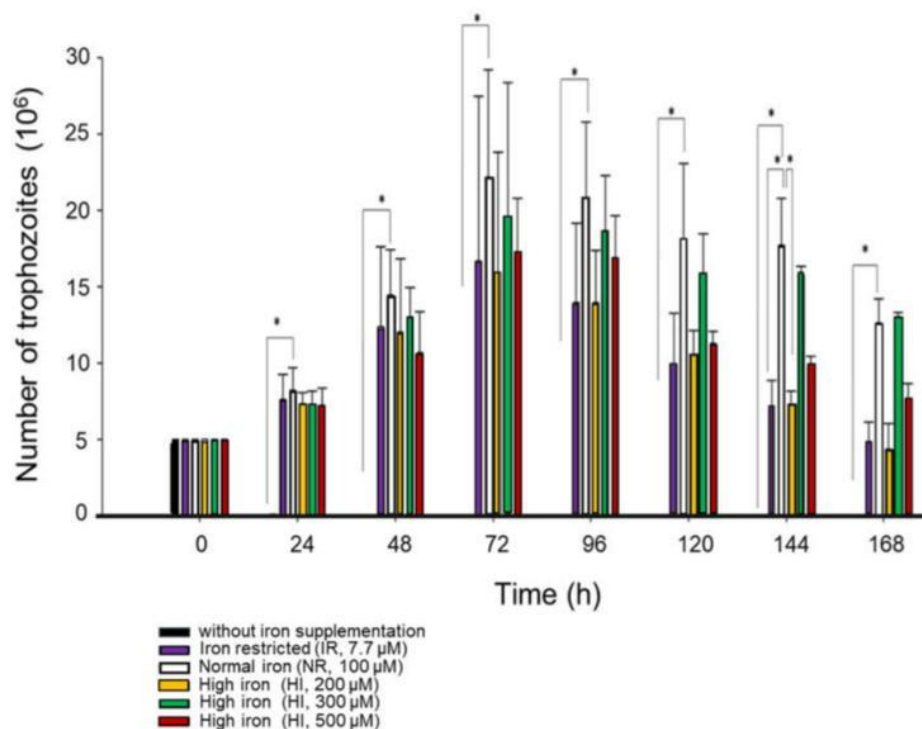


Figure 1. Iron's effect on the growth and viability of *G. duodenalis*. The culture was initiated by inoculating 5×10^6 trophozoites into 15 mL of culture media. As indicated, the *Giardia* growth was measured when grown in the medium supplemented with different iron concentrations. Experiments were performed in triplicate. Statistical significance is indicated with an asterisk.

3.2. Actin-Related Protein, Cytochrome b5, and Glucosamine-6-Phosphate Deaminase Are Differentially Modulated by Iron

To investigate whether iron affects *G. duodenalis* virulence genes, as has been reported in *E. histolytica* and *T. vaginalis* [18,21,23,26], we performed semiquantitative RT-PCR assays of *Actin*, *cytochrome b5*, and *glucosamine-6-phosphate deaminase* to demonstrate iron regulation. All three genes were negatively regulated by iron, showing overexpression under IR conditions (Figure 2A–F). The expression of these three genes was similar to that of the *E. histolytica* *Ehhmbp26* gene [24], whose RNA sequence formed two IRE-like hairpins at both UTRs. However, the IRE-like structure at the 3' UTR appeared to be more stable [26]. Thus, we hypothesize that these giardial iron-downregulated genes have stem-loop structures in the mRNA of their UTRs.

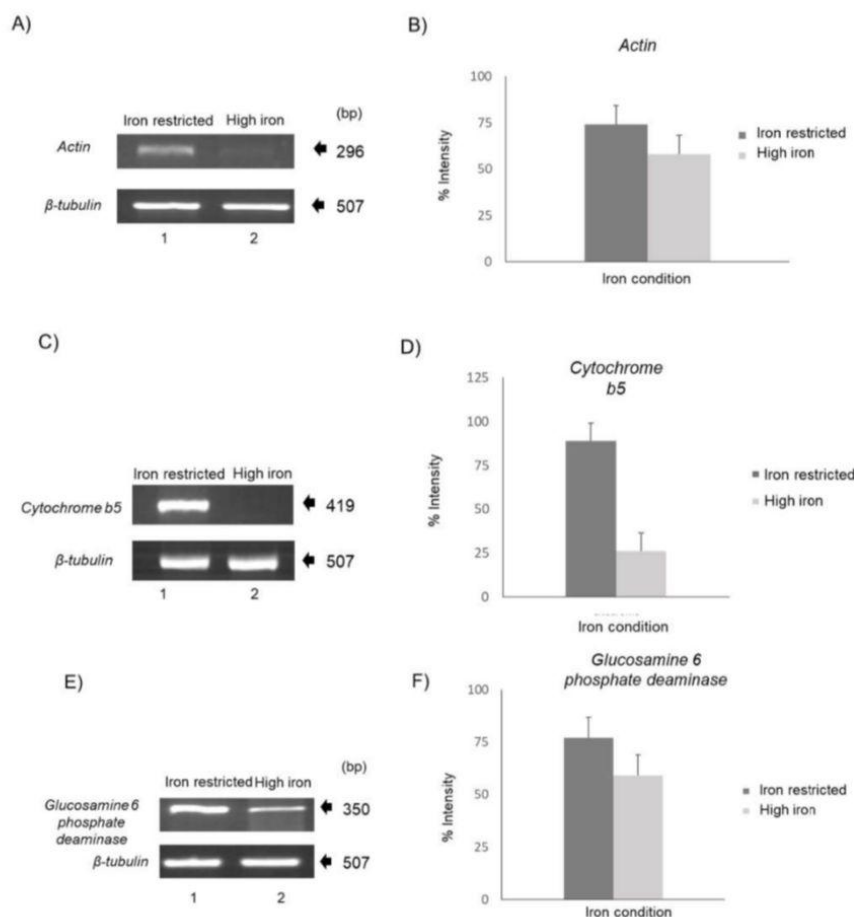


Figure 2. Iron conditions differentially modulate *Actin*, *Cytochrome b5*, and *Glucosamine 6 phosphate deaminase*. (A) Semiquantitative RT-PCR assays with *Actin* gene-specific primers using cDNA from parasites grown under iron-restricted (7.7 mM; lane 1) and high-iron (300 mM; lane 2) conditions. The β -tubulin gene was used as an internal control. The sizes of the amplicons are given in bp. (B) Densitometric analysis using a GelDoc (BioRad) with Quantity One-4.6.3 1-D Analysis Software.

(C) Semiquantitative RT-PCR assays with specific primers for the *Cytochrome b5* gene using cDNA from parasites grown under iron-restricted (7.7 mM; lane 1) and high-iron (300 mM; lane 2) conditions. The β -tubulin gene was used as an internal control. The sizes of the amplicons are given in bp. (D) Densitometric analysis using a GelDoc (BioRad) with Quantity One-4.6.3 1-D Analysis Software. (E) Semiquantitative RT-PCR assays with specific primers for *Glucosamine-6-phosphate deaminase* using cDNA from parasites grown under iron-restricted (7.7 mM; lane 1) and high-iron (300 mM; lane 2) conditions. The β -tubulin gene was used as an internal control. The sizes of the amplicons are given in bp. (F) Densitometric analysis was performed using a GelDoc (BioRad) with Quantity One-4.6.3 1-D Analysis Software. Values of β -tubulin expression were used to normalize the results of *Actin*, *Cytochrome b5*, and *Glucosamine-6-phosphate deaminase* mRNA expression under both iron conditions. Experiments were performed in triplicate.

