

Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GENES
tpi Y gdh EN AISLADOS DE Giardia lamblia
OBTENIDOS DE PACIENTES SINTOMÁTICOS Y
PORTADORES ASINTOMÁTICOS

POR

Juan Pedro Ortiz Sánchez

**Tesis aprobada por la
Dirección de Nutrición**

Como requisito parcial para obtener el grado de:

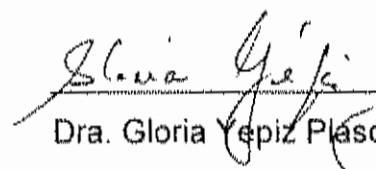
Maestría en Ciencias

APROBACIÓN

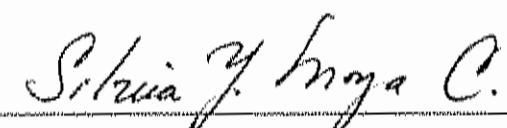
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Juan Pedro Ortiz Sánchez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



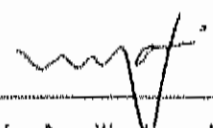
Dr. Humberto Astiazarán García
Director de tesis



Dra. Gloria Yepiz Plascencia
Secretaria



Dra. Silvia Yolanda Moya Camarena
Vocal



María Auxiliadora Islas Osuna
Vocal

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de la tesis.



Dr. Alfonso Gardea Bejar
Director General

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a Dios que me da la fuerza para levantarme cada mañana y de crecer cada día.

A mi familia que siempre espera lo mejor de mí y siempre me dan lo mejor de ellos, principalmente a mis Padres.

A todas las personas que rezan por mí, que sufren y gozan conmigo, que comparten conmigo cada logro y lo engrandecen.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico otorgado a través de becas.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD A. C.) por la oportunidad de pertenecer a su cuerpo de alumnos.

A la Dra. Gloria Yepiz Plascencia, por su gran atención y amabilidad, además, por la gentileza de permitirnos utilizar equipo y material de laboratorio para la realización de este trabajo.

A la Dra. Silvia Yolanda Moya Camarena, por su gran disponibilidad, atención y apoyo. También por facilitarnos equipo y material de laboratorio, muchas gracias.

A la Dra. María Auxiliadora Islas Osuna, por sus consejos, su apoyo y amabilidad otorgados y sobre todo gracias a los tres miembros del comité por su amistad.

Al departamento de Docencia del CIAD A. C., principalmente al Dr. Juan Pedro Camou, a Ana Isabel y Héctor Galindo, por su atención, amabilidad y gentileza.

A la Dra. Ana María Calderón de la Barca por abrirme las puertas del CIAD A. C. y por su apoyo al iniciar el programa de Maestría que fue fundamental. Y al personal del laboratorio de Proteínas, a Adriana, René, Alberto, Javier y sobre todo a mi "carnalita" Diana Hernández.

Al personal del laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, Alma, Gracita, Mireya, Gaby Romo, Carmen, Sarahí. Gracias por su gentileza, amabilidad, disponibilidad y buen humor.

Al personal de la Biblioteca del CIAD A. C., a Magda, Gerardo, Fernando y Luis Conde.

Un especial agradecimiento a mi "Patrón" el Dr. Humberto Astíazarán García, por la oportunidad de trabajar en uno de sus proyectos, por su gran trato y amabilidad, por comprensión, flexibilidad y gentileza.

A mi familia, principalmente a mis Padres, por su bendición y cuidados, pero sobre todo por hacerme sentir dichoso por tener una familia que siempre me apoya y disfruta mis triunfos. Gracias por compartir mi felicidad.

A mi Hermana Lupita y a mi cuñado Ariel que no solo me otorgaron una casa para quedarme, sino que me dieron un hogar para vivir. Gracias por aguantarme.

A mis amigos del alma que llegaron para quedarse y siempre están conmigo en las buenas y en las malas, gracias a Gracita, Rafa, Chayito, Santiago, Amelia y Cecy. Un especial agradecimiento a mi amigo Enrique "El Mochomo", por demostrarme que no importa el tamaño del perro en la pelea, sino el tamaño de la pelea en el perro.