3.3. Presence of Stem–Loop Structures in *G. duodenalis* mRNAs

To search for the mRNA-stem–loop elements involved in iron regulation, we performed a bioinformatic analysis of the *Giardia* genome sequence, selecting various virulence, ribosomal, cytoskeleton, and metabolic enzyme mRNAs. First, the untranslated regions were identified and delineated, as has been reported [30–40]. *Giardia* genes have a short 6 nt sequence at the 5' UTR mRNA that can act as a ribosomal anchoring site for protein synthesis [41]. The promoter regions of this parasite appear to be very compact, and the intergenic regions are very short (sometimes less than 250 bp). This parasite contains short (1–6 nt) UTR regions. However, these regions have the elements required for transcriptional regulation—specifically, an A/T-rich region. The initiator element of this parasite consists of 8–11 nt (position –30 in ATTAAAA) [34–39,42] with its variants. An A in the middle of the A/T-rich sequence could be the best transcription initiation site [34]. Holberton and Marshall [42] suggested that the transcription initiation site sequence is composed of nine bases (AATTAAAA) and is associated with other sequences, such as the CAATT promoter.

In addition, a potential polyadenylation signal 20–30 nt downstream from the stop codon (AGTPuApy) has been reported [38]. In the 3' UTR signal, the consensus polyA AGTPuAA [33] has been found and is slightly degenerated in positions one, two, and three; an ATGGAA signal located 9–13 nt upstream from the polyadenylation site has also been detected [36]. In addition, Franzen et al. (2013) reported putative polyadenylation signals as motifs of AGUGAA and GUGAAC, of which AGUGAA is the most common motif identified in *G. duodenalis* [39]. The tetranucleotide sequence UAAA has been shared by several motifs as part of the canonical eukaryotic polyadenylation signal (AAUAAA), suggesting that *G. duodenalis* polyadenylation signals may be more similar to the canonical eukaryotic AAUAAA than had been previously recognized. Moreover, in that study, a subset of genes was missing any clear motif, suggesting that a strict polyadenylation may not be required for proper 3' end formation, which occurs in higher eukaryotes (Franzen et al., 2013) [39]. According to previous reports, in this work, the 5' and 3' UTRs were delineated (Tables S1–S3, available in the online Supplementary Materials). Thereby, the delineated regions of the 5' and 3' UTRs were used to search for the formation of a stem–loop structure using Zuker mfold v2.4 webserver [40]. In this analysis, 91 sequences formed hairpin IRE-like secondary structures. Interestingly, 38 of the 91 mRNAs showed stem–loop structures at both the 5' and 3' UTRs in all of the analyzed groups. However, we observed increased stability for one of the two structures formed in one of the UTRs for each mRNA. This stability is based on dG and the presence of reported motifs (a reduction in dG (negative dG) is a necessary condition for the spontaneity of the structure's formation) [40].

As expected, the three genes downregulated by iron, *actin-related protein* (GL50803_40817), *cytochrome b5* (GL50803_9089), and *glucosamine-6-phosphate deaminase* (GL50803_10839), formed two IRE-like structures at both UTRs, including the coding region, as was reported for the *tvcp4*-IRE, *Actin*-IRE, and *Ehmbp26*-IRE of *E. histolytica* [23,26]. In the loop, the 3' end of *Actin*-IRE possesses an atypical sequence compared to the human consensus sequence [39], and U-A residues were conserved in the upper stem [42]. Additionally, the

3' ends of cytochrome b5-IRE and glucosamine-6-phosphate deaminase-IRE have an unpaired nucleotide in the stem and the AUU motif in the loop, which is similar to the GUU-specific motif of protozoan parasites [27] (Figure 3). Only ten sequences shared similarity with the conserved human loop (CAGUGN) [42], corresponding to an Actin-related protein (at the 3' coding region (CR) and the UTR) and the outer mitochondrial membrane of cytochrome b5 (GL50803_9089, at the 5' CR), as well as to some sequences annotated as ribosomal proteins (Supplementary Figure S2). Most of the hairpin structures contain the A-U conserved nucleotides in the upper stem, and some stem-loops have residues at positions 1–5 that form a pseudotri-loop, as has been reported in higher eukaryotes [42–45]. Moreover, some sequences contain a motif similar to the *tcp4*-IRE (GGCACA), such as the precursor to cathepsin L (GL50803_9548) and the IRE-like structure at the 5' coding region [23]. Interestingly, the GUU loop motif, which was reported as a protozoa-specific IRE-like motif [27], was present in all of the analyzed groups (Figures 3 and S1–S4).

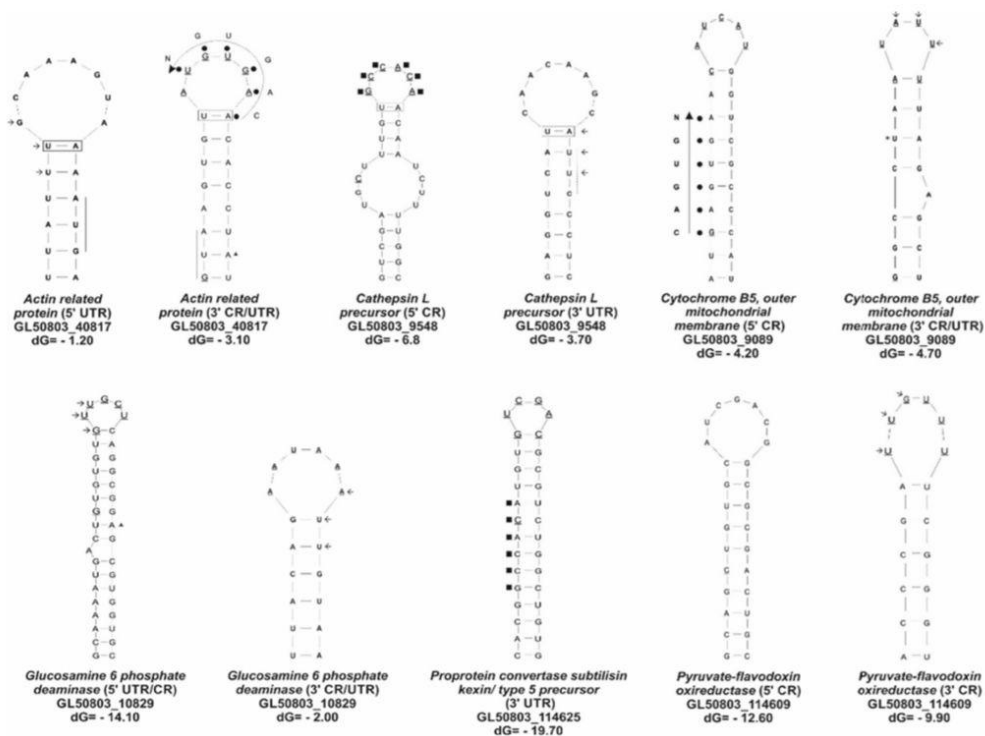


Figure 3. Prediction of stem-loop structures of *G. duodenalis* mRNAs coding for virulence, metabolism, and cytoskeleton proteins. The six nucleotides that form the apical loop of the canonical IREs are underlined. Nucleotides U-A/A-U in the rectangle indicate conserved nucleotides in the upper stem. Filled black circles indicate nucleotides similar to the CAGUGN consensus human motif, and a large or curved arrow indicates the 5' to 3' or 3' to 5' orientations of the sequence. The GUU/UUG protozoa-specific motif is indicated in small arrows. Asterisk: residue U conserved on canonical IREs. Small triangles show the residue A conserved in the protozoa-specific motif. Small squares indicate a similar motif to *tcp4*-IRE reported. dG, Gibbs free energy or free enthalpy; in this case, a reduction in dG (negative dG) is a necessary condition for the spontaneity of the structure formation.

Interestingly, two new motifs were also found in the giardial IRE-like structures: the CUU/AUU sequences that are present in 28 of the 91 mRNAs analyzed (Figures 3 and S1–S4), suggesting the presence of new motifs for this parasite or a new variant of the GUU loop motif, reported as a protozoa-specific motif [27]. However, some structures do not exhibit any of these motifs in the loop; these sequences were found in the stem's structure. Piccinelli and Samuelsson (2007) [46] conducted a bioinformatic analysis of mRNA sequences for more than 100 novel sequences—for instance, for ferritin, the transferrin receptor, mitochondrial aconitase, ferroportin, and DMT1 from different species. These sequences formed IRE-type structures; in the loop, they presented the CAGUGN sequence, and in some IREs, they presented a bulge with the UGC/C nucleotides in the stem with an unpaired cytosine. Despite the absence of the canonical CAGUGN sequences in the loop, in some IRE-like structures from *G. duodenalis* determined through our bioinformatic analysis, the UGC/C bulge was observed, such as in *Cathepsin L precursor* (5'CR) (GL50803_9548), *Dipeptidyl peptidase III* (5'UTR/CR) (GL50803_3822), and *Ribosomal protein L37* (3'CR/UTR) (GL50803_14171). In addition, in the stem of the sequences of the *Cathepsin B precursor* (5'CR) (GL50803_14019) and the *Cathepsin B precursor* (5'CR) (GL50803_16779), there is the CGC loop, which is similar to the UGC reported by Piccinelli and Samuelsson (2007) [46]. These data suggest that there are some UGC/C-like IREs in *Giardia*, which could represent an ancestral version of the ferritin IRE. It is possible that *G. duodenalis* contains different types of IRE-like structures in the primordia that evolved until they reached the canonical IRE sequence reported for the metazoans. In addition, an analysis in the SIREs web server was performed, and the results are in the Supplementary Materials (Table S5 and attached materials). Although not all of the stem-loop structures analyzed by Zucker showed the formation of IREs in the SIREs web server, some of them, such as *Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase* GL50803_114609, *Cathepsin L precursor* GL50803_3169, *Cathepsin L-like protease* GL50803_3099, *Hypothetical protein* GL50803_113303, *Ribosomal protein L7a* GL50803_17244, *Ribosomal protein L12* GL50803_14938, and *Actin-related protein* GL50803_8726, showed the formation of typical metazoan IREs (Figure 3, Table S5, attached materials). Thus, a giardial IRP-like or RNA-binding protein may recognize the sequence in the loop or the stem's structure. The data in this work show in silico evidence of cis-elements, such as IRE-like structures in the mRNA of *G. duodenalis* coding for various groups of proteins, including those involved in virulence.

4. Discussion

Iron is an essential cation for the growth of most microorganisms, including protozoan pathogens [47]. Some of them have developed hemoglobin-binding proteins, reductases, and transporters [47,48]. Iron is obtained from the direct lysis of host cells by protozoa. However, the acquisition of iron is regulated to avoid the toxicity induced by the formation of free radicals. For example, in *E. histolytica* and *T. vaginalis*, iron regulates many of the proteins involved in cytoadherence and cytotoxicity, other virulence factors, and the molecules involved in growth and the basal metabolism [17–26]. The recent observation of therapies against protozoan pathogens based on the combination of compounds is currently a very promising direction in the drug discovery field, and iron chelation is under study [47]. *Giardia's* great need for iron is reflected in the anemia, which it causes, especially in children with giardiasis [9], where, after treatment with metronidazole, there is an increase in hemoglobin in the blood [8–10]. However, there are few studies related to the effect of iron on the growth and virulence of this parasite. Recently, Peirasmaki et al. (2020) [12] reported on how iron caused a downregulation of a broad repertoire of genes in *Giardia* trophozoites during an interaction with IECs in vitro [12]; in this work, the analyzed transcripts were downregulated using a different metal ion chelator in the medium. In this work, additional assays were included to demonstrate how iron affects the growth and regulation of the gene expression in *G. duodenalis*. To determine the effect

of iron, growth kinetics were carried out at different iron concentrations. We observed a drastic reduction in the number of *Giardia* trophozoites without iron supplementation, which indicates that this parasite requires this metal in order to grow; this also occurs in other pathogens [18,21,26,28,47–49]. It would be interesting to study iron chelation as a chemotherapeutic alternative in *Giardia* growth under different iron conditions. In addition, it would be interesting to study the synergistic effect of lactoferrin, a molecule of the immune system, and iron as a therapy against giardiasis, since the effect of only lactoferrin as an anti-giardial has been demonstrated [50]. This possible synergistic effect is currently under study in our lab.

Moreover, our data suggest that *G. duodenalis* possibly uses different molecules to survive, depending on the iron conditions. This metal is fundamental for the duplication of the parasite, as suggested by the growth kinetics, where a marked reduction in the culture viability was observed when using chelating iron and not a cation source. Instead, by using a range of 7.7 to 500 μM of iron in the culture, we were able to observe that the parasite can adapt in a similar manner to what occurs in amoeba reports since, in a similar study carried out in *E. histolytica* [21], the growth of the amoebae did not differ among the low-iron (21.4 μM), normal iron (71.4 μM), and high-iron (285.6 μM) groups. In all three groups, the viability of the amoebae was higher than 80% after 72 h of culture. It is possible that iron differentially modulates virulence in *G. duodenalis*, as has been reported in *E. histolytica* [18,21,24–26] and *T. vaginalis* [17,19,20,22,23]. In this study, a marked decrease in parasite viability was observed over long periods of time in media under IR conditions, reflecting the parasite's need for iron to survive.

In addition, the negative iron modulation correlates with the location of the IRE-like structures in the 3' UTR of *Actin*, *glucosamine-6-phosphate deaminase*, and *cytochrome b5* mRNA using RT-PCR assays. Actin is necessary for the cell morphology, growth, and encystment of this parasite [51,52]. Another enzyme that participates in the encystment process of *Giardia* is *glucosamine-6-phosphate deaminase* [53]; it also has a specific function in the life cycle and metabolism of *G. duodenalis* [53,54]. The encystation process in *G. duodenalis* is triggered by environmental changes, such as cholesterol deprivation, the bile content, and pH value; however, the specific molecular mechanisms regulating cell differentiation remain unclear [55]. The results from this work suggest that iron conditions could be another environmental change that can participate in this complex mechanism. On the other hand, the results that suggest that *cytochrome b5* is negatively regulated by iron show the fundamental role of this protein in low-iron or iron-restricted conditions in obtaining the cation and surviving the hostile microenvironment [46,55,56]. Similar to the human transferrin receptor, cytochrome contains a stem-loop structure in its 3' UTR region; however, although it is a single structure and is not canonical, it could show an IRE-like function.

The analysis of these IRE-like structures showed that these mRNAs can form IRE-like structures at both UTRs. The parasite likely uses the IRE of the extreme that has a more negative dG in combination with the typical elements of the IREs which have already been reported [26,27,45]. These IRE-like structures showed that the GUU protozoa-specific motif reinforces what was previously reported for protozoan IREs [27], and some of them showed the formation of typical metazoan IREs, as determined by Zuker and the SIREs web program (Figures 3 and S1–S4) [27,45].