A mi novia Regina que tanto amo y que siempre me apoya, me consuela, me anima, me acompaña y sobre todo por siempre esperar lo mejor de mí. Gracias por tus preocupaciones, tus rezos, por tu amor y por traerme la luz del día.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABLAS	ii
RESUMEN	iii
INTRODUCCIÓN	1
Características de <i>Giardia lamblia</i>	1
Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>	2
Efectos de la infección por <i>G. lamblia</i> en el estado nutricional.....	2
Giardiasis.....	3
ANTECEDENTES	4
Clasificación de aislados de <i>Giardia lamblia</i>	4
Relación del grupo con los síntomas.....	6
HIPÓTESIS	8
OBJETIVO	8
Objetivos particulares.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Origen de los aislados de <i>Giardia lamblia</i>	9
Extracción de ADN genómico.....	10
Amplificación de fragmentos de los genes <i>tpi</i> y <i>gdh</i> por PCR.....	11
Secuenciación de los productos de PCR.....	13
Análisis de RFLP de los productos de PCR.....	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14

Cantidad y calidad del ADN extraído.....	14
Amplificación del fragmento del gen <i>tpi</i> por PCR.....	17
Amplificación del fragmento del gen <i>gdh</i> por PCR.....	17
RFLP de los productos de amplificación del gen <i>tpi</i>	22
Secuenciación de los productos de PCR.....	26
CONCLUSIÓN	31
BIBLIOGRAFÍA	32
ANEXO	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de <i>Giardia lamblia</i>	5
Tabla 2. Secuencias nucleotídicas de genes utilizadas para la clasificación de aislados de <i>G. lamblia</i>	6

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis del ADN genómico aislado de <i>Giardia lamblia</i> en gel de agarosa.....	16
Figura 2. Electroforesis de los productos de PCR para el gen <i>tpi</i> del grupo A en gel de agarosa.....	19
Figura 3. Electroforesis de los productos de PCR para el gen <i>tpi</i> del grupo B en gel de agarosa.....	20
Figura 4. Electroforesis de los productos de PCR para el gen <i>gdh</i> en gel agarosa.....	21
Figura 5. Electroforesis de los productos de digestión con <i>XhoI</i>	24
Figura 6. Electroforesis de los productos de digestión con <i>RsaI</i>	25
Figura 7. Alineación múltiple del fragmento de la secuencia del gen <i>triosa fosfato isomerasa</i> de los aislados de <i>G. lamblia</i>	28
Figura 8. Alineación múltiple del fragmento de la secuencia del gen <i>glutamato deshidrogenasa</i> de los aislados de <i>G. lamblia</i>	29

RESUMEN

Giardia lamblia (*G. lamblia*) causa la infección conocida como giardiasis la cual puede presentar síntomas como diarrea y malabsorción o puede ser asintomática. Se caracterizaron molecularmente cuatro aislados de *G. lamblia*, dos de ellos obtenidos de pacientes sintomáticos y dos de portadores asintomáticos, sobre la base del polimorfismo en los genes que codifican para las enzimas triosa fosfato isomerasa (*tpi*) y glutamato deshidrogenasa (*gdh*). Se estandarizó la extracción de ADN genómico a partir de trofozoitos criopreservados, utilizando proteinasa K, detergente bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y ciclos de congelación (en nitrógeno líquido) y descongelación (en baño de agua a 65°C). A partir del ADN genómico de los cuatro aislados se amplificó por PCR un fragmento de 579 pb del gen que codifica para *tpi* y los productos se incubaron con las endonucleasas *Xho*I y *Rsa*I para determinar sus sitios de restricción. Posteriormente, los productos de PCR se secuenciaron. También se amplificó por PCR un segmento del gen *gdh* y sus productos se secuenciaron directamente, sin someterse a RFLP. Los resultados de PCR-RFLP demostraron que las cuatro muestras clínicas de *G. lamblia* pertenecen al grupo A, subgrupo A1, independientemente de su origen. La secuencia del fragmento del gen *tpi* presentó una similitud del 100% de las muestras clínicas con el grupo A1 (cepa WB) y 82.3% (99 bases sustituidas de 557) con el grupo B (cepa GS/H7). La secuencia del fragmento del gen *gdh* presentó una similitud del 100% de las muestras clínicas con el grupo A (aislado Ad-1) y una similaridad de 88.9% (55 bases sustituidas de 495) con el grupo B (aislado Ad-7). Las secuencias nucleotídicas de los genes *tpi* y *gdh* de las muestras clínicas estudiadas las clasifican dentro del grupo A, subgrupo A1, lo cual implica un posible origen zoonótico. En la presente investigación, no se encontró una diferencia molecular en los genes estudiados que relacione el genotipo de *G. lamblia* con la manifestación clínica de su infección.