Due to the presence of an IRE-like structure at the 3' UTR of the mRNA and the negative iron regulation, the genes analyzed in this study could be regulated at the post-transcriptional level by an IRE/IRP system, which occurs with the transferrin receptor, which contains five IRE structures in the 3' UTR region. Thus, under IR conditions, an IRP-like protein can be attached to the stem-loop structures, providing stability to the mRNA and carrying out its translation. The fact that *G. duodenalis* regulates several genes

depending on the iron conditions may represent one of the most primitive IRE/IRP-like regulatory mechanisms in eukaryotes in its early stages of evolution. In addition, the data in this work show in silico evidence of cis-elements such as IRE-like structures in *G. duodenalis* mRNAs coding for various groups of proteins. On the other hand, we searched orthologous IRP-like proteins by conducting an in silico analysis of the proteome of *G. duodenalis*, using the human IRPs sequences as probes. The results showed that the GL50803_14790 sequence had an identity of 32% to IRP-1, which was annotated as a hypothetical protein in the giardial genome. However, no nucleic acid-binding domains were found by the in silico analysis. It is possible that this protein with a low homology and without nucleic acid-binding domains could not be the IRP-like protein in Giardia. Therefore, the identification of a possible IRP-like protein was carried out using Western blot assays, which suggests that there was mainly a recognition of a protein band in IR conditions by the anti-human IRP-1 antibody (Supplementary Figure S5); it is also possible that another protein of a different molecular size has an IRP-like function in giardia, perhaps a multifunctional protein, as occurs in *T. vaginalis* [28,29]. Thus, additional experiments are necessary to determine the mRNA stability and to identify the *G. duodenalis* RNA-binding protein which could interact with the IRE-like hairpin structures reported in this study. This mechanism could be used to regulate different genes using iron. In this case, it could be involved in the virulence to adapt to fluctuating changes in iron concentrations to those that are beyond those only involved during iron metabolism, as has been reported in higher eukaryotes, which represents a specialization of this type of iron homeostasis in this regulation system. Our results suggest that *G. duodenalis*, which is evolutionarily close to *E. histolytica* and *T. vaginalis*, could also have an IRE/IRP-like mechanism. Finally, the presence of this mechanism in *G. duodenalis* remains under study by our research group.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijerph20043556/s1>, Figure S1: Prediction of stem-loop structures of *G. duodenalis* mRNAs coding for virulence proteins; Figure S2: Prediction of stem-loop structures of *G. duodenalis* mRNAs coding for ribosomal proteins; Figure S3: Prediction of stem-loop structures of *G. duodenalis* mRNAs coding for cytoskeleton proteins; Figure S4: Prediction of stem-loop structures of *G. duodenalis* mRNAs coding for metabolic proteins. Figure S5: Immunodetection of a cytoplasmic protein in *G. duodenalis* by an anti-human IRP-1 antibody; Figure S6: Attached material showing the sequences of some mRNAs presented in our study and analyzed by SIREs web server; Table S1. Ends of sequences coding virulence proteins. Table S2. Ends of sequences coding ribosomal proteins. Table S3. Ends of sequences coding cytoskeleton proteins. Table S4. Ends of sequences coding metabolic proteins. Table S5. IRE-like structures predicted by the SIREs web server of some mRNA from *G. duodenalis*. Attached material showing SIREs analysis.

Author Contributions: Conceptualization, C.L.-S. and R.A.; methodology, L.Y.P.-G., J.C.-O., H.S.L.-M. and J.A.G.-T.; validation, C.L.-S. and N.L.-S.; formal analysis, C.L.-S., R.A., A.C.-R. and N.L.-S.; investigation, C.L.-S. and R.A.; resources, C.L.-S. and J.A.G.-T.; data curation, C.L.-S., R.A., N.L.-S. and A.C.-R.; writing—original draft preparation, L.Y.P.-G. and C.L.-S.; writing—review and editing, R.A., C.L.-S. and L.Y.P.-G.; visualization, C.L.-S. and R.A.; supervision, C.L.-S.; project administration, C.L.-S.; funding acquisition, C.L.-S. and J.A.G.-T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Grants 51241 and 152772 (to C.L.-S.) from the National Council of Science and Technology, Mexico (CONACYT) and SEP-CONACYT, Ciencia de Frontera 2019. It was also supported by the Promotion and Support Program for Research Projects (PROFAP) of the University Autonomous of Sinaloa (to C.L.-S.). L.Y.P.-G. was a scholarship recipient from CONACYT, Mexico.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