Act-1) y una similaridad de 88.9%, (53 bases sustituidas de 4915) con el grupo B (aislado Ad-7). Las secuencias nucleotídicas de los genes *lpi* y *uri/1* de las muestras clínicas estudiadas las clasifican dentro del grupo A, subgrupo A1, lo cual implica un posible origen zoonótico. En la presente investigación, no se encontró una diferencia molecular en los genes estudiados que relacione el genotipo de G, *lamblia* con la manifestación clínica de su infección.

INTRODUCCIÓN

Características de *Giardia lamblia*

G. lamblia es un protozooario intestinal ubicuo que tiene la capacidad de infectar organismos de varias especies, incluyendo al humano. Se considera entre los parásitos intestinales con mayor incidencia en casos de infección en países en desarrollo (Adam, 2001), principalmente en infantes y niños preescolares (Larrosa-Haro *et al.*, 2002; Muñiz *et al.*, 2002). En algunos países se han reportado brotes epidemiológicos de diarrea causados por quistes de *G. lamblia* presentes en agua potable (Adam, 2001; Kucheria y *et al.*, 2002). En Estados Unidos, *G. lamblia* es el patógeno intestinal mas comúnmente diagnosticado en laboratorios de salud pública y se reportan alrededor de 2.5 millones de casos de infección al año en ese país (Furness *et al.*, 2000). Además, *G. lamblia* es el patógeno intestinal mas frecuente en viajeros que visitan al médico por problemas de diarrea (Harms *et al.*, 2002). La Organización Mundial de la Salud reporta medio millón de casos nuevos de giardiasis al año en humanos. Aunque su índice de mortalidad es bajo, *G. lamblia* se considera uno de los principales agentes patógenos alrededor del mundo (WHO, 1995. Water and Public Health. (www.who.int/watersanitationhealth/Documents/GDWQtraining/S01.pdf).

Ciclo de vida de *G. lamblia*

G. lamblia entra al organismo hospedero por vía oral en forma de quiste, el cual se puede encontrar en el agua potable o en los alimentos. Al ser ingerido, llega al intestino delgado donde desenquista y los trofozoitos liberados se multiplican por fisión binaria para colonizar el intestino, principalmente la región del duodeno. Una vez en el intestino grueso, se enquista de nuevo para ser expulsado con las heces, de esta manera logra resistir las condiciones adversas del ambiente externo. Cuando las malas prácticas de higiene permiten que estos quistes contaminen el agua o los alimentos, su ingestión inicia de nuevo el ciclo de vida (Adam, 2001).