25. Hernández-Cuevas, N.A.; Weber, C.; Hon, C.C.; Guillen, N. Gene expression profiling in *Entamoeba histolytica* identifies key components in iron uptake y metabolism. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107102. [\[CrossRef\]](#)
26. Soto-Castro, L.; Plata-Guzmán, L.Y.; Figueroa-Angulo, E.E.; Calla-Choque, J.S.; Reyes-López, M.; De la Garza, M.; León-Sicaños, N.; Garzón-Tiznado, J.A.; Arroyo, R.; León-Sicaños, C. Iron Responsive-like Elements in the parasite *Entamoeba histolytica*. *Microbiology* **2019**, *165*, 366. [\[CrossRef\]](#)
27. Torres-Romero, J.C.; Arroyo, R. Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: Evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE-IRP-like system. *Infect Genet. Evol.* **2009**, *9*, 1065–1074. [\[CrossRef\]](#)
28. Figueroa-Angulo, E.E.; Calla-Choque, J.S.; Mancilla-Olea, M.I.; Arroyo, R. RNA-Binding Proteins in *Trichomonas vaginalis*: Atypical Multifunctional Proteins. *Biomolecules* **2015**, *5*, 3354–3395. [\[CrossRef\]](#)
29. Calla-Choque, J.S.; Figueroa-Angulo, E.E.; Ávila-González, L.; Arroyo, R. α -Actinin TvACTN3 of *Trichomonas vaginalis* is an RNA-binding protein that could participate in its posttranscriptional iron regulatory mechanism. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 424767. [\[CrossRef\]](#)
30. Keister, D.B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1983**, *77*, 487–488. [\[CrossRef\]](#)
31. Tasca, T.; Bonan, C.D.; De Carli, G.A.; Sarkis, J.J.F.; Alderete, J.F. Heterogeneity in extracellular nucleotide hydrolysis among clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology* **2005**, *131 Pt 1*, 71–78. [\[CrossRef\]](#)
32. Aurrecochea, C.; Brestelli, J.; Brunk, B.P.; Carlton, J.M.; Dommer, J.; Fisher, S.; Gajria, B.; Gao, X.; Gingle, A.; Grant, G.; et al. GiardiaDB and TrichDB: Integrated genomic resources for the eukaryotic protist pathogens *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D526–D530. [\[CrossRef\]](#)
33. Xu, F.; Jex, A.; Svärd, S.G. A chromosome-scale reference genome for *Giardia intestinalis* WB. *Sci. Data* **2020**, *4*, 38. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Knodler, L.A.; Svärd, S.G.; Silberman, J.D.; Davids, B.J.; Gillin, F.D. Developmental gene regulation in *Giardia lamblia*: First evidence for an encystation-specific promoter y differential 5' mRNA processing. *Mol. Microbiol.* **1999**, *34*, 327–340. [\[CrossRef\]](#)
35. Elmendorf, H.G.; Singer, S.M.; Pierce, J.; Cowan, J.; Nash, T.E. Initiator and upstream elements in the α 2-tubulin promoter of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *113*, 157–169. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Tolba, M.E.M.; Kobayashi, S.; Imada, M.; Suzuki, Y.; Sugano, S. *Giardia lamblia* Transcriptome Analysis Using TSS-Seq and RNA-Seq. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e76184. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Peattie, D.A.; Alonso, R.A.; Hein, A.; Caulfield, J.P. Ultrastructural Localization of Giardins to the Edges of Disk Microribbons of *Giardia lamblia* and the Nucleotide and Deduced Protein Sequence of Alpha Giardin. *J. Cell Biol.* **1989**, *109*, 2323–2335. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Que, X.; Svärd, S.G.; Meng, T.C.; Hetsko, M.L.; Aley, S.B.; Gillin, F.D. Developmentally regulated transcripts and evidence of differential mRNA processing in *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, *81*, 101–110. [\[CrossRef\]](#)
39. Franzén, O.; Jerlström-Hultqvist, J.; Einarsson, E.; Ankarklev, J.; Ferella, M.; Andersson, B.; Svärd, S.G. Transcriptome profiling of *Giardia intestinalis* using strand-specific RNA-seq. *PLoS Comput. Biol.* **2013**, *9*, e1003000. [\[CrossRef\]](#)
40. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406–3415. [\[CrossRef\]](#)
41. Adedola, A.N.; McMahan, T.; Neal, J.P.; Hamal Dhakal, S.; Jois, S.; Romo, D.; Hull, K.; Garlapati, S. Translation initiation factors GleiF4E2 and GleiF4A can interact directly with the components of the pre-initiation complex to facilitate translation initiation in *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2020**, *236*, 111258. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Henderson, B.R.; Menotti, E.; Kühn, L.C. Iron regulatory proteins 1 and 2 bind distinct 524 sets of RNA target sequences. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 4900–4908. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Vanacova, S.; Liston, D.R.; Tachezy, J.; Johnson, P.J. Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*. *Int. J. Parasitol.* **2003**, *33*, 235–255. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Mathews, D.H.; Sabina, J.; Zuker, M.; Turner, D.H. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* **1999**, *288*, 911–940. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Volz, K. The functional duality of iron regulatory protein 1. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 106–111. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Piccinelli, P.; Samuelsson, T. Evolution of the Iron-Responsive Element. *RNA* **2017**, *13*, 952–966. [\[CrossRef\]](#)
47. Mach, J.; Sutak, R. Iron in parasitic protists—From uptake to storage and where we can interfere. *Metallomics* **2020**, *12*, 1335–1347. [\[CrossRef\]](#)
48. Arroyo, R.; Ochoa, T.; Tai, J.H.; de la Garza, M. Iron and Parasites. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 291672. [\[CrossRef\]](#)
49. Gastelum-Martínez, A.; León-Sicaños, C.; Plata-Guzmán, L.; Soto-Castro, L.; León-Sicaños, N.; De La Garza, M. Iron-modulated virulence factors of *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiol.* **2018**, *13*, 1329–1341. [\[CrossRef\]](#)
50. Aguilar-Díaz, H.; Canizalez-Roman, A.; Nepomuceno-Mejía, T.; Gallardo-Vera, F.; Hornelas-Orozco, Y.; Nazmi, K.; Bolscher, J.G.; Carrero, J.C.; León-Sicaños, C.; León-Sicaños, N. Parasitocidal effect of synthetic bovine lactoferrin peptides on the enteric parasite *Giardia intestinalis*. *Biochem. Cell Biol.* **2017**, *95*, 82–90. [\[CrossRef\]](#)
51. Paredes, A.R.; Nayeri, A.; Xu, J.W.; Krtková, J.; Cande, W.Z. Identification of Obscure yet Conserved Actin-Associated Proteins in *Giardia lamblia*. *Eukaryot. Cell* **2014**, *13*, 776–784. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Castillo-Romero, A.; León-Ávila, G.; Pérez-Rangel, A.; Cortes-Zárate, R.; García-Tovar, C.; Hernández, J.M. Participation of Actin on *Giardia lamblia* Growth and Encystation. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7156. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

53. Kwiatkowska-Semrau, K.; Czarnecka, J.; Wojciechowski, M.; Milewski, S. Heterogeneity of quaternary structure of glucosamine-6-phosphate deaminase from *G. lamblia*. *Parasitol. Res.* **2015**, *114*, 175–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lopez, A.B.; Hossan, M.T.; Keulen, H.V. *Giardia intestinalis* glucosamine 6-phosphate isomerase: The key enzyme to encystment appears to be controlled by ubiquitin attachment. *J. Eukaryot. Microbiol.* **2002**, *49*, 134–136. [[CrossRef](#)]
55. Jarroll, E.L.; Manning, P.; Berrada, A.; Hare, D.; Lindmark, D.G. Biochemistry and Metabolism of *Giardia*. *J. Protozool.* **1989**, *36*, 190–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Rafferty, S.P.; Dayer, G. Heme proteins of *Giardia intestinalis*. *Exp. Parasitol.* **2015**, *159*, 13–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

2. Iron responsive-like elements in the parasite *Entamoeba histolytica*

MICROBIOLOGY

RESEARCH ARTICLE

Soto-Castro et al., *Microbiology* 2017;163:1329–1342

DOI 10.1099/mic.0.000431



EDITOR'S CHOICE

Iron responsive-like elements in the parasite *Entamoeba histolytica*

Liliana Soto-Castro,¹ [Laura Yuliana Plata-Guzmán](#),¹ Elisa Elvira Figueroa-Angulo,² Jaeson Santos Calla-Choque,² Magda Reyes-López,³ Mireya de la Garza,³ Nidia León-Sicaïros,¹ José Antonio Garzón-Tiznado,¹ Rossana Arroyo² and Claudia León-Sicaïros^{1,*}

Abstract

In *Entamoeba histolytica*, iron modulates virulence and gene expression via unknown regulatory mechanisms. The existence of a posttranscriptional iron regulatory system parallel with the iron-responsive element (IRE)/iron regulatory protein (IRP) system in the protozoan *Trichomonas vaginalis* has recently been reported. Due to their evolutionary closeness and the importance of iron for growth and virulence in these protozoa, we hypothesized the existence of an IRE/IRP-like mechanism in *E. histolytica*. To determine the presence of IRE-like elements in some mRNAs from this parasite, we performed *in silico* analyses of the 5'- and 3'-UTRs of mRNAs encoding virulence factors and cytoskeleton, ribosomal and metabolism proteins. The Zuker mfold software predicted IRE-like secondary structures in 52 of the 135 mRNAs analysed. However, only nine structures shared sequence similarity with the apical loop sequence (CAGUGN) of the previously reported human IRE-ferritin, whereas the GUU/UUG protozoan-specific motif was detected in 23 stem-loop structures. A new motif, AUU/AUUU, was also observed in 23 structures, suggesting the possible existence of an amoeba-specific motif. Additionally, cross-linking and RNA electrophoretic mobility shift assays showed specific RNA-protein interactions, using as a model two amoebic IRE-like elements from iron-regulated mRNAs and HeLa, *T. vaginalis* and *E. histolytica* cytoplasmic proteins. Our data suggest the presence of a posttranscriptional iron regulatory IRE/IRP-like mechanism in *E. histolytica*.