Efecto de la infección por *G. lamblia* en el estado nutricional

La invasión de los trofozoitos en la mucosa intestinal ocasiona efectos adversos que afectan su función. Entre estos efectos está el crecimiento acelerado de enterocitos y células caliciformes que provoca una atrofia en las vellosidades y producción excesiva de moco (Buret *et al.*, 1990). Además, existen daños a nivel de membrana como atrofia de las microvellosidades (Buret *et al.*, 1990), disminución de las disacaridasas (Goto *et al.*, 2002) y daño en la permeabilidad de las células (Northrop-Clewes *et al.*, 2001). Todos estos efectos tienen repercusión en el estado nutricional del organismo hospedero que infectan. En humanos, se ha demostrado que la infección con *G. lamblia* está

relacionada con disminución en el crecimiento (Shubair *et al.*, 2000), baja relación peso/edad (Sackey *et al.*, 2003), reducción de peso en periodos cortos (Northrop-Clewes *et al.*, 2001) e incluso con disminución en la función cognitiva en niños de nueve años que fueron infectados en edad temprana (Berkman *et al.*, 2002). Estos hallazgos hacen de *G. lamblia* un patógeno intestinal de gran importancia clínica y nutricional y toda la información que se obtenga acerca de sus características es importante para su control epidemiológico.

Giardiasis

G. lamblia causa la infección llamada giardiasis, cuyo síntoma característico es la diarrea, ya sea intermitente o persistente. En ocasiones, la diarrea se acompaña de síntomas secundarios como náuseas, vómito, esteatorrea, dolor abdominal, flatulencias, disminución de peso y síndrome de malabsorción (Farthing, 1992). Sin embargo, muchos casos de infección se consideran asintomáticos, ya que no presentan signos característicos de la infección como lo son la diarrea y el dolor abdominal. En estos casos es común la manifestación de síntomas inespecíficos, como son la disminución del peso corporal y síndrome de malabsorción (Adam., 2001). La presencia o ausencia de síntomas, es un efecto de la giardiasis que ha generado controversia en cuanto a su patogenicidad. Las razones por las cuales algunos individuos infectados son más afectados que otros, aún no son claras. Se propone que las

condiciones del sistema inmune del organismo hospedero y las propiedades biológicas de la cepa que infecta, son dos de los factores principales que determinan la severidad de la infección por *G. lamblia*.

ANTECEDENTES

Clasificación de aislados de *G. lamblia*

Los estudios de cepas de *G. lamblia* aisladas de heces de humanos, han demostrado que existen principalmente dos genotipos, el A y el B. Ésta clasificación engloba las nomenclaturas propuestas inicialmente (Tabla 1) por los primeros trabajos de caracterización (Adam, 2001). Los estudios de clasificación de aislados de *G. lamblia*, que iniciaron con análisis de patrones isoenzimáticos, han sido respaldados por análisis de secuenciación de genes y comparación de sus secuencias. Sin embargo, los costos y la necesidad de equipo especial, hacen de la secuenciación nucleotídica de los genes un método inconveniente para manejar un gran número de muestras. En estos casos, los análisis de polimorfismo en la secuencia de un sitio de restricción (RFLP) se han utilizado como un complemento de los análisis de secuenciación (Amar *et al.*, 2002; Monis *et al.*, 1996; Cacció *et al.*, 2002). Este método tiene además la ventaja de ser más accesible, fácil y económico.

Las secuencias de los genes que codifican para las enzimas triosa fosfato isomerasa (*tpi*) y glutamato deshidrogenasa (*gdh*) se han utilizado para

Tabla 1. Grupos de *Giardia lamblia*

Clasificación Homan, <i>et al.</i> (1992)	Clasificación Nash <i>et al.</i> (1995)	Clasificación Mayrhofer <i>et al.</i> (1995)	Hospedero(s)
"Poland"	Grupo 1	A (grupo 1)	Humano, gato, ganado, perro, castor, alpaca, chinchilla, lemur
-	Grupo 2	A (grupo 2)	Humano, castor
"Belgium"	Grupo 3	B (grupo 3 y 4)	Humano, castor, perro, mono, cobayo
-	-	C	Perro
-	-	D	Perro
-	-	E	Ganado (vacas, ovejas, alpacas, cabras)
-	-	F	Gato
-	-	G	Rata