3. Iron-modulated virulence factors of *Entamoeba histolytica*

1 Iron-modulated virulence factors of *Entamoeba histolytica*

2 Aurora Gastelum-Martínez¹, Claudia León-Sicaíros^{1*}, Laura Plata-Guzmán¹, Liliana

3 Soto-Castro¹, Nidia León-Sicaíros² & Mireya de la Garza^{3*}.



Future Microbiology

ISSN (print): 1746-0913 | ISSN (online): 1746-0921

Frequency: 16 issues per year

Future Microbiology welcomes unsolicited article proposals. **Email us** today to discuss the suitability of your research and our options for authors, including our **Accelerated Publication** and **Open Access** services.

Impact Factor: 3.374
(2016)

[Submit an article](#)

[Subscribe](#)

B. Co-Directora de Tesis de la alumna Nelida Valenzuela Luque para obtener el grado de Licenciada en Biotecnología Genómica.



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Licenciatura en Biotecnología
Genómica

Regulación por hierro de genes que participan en un sistema de adquisición y metabolismo del hierro en el parásito protozoario *Giardia duodenalis*

TESIS

Que presenta

Nelida Valenzuela Luque

Como requisito para obtener el título de

Licenciada en Biotecnología
Genómica

Directoras de Tesis

Dra. Claudia del Rosario León
Sicairos

M.C. Laura Yuliana Plata Guzmán

Culiacán, Sinaloa, México de 2020

□

C Participación en Congresos

1. 6^{to} Congreso de la rama de fisicoquímica, estructura y diseño de proteínas



**6^o CONGRESO DE LA RAMA
DE FISICOQUÍMICA, ESTRUCTURA
Y DISEÑO DE PROTEÍNAS**

DURANGO, MEXICO

November 6-10, 2017

Sociedad Mexicana de Bioquímica certify that

Aurora Alicia Gastelum Martinez

Presented the poster and oral entitled:

Proteínas reguladoras de hierro en *E. histolytica*

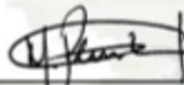
By:

Gastelum-Martinez, Aurora Alicia; Plata-Guzmán, Laura Yuliana; Soto-Castro, Lilliana; Figueroa-Angulo, Elisa Elvira; Arroyo Rossana; Garzón-Tiznado, José Antonio; Puga-Barraza, Francisco; Hernández-Valenzuela, Marco Antonio; López-Moreno, Héctor Samuel; De la Garza, Mireya; Reyes-López, Magda; León-Sicairos, Claudia.

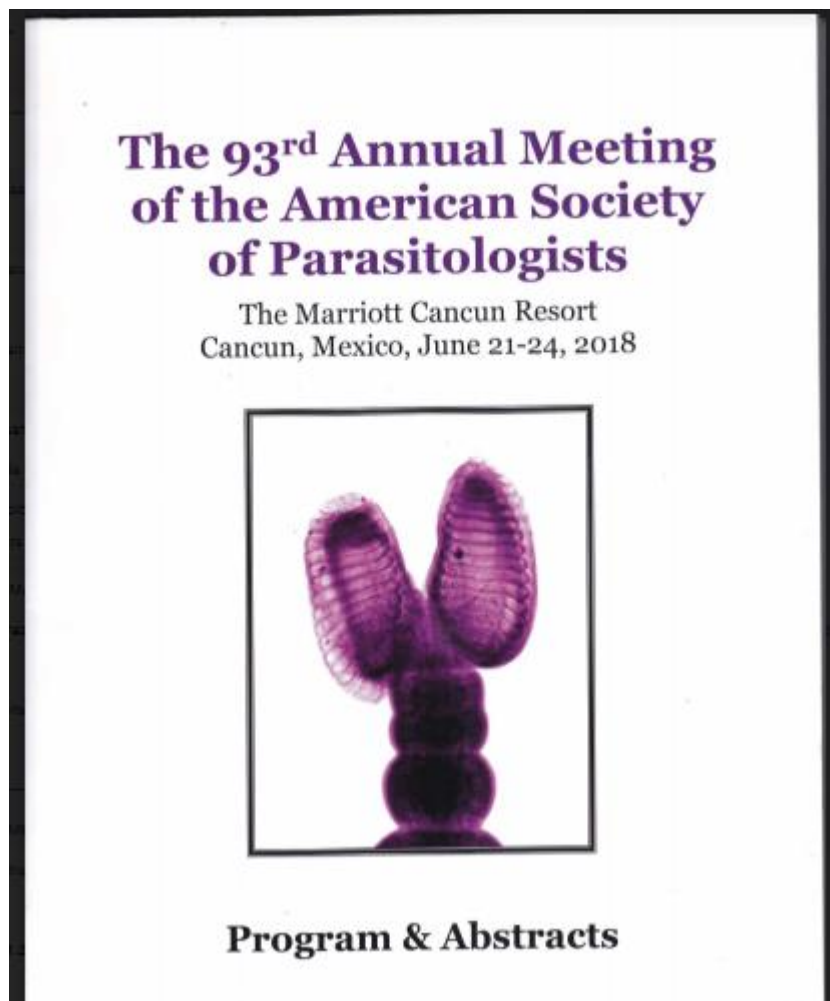
At the 6^o Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas held on November 6-10, 2017 in Durango, Durango, Mexico.

On behalf
The organizing Committee


Dr. Alfredo Téllez Valencia


Dra. Mariana Peimbert Torres

2. The 93rd Annual Meeting of the American Society of Parasitologists



a.- Specific interaction of two IRE-Like from *Entamoeba histolytica* to human iron regulatory proteins



Plata-Guzmán, Laura Yuliana; Figueroa-Angulo, Elisa Elvira; Calla-Choque, Jaeson; Arroyo, Rossana; De la Garza, Mireya; Reyes-López, Magda; Chávez Ontiveros, Jeanett; Soto-Castro, Liliana; Gastelum-Martínez, Aurora Alicia; Garzón-Tiznado, José Antonio; León-Sicaíros, Claudia. SPECIFIC INTERACTION OF TWO IRE-LIKE FROM *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* TO HUMAN IRON REGULATORY PROTEINS.

#150

Specific interaction of two IRE-like from *Entamoeba histolytica* to human iron regulatory proteins

Plata-Guzmán Laura Yuliana¹, Figueroa-Angulo Elisa Elvira², Calla-Choque Jaeson², Arroyo Rossana², De la Garza Mireya³, Reyes-López Magda³, Chávez Ontiveros Jeanett¹, Soto-Castro Liliana¹, Gastelum-Martínez Aurora Alicia¹, Garzón-Tiznado José Antonio¹, León-Sicaíros Claudia¹.

¹Programa Regional del Noroeste para el Posgrado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Av. de las Américas y Josefa Ortiz (Cd. Universitaria) Culiacán, Sinaloa 80030, Mexico. ²Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), Av. IPN No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, Mexico City, CP 07360, Mexico. ³Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), Avenida Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, Mexico D.F. 07360, Mexico.