diferenciar grupos o genotipos debido a que presentan diferencias en los aislados pertenecientes a los grupos A y B (Tabla 2). Respecto al gen *tpi*, la similitud entre el grupo A y B es de 89%, mientras que para el gen *gdh*, dicha similitud es de 81%. Por ello, las secuencias nucleotídicas de los genes *tpi* y *gdh* han sido utilizadas como marcadores moleculares en la clasificación de aislados de *G. lamblia* (Monis *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1998; Amar *et al.*, 2002). Además, la diversidad de estos genes permite distinguir diferencias

nucleotídicas entre los subgrupos AI, encontrado en varios organismos incluyendo al humano y AII, encontrado sólo en humanos (Thompson *et al.*, 2000). La clasificación en grupos y subgrupos de los aislados clínicos de *G. lamblia* ayuda a obtener información de su origen epidemiológico y zoonótico (O'Handley *et al.*, 2000).

Tabla 2. Secuencias nucleotídicas de genes utilizadas para clasificación de aislados de *G. lamblia*

Gen	Clasificación de grupos A y B	Clasificación de subgrupos AI y AII	Heterogeneidad entre grupo A y B	Fuente
ARNr	Sí	No	2 %	Hopkins <i>et al.</i> , 1997 Yong <i>et al.</i> , 2000 O'Handley <i>et al.</i> , 2000
gdh	Sí	Sí	11%	Monis <i>et al.</i> , 1996 Homan <i>et al.</i> , 2001
lpi	Sí	Sí	19%	Lu <i>et al.</i> , 1998 Amar <i>et al.</i> , 2002
β -giardina	Sí	Sí	5 %	Cacció <i>et al.</i> , 2002

Relación del genotipo de *G. lamblia* con síntomas clínicos en humanos

Nash *et al.* (1987) encontraron que la cepa GS (grupo B) es más patogénica que la WB (grupo A) en humanos. Desde entonces, se han realizado varios estudios en la búsqueda de la relación de los síntomas clínicos

de la giardiasis con los genotipos de *G. lamblia*. Para algunos autores, el grupo B está relacionado con los casos más severos de diarrea persistente (Homan *et al.*, 2001). En cambio, para otros, el grupo A es más común en casos de diarrea en niños (Read *et al.*, 2002) y en pacientes con distintas edades (Paintlia *et al.*, 1998). Por lo tanto, la inconsistencia de datos y la contrariedad de conclusiones, evitan relacionar el grupo de *G. lamblia* con los síntomas de una manera convincente. Por lo tanto, es necesario aportar más información a los resultados hasta hoy obtenidos para entender mejor las propiedades biológicas de los aislados de *G. lamblia* y su relación con la manifestación de síntomas en humanos.

En estudios previos, no se han encontrado diferencias entre aislados de *G. lamblia* obtenidos de pacientes sintomáticos y portadores asintomáticos. Al analizarse sus patrones isoenzimáticos, capacidad de crecimiento *in vitro*, daño celular *in vitro* e influencia en el crecimiento del organismo hospedero (Cedillo Rivera *et al.*, 1989 y 1991; Chávez *et al.*, 1995; Astiazarán-García *et al.*, 2000). Por lo tanto, es posible que una clasificación molecular, basándose en el polimorfismo genético, ayude a encontrar diferencias que se relacionen con su manifestación clínica.

HIPÓTESIS

Los aislados de *Giardia lamblia* obtenidos de pacientes sintomáticos y portadores asintomáticos pueden ser clasificados, de acuerdo a su polimorfismo genético en los genes triosa fosfato isomerasa (*tpi*) y glutamato deshidrogenasa (*gdh*), como grupo A o B empleando técnicas de caracterización molecular establecidas.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo, es realizar PCR selectivos ligados a análisis de RFLP (PCR-RFLP) sobre la base del gen *tpi* que permita clasificar los aislados de *G. lamblia* dentro de los genotipos A o B. La posterior secuenciación de productos de PCR es útil para comprobar la heterogeneidad genética de este marcador molecular.

Objetivos particulares

Otro objetivo específico es amplificar y secuenciar un segmento del gen *gdh* para corroborar los resultados obtenidos por PCR-RFLP y secuenciación del gen *tpi*. De esta manera, el objetivo final de este trabajo es estandarizar los análisis de PCR-RFLP para aplicarse en futuros estudios epidemiológicos de giardiasis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de los aislados de *G. lamblia*

Los aislados de pacientes sintomáticos se obtuvieron de dos niños de 3 años de edad, con diarrea y dolor abdominal que desaparecieron al tratarlos con metronidazol/albendazol (IMSS 10 / CIEA:0986:2 e IMSS 68 / CIEA:0687:2). Los aislados de portadores asintomáticos se obtuvieron de dos niños de 6 y 12 años de edad que acudieron al Hospital Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por otra causa distinta a cualquier malestar gastrointestinal (IMSS 50 / CIEA:0387:2 e IMSS 51 / CIEA:0387:3) (Cedillo Rivera *et al.*, 1989). La cepa WB, utilizada como control del grupo A, forma parte del inventario de organismos del laboratorio de nutrición clínica y la cepa GS/H7, utilizada como control del grupo B, fue adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC). Los aislados, se conservaron en medio de cultivo TYI-S-33 (Keister *et al.*, 1983), adicionado con DMSO (10%) como conservador y congelados en nitrógeno líquido.

Extracción de ADN genómico

Los trofozoitos criopreservados se descongelaron y se resuspendieron en medio de cultivo TYI-S-33 con el cual fueron lavados dos veces para eliminar el exceso de DMSO (ver detalles de reactivación de los trofozoitos en Anexo). Una vez lavados, se cultivaron a 37°C por 72 h o hasta alcanzar confluencia.

Después se cosecharon enfriando el tubo de ensayo que contiene el medio de cultivo en agua con hielo por 15 minutos, se centrifugaron a 1000xg por 10 minutos a 4°C y se lavaron dos veces con buffer PBS (pH 7.2) frío para eliminar el medio de cultivo (ver Anexo). A partir de la suspensión de trofozoitos lavados, se preparó una alícuota diluida 100 veces para contar el número de células en cámara de Neubauer y el resto se centrifugó a 1000xg por 10 minutos a 4°C. El sedimento celular se resuspendió en buffer de lisis (EDTA 0.1 mM, pH 8.0, SDS 0.25%) para después congelar en nitrógeno líquido por dos minutos y descongelar en baño de agua a 65°C por dos minutos. Este proceso se repitió cinco veces para lograr una destrucción celular eficiente (Deng *et al.*, 1999).

Se agregó un décimo del volumen total de proteinasa K (10 mg/mL) y se incubó a 37°C por 2 h. Después se agregaron 42 µL de CTAB 1% y 75 µL de NaCl 0.7 M para incubarse por 15 min a 65°C. El ADN se extrajo con 420 µL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó y separó la fase acuosa conteniendo el ADN y se realizó otra extracción con 420 µL

fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Por último, el ADN se precipitó con etanol absoluto (0.5 mL) e incubación a -20°C por un período mínimo de 2 h. El ADN se centrifugó a $10,000\times g$ por 20 minutos a 4°C y el precipitado se lavó con etanol al 70%. Finalmente, el sedimento de ADN se secó por evaporación al vacío (SpeedVac) para resuspenderlo en $100\ \mu\text{L}$ de buffer TE (Tris 10mM y EDTA 1mM, pH 8.0). El ADN se analizó por electroforesis en gel de agarosa (GIBCO) al 0.6 % y se visualizó por tinción con bromuro de etidio ($1\ \mu\text{g}/\text{mL}$). La concentración de ADN se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro UV/vis (Beckman DU530).