INTRODUCTION

Entamoeba histolytica infect human causing amoebiasis, that is cataloged as the third most frequent parasitic cause of death worldwide. In *E. histolytica* has been reported that iron has the ability to modulate the expression of genes related to the virulence of the parasite. However, the mechanism by which this expression is regulated has not been well described. In mammals, the posttranscriptional regulation of iron by the IRE/IRP system (Iron Responsive Element/Regulatory Protein) is the most studied. The iron regulatory cytoplasmic proteins, IRP-1 and IRP-2, interact with Iron Responsive Elements (IREs), which are conserved stem-loop structures located in the untranslated regions (UTR) of the mRNA that encode proteins related to iron homeostasis. Recently, our research group has reported the existence of a posttranscriptional iron regulation system parallel to the IRE/IRP system in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, this mechanism has been described for some proteins of T. cruzi. In addition, our group has found stem-loop structures in *E. histolytica* mRNAs coding for CHOP, CHOP2, Actin, CHOP21 and CHOP22 proteins, in some of which it has been shown that are modulated by iron. However, the functionality of the IRE-like structures has not been demonstrated. Therefore, the aim of this work was to determine the specific interaction of two IREs of the parasite (*Chhnp22* and *Actin*) to human cytoplasmic proteins. Gel retardation assays were carried out using these IREs of the parasite with cytoplasmic extracts of HeLa cells. Our results showed specific interaction of IRE-IRP type. In addition, by UV crosslinking assays we observed protein bands of IRP-1 and IRP-2. These data suggest the presence of an IRE/IRP system in *E. histolytica*.

METHODS

RESULTS AND DISCUSSION

The *Chhnp22* RNA sequence (5'-L-32224) is able to form two IRE-like hairpins at both UTRs; however, the IRE-like structure at the 3' UTR appears more stable. This structure contains the conserved A-U in the upper stem (as reported in higher eukaryotes) and A-U residues in the loop that could be a variant of the GUU posttranscriptional specific motif. In addition, it has been reported to be down-regulated by iron (1); thus, the IRE-like structure located at the 3' UTR could be functional. Moreover, the actin sequence (5'-L-140120) is able to form two IRE-like structures at both UTRs, including the coding region, as reported for hcp4-IRE (2). The 3'-end of actin-IRE contains CUU residues in the loop, A-U residues conserved in the upper stem and unpaired G reported in the canonical IREs (3) (Figure 1).

To investigate whether the *Chhnp22* and actin IRE-like structures found by in silico analysis of the 3'- and 5'-UTRs of these mRNAs (3' UTR *Chhnp22* and 5' UTR actin IRE-like) are able to bind typical IRP proteins, we performed EMSA using HeLa cell cytoplasmic extracts as a source of IRPs and in vitro transcribed IRE-like *Chhnp22* and actin structures shows the formation of RNA-protein complexes between these two amoebic IRE-like structures and human IRPs from HeLa cells (Figure 2A, lanes 2, 4, and 5).

Moreover, crosslinking assays were performed to confirm the size of the proteins capable of forming complexes between the *Chhnp22* and actin IRE-like elements and cytoplasmic proteins from HeLa cells. The results showed interaction of the *Chhnp22* (Figure 2B, lane 2) and actin IRE-like RNA (Figure 2C, lane 2) with 110, 98, 66 and 62 kDa protein bands, similar to those observed with the human IRE-like structure (Figure 2A, lane 2). The 110 and 98 kDa protein bands may correspond to the human IRPs. The other proteins could correspond to other RNA-binding proteins that interact with the human IRE-like (used as a control) and with the amoebic IRE-like RNA reported here.

Figure 3. *Chhnp22* and actin IRE-like RNAs and IRE-like RNA interact with similar protein bands from HeLa cytoplasmic extracts. UV crosslinking assay using 25 μg HeLa cytoplasmic extracts and incubated with 250 pM IRE-like RNA. Lane 1: free RNA used as a negative control; Lane 2: interaction of IRE-like RNA with HeLa cytoplasmic extracts; Lane 3: IRE-like RNA; Lane 4: interaction of IRE-like RNA with HeLa cytoplasmic extracts; Lane 5: interaction of IRE-like RNA with HeLa cytoplasmic extracts.

CONCLUSION

Our results show evidence of the presence of atypical IRE-like hairpin-loop structures in some *E. histolytica* mRNAs, supporting the possibility of an iron-regulatory mechanism at the posttranscriptional level similar to the IRE/IRP system of higher eukaryotes. Moreover, the *Chhnp22* and actin IRE-like structures specifically bind to the human IRPs (IRP-1 and IRP-2) and to other cytoplasmic proteins. Investigation of this mechanism could provide insight into the complex functions that iron plays in the metabolism, survival and virulence of this human parasitic pathogen.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful for the support of SEP/CONACYT (152712), PROPAF-UG, PROMEP-UG to ORL: Laura Yuliana Plata-Guadalupe is CONACYT scholarship holder.

REFERENCES

1. Sileghem-Chau C, López-Casasnovas M, Cruz-González A, Olvera-Peggo J. Transiently regulates mRNA levels of genes involved in iron utilization of *Escherichia coli*. *Mol Cell* 2011; 39:404-415.
2. Soto-Castro L, Burdette-Barcelo E, León-Sicaíros C, Astudero-López L, Gómez-Bautista L, et al. The iron-regulated cytoplasmic protein TIRP1 can bind a non-iron-responsive element. *FEBS Lett* 2012; 585:1915-1920.
3. Nakai K. The functional diversity of iron regulatory proteins. *J Cell Physiol* 2008; 193:103-111.
4. Henderson IR, Marelli B, Bonnard C, Kuhn J-C. Optimal sequence and structure of iron-responsive elements: Selection of RNA stem-loops with high affinity for iron-regulatory factor. *J Biol Chem* 1994; 269:11485-11493.

Figure 1. Prediction of stem-loop structures of *E. histolytica* mRNAs coding for virulence and cytoplasmic proteins.

b. Sequences of RNA-Binding proteins (RPBs) in amitochondriate parasites *E. histolytica* and *G. duodenalis*.

GENOMICS AND MOLECULAR BIOLOGY

(157)

Gastelum-Martinez, Aurora Alicia; Plata-Guzmán, Laura Yuliana; Figueroa-Angulo, Elisa Elvira; Arroyo, Rossana; Garzón-Tiznado, José Antonio; Reyes-Sánchez, Luz Adriana; De la Garza, Mireya; Reyes-López, Magda; León-Sicaños, Claudia. SEQUENCES OF RNA-BINDING PROTEINS (RBPS) IN AMITOCHONDRIATES PARASITES: *E. HISTOLYTICA* AND *G. DUODENALIS*.

Sequences of RNA-binding proteins (RBPs) in amitochondriate parasites: *E. histolytica* and *G. duodenalis*

Gastelum-Martínez Aurora Alicia, Plata-Guzmán Laura Yuliana, Reyes-Sánchez Luz Adriana, Figueroa-Angulo Elisa Elvira, Arroyo Rossana, Garzón-Tiznado José Antonio, De la Garza Mireya, Reyes-López Magda and León-Sicairens Claudia.

Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), Programa Regional del Noroeste para el Doctorado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Av. De las Américas y Josefa Ortiz de Domínguez, Culiacán, Sinaloa, México. C.P. 40030.
E-mail: claudia.lopez@uasnet.mx

Abstract

Enteromesen hystolytica and *Glacie duodenalis*, which cause intestinal diseases worldwide. *E. hystolytica* is the causative agent of amoebiasis, while *G. duodenalis* causes giardiasis. Both parasites need iron for their survival and virulence; however, iron regulation mechanisms still remain unclear. In mammals, iron homeostasis is regulated at the post-transcriptional level by the IRE/IRP system (Iron Response Elements/iron Regulatory Proteins). The cytoplasmic proteins IRP-1 and IRP-2 interact with IREs, which are conserved stem-loops structures found in the untranslated regions (UTRs) of the mRNAs that encode proteins related to iron homeostasis [1,2]. This mechanism was previously described in *T. gondii*, for Tgrip1 and Tgrip2 proteins which are regulated at the post-transcriptional level by the IRE/IRP system [3]. In the present study, we have analyzed the expression of the IRE/IRP system in *E. hystolytica* and *G. duodenalis*. Previously, our research group found IRE-like structures in the mRNA of *E. hystolytica* by *in silico* analysis. In addition, proteins that interact with human IRP1 antibodies *s* are found in the cytoplasmic extracts of both parasites. Therefore, our objective was to search *in silico* RNA binding proteins that would participate in the post-transcriptional regulation of iron in the amoeboductal parasites *E. hystolytica* and *G. duodenalis*, in order to determine the presence of the IRE/IRP-like mechanism. Thus, we perform an *in silico* analysis, in which the amino acid sequence of the cytoplasmic proteins IRP-1 and IRP-2 were used as queries. In addition, we used Tgrip1, Tgrip2, Tgrip3, HSP70-4 and Actin) were used as probes in both *E. hystolytica* (AmoebaDB) as in *G. duodenalis* (GiardiaDB) genomes; subsequently, possible orthologous were analyzed for RNA-binding motifs in the SMART® and prosite program. The analysis revealed possible orthologous for *E. hystolytica*, of which only four showed RNA-binding domains. On the other hand, *G. duodenalis* genome showed 28 possible orthologous however none of them showed RNA-binding sites; possibly the binds would occur once the protein acquires the tertiary structure. These results suggest the presence of a post-transcriptional mechanism that controls the expression of *E. hystolytica* and *G. duodenalis* IRE-like structures. This study is the first to identify IRE-like structures in these parasites. Knowledge derived from this work can help in the future for the development of new diagnostic methods.

Results and Discussion

Table 1. Possible orthologs of human IRP1 and IRP2 found in *E. histolytica* and *G. duodenalis* proteome.

Microorganism	Protein	ID Gene bank	ID ArmoebaDB	Name	Length (aa)	Molecular Weight (kDa)	Identity (%)
	RFP-SP1	P21359.3	EHL_131110A-p1	Hypothetical protein	154	16.94	39
<i>S. hirsuti</i>	IRP2	P46200.3	EHL_086795A-p1	Protein phosphatase 2C domain containing protein	837	92.07	26
			EHL_086105A-p1	Hypothetical protein	440	48.4	29
<i>G. duodenalis</i>	RFP-SP1	P21359.3	GL50803.1	Hypothetical protein	420	46.2	32

2. Search of RBPs in *E. histolytica* and *G. duodenalis* proteome

In the *G. duodenalis* proteome, four possible orthologs were found for TvACT3, seven for Actin and ten for HSP70-4, however none of them presented nucleic acid binding domains, however, possibly these proteins could interact with nucleic acids after protein folding. Moreover, we found hypothetical, heat shock and actins proteins, among others.

On the other hand, in the *E. histolytica* proteome, 14 possible orthologs for TvACT3 were found of which only one showed RNA binding domains, meanwhile 25 possible orthologs for HSP70-4 were found of which four showed nucleic acids binding domains, while 15 possible orthologs for Actin were found of which two showed nucleic acids binding domains (Table 2).

Materials and Methods

1. Search of IRP-like in the *E. histolytica* and *G. duodenalis* proteome



2. Search of RBPs in the *E. histolytica* and *G. duodenalis* proteomes



Results and Discussion

1. Search of IRP-like in the *E. histolytica* and *G. duodenalis* proteome

The analysis revealed the possible orthologs of *E. histolytica*, none of which have DNA or RNA binding sites, however, the possible orthologs of IRP2 (ID EH0575050-p1), has a molecular size very similar to that of the human IRP [5]. On the other hand, *G. duodenalis* only showed one possible orthologs which was obtained from human IRP1 and neither contain binding sites to nucleic acids. These results are similar those reported for *Trichomonas vaginalis*, an mitochondrial parasite with evolutionary closeness to *E. histolytica* and *G. duodenalis*, which did not exhibited orthologs of human IRP1 and IRP2, but exhibit multifunctional proteins which are capable to interact with RNA according to intracellular iron concentrations. Thus, we hypothesized that both *E. histolytica* and *G. duodenalis* have a similar behavior.

None of the sequences presented RNA-binding domains

Table 2. Possible orthologs of TvACT3, H3P70-4 and Actin found in *E. histolytica* proteome.

Protein Probe	ID InchiKey	1-nucleotide anticodon (1nt)	Sequence with binding site to 5'AC	ID Accession	Name	Molecular weight kDa	Identity (%)	Binding Site	RNA- Binding Site	Name of Binding Site
TivACT3	TivAG_190450	54	5	EHL_002490 A-p1	Calponin domain containing protein	31	29	2	1	ProQ
TivSPPO4	TivAG_044570	25	4	EHL_002530 mRbA-p1	Heat shock protein70, mitochondrial, cytosolic	56	48	3	1	PGIN
TivACT	TivAG_054030	15	1	EHL_043940 A-p1	actin, pulsatile	36	74	3	1	54
	TivAG_200130	15	1	EHL_043940 actin, pulsatile	actin, pulsatile	36	74	3	1	54

Conclusion

Our data suggest that probably the IRP-like proteins may exist in the cytoplasm of the *E. histolytica* and *G. duodenalis*, which could participate in a post-transcriptional regulation IRE/IRP-like system. Thus, as occurs in *T. vaginalis* IRP-like, these proteins could be multifunctional.

Acknowledgements

We are grateful for the support of PROFABI and CONACYT (152772) to CRLS. AAGM and LYPG were a scholar-ship recipient from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

References

1. Farnsworth JR. From redox-sensitive sites to RPP30 regulatory systems and beyond. *Ann NY Acad Sci*. 2008;1137:1-15. doi:10.1111/j.1749-7692.2008.01581.x
2. Jochims RP, Mochly N, Grollman M, Grollman A. The RPP30/RPP30-Regulatory Interactome. *Cell*. 2012;150:123-134. doi:10.1016/j.cell.2012.06.017
3. Jochims RP, Mochly N, Grollman M, Grollman A. The RPP30/RPP30-Regulatory Interactome. *Cell*. 2012;150:123-134. doi:10.1016/j.cell.2012.06.017
4. Jochims RP, Mochly N, Grollman M, Grollman A. The RPP30/RPP30-Regulatory Interactome. *Cell*. 2012;150:123-134. doi:10.1016/j.cell.2012.06.017
5. Jochims RP, Mochly N, Grollman M, Grollman A. The RPP30/RPP30-Regulatory Interactome. *Cell*. 2012;150:123-134. doi:10.1016/j.cell.2012.06.017
6. Jochims RP, Mochly N, Grollman M, Grollman A. The RPP30/RPP30-Regulatory Interactome. *Cell*. 2012;150:123-134. doi:10.1016/j.cell.2012.06.017
7. Jochims RP, Mochly N, Grollman M, Grollman A. The RPP30/RPP30-Regulatory Interactome. *Cell*. 2012;150:123-134. doi:10.1016/j.cell.2012.06.017
8. Jochims RP, Mochly N, Grollman M, Grollman A. The RPP30/RPP30-Regulatory Interactome. *Cell*. 2012;150:123-134. doi:10.1016/j.cell.2012.06.017
9. Jochims RP, Mochly N, Grollman M, Grollman A. The RPP30/RPP30-Regulatory Interactome. *Cell*. 2012;150:123-134. doi:10.1016/j.cell.2012.06.017
10. Jochims RP, Mochly N, Grollman M, Grollman A. The RPP30/RPP30-Regulatory Interactome. *Cell*. 2012;150:123-134. doi:10.1016/j.cell.2012.06.017

C Asistencia a Conferencias