Amplificación de fragmentos de los genes *tpi* y *gdh* por PCR

Las diferencias que existen en la secuencia de nucleótidos de un gen entre los diferentes genotipos de *G. lamblia*, permite diseñar cebadores o iniciadores que amplifican exclusivamente el gen de cierto genotipo en particular. De esta manera, se diseñaron los iniciadores sentido TPIA-F (5'-GCGAGACAAGTGTTGAGATGCT-3'), y antisentido TPIA-R (5'-AGGTCAAGAGCTTACAACACGC-3') para obtener un fragmento de 579 pb del gen *tpi* de *G. lamblia* del grupo A. Los iniciadores sentido TPIB-F (5'-TGTTGTTGCTCCCTCCTTTGTG-3') y antisentido TPIB-R (5'-TAGGCAATTACAACGTTCTCCC-3'), fueron diseñados para la amplificación de un fragmento de 390 pb del gen *tpi* de *G. lamblia* grupo B. Ambos juegos de

iniciadores fueron diseñados en base en la secuencia del gen *tpi* de la cepa WB (grupo A) y la cepa GS/M (grupo B) con números de acceso en GenBank L02120 y L02116, respectivamente (Amar *et al.*, 2002).

Adicionalmente, se diseñaron los iniciadores sentido GDH-F (5'-GAGCAGATCCTGAAGAACTC-3') y antisentido GDH-R (5'-GCTTCTCGTTCTTGAGGTAC-3') para amplificar un fragmento de 535 pb del gen *gdh* de *Giardia lamblia* de ambos genotipos (A y B). Estos iniciadores se diseñaron en base a la secuencia del gen *gdh* de los aislados Ad-1 (genotipo A) y Ad-7 (genotipo B) con número de acceso en el banco de genes GenBank L40509 y L40508 respectivamente (Monis y cols., 1998). La secuenciación nucleotídica directa de los productos de amplificación de este fragmento, tiene el objetivo de corroborar la clasificación que se obtiene mediante los análisis de PCR-RFLP del gen *tpi*. Todos los iniciadores fueron sintetizados y purificados por Sigma-Genosys (E.U.A.).

Las reacciones de amplificación se realizaron por separado utilizando un juego de iniciadores por reacción. Cada reacción se realizó en un volumen de 50 μ L que contenían 50 ng de ADN templado, 3 μ L de $MgCl_2$ 25 mM, 5 μ L de buffer PCR 10X (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8.3 a 20°C), 2 μ L de mezcla de dNTPs 10 mM, 2 μ L de cada iniciador 20 μ M y 3 U de *Taq* polimerasa. El primer ciclo consistió en una desnaturalización de 94°C por 1 min, alineamiento a 60°C por 1 min y una amplificación a 72°C por 3 min. Un segundo ciclo consistió en 94°C por 1 min, 52°C por 1 min y 72°C por 3 min.

Después se continuó con 31 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 2 min. y una extensión final de 72°C por 10 min.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5 % y fueron teñidos en solución de bromuro de etidio 1 µg/mL. Después se fotografiaron sobre un trasluminador UV con una cámara digital (Kodak Digital Science).

Secuenciación de los productos de PCR

Los productos de amplificación fueron purificados utilizando columnas GFX™ (Amersham Pharmacia Biotech) para posteriormente determinar sus secuencias nucleotídicas completas mediante el método de dideoxidos o de Sanger en el laboratorio de estructura molecular (LMSE) de la Universidad de Arizona. Las secuencias nucleotídicas se alinearon entre sí y con las secuencias de los aislados control obtenidas del banco de genes: L02120 (*tpi* grupo A), U57897 (*tpi* grupo All), L02116 (*tpi* grupo B), L40509 (*gdh* grupo A), L40510 (*gdh* grupo All) y L40508 (*gdh* grupo B) utilizando los algoritmos BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y CLUSTAL W 1.8 (BCM search-launcher algorithms <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>).

Análisis de RFLP en productos de PCR

Los productos de amplificación del gen *tpi* se digirieron con las endonucleasas *Rsal* y *XhoI* por separado, mezclando 5 μ L (aproximadamente 250 ng de ADN) de muestra con 5 U de enzima e incubando por 2 h a 37°C (Amar *et al.*, 2002). La enzima *XhoI* corta solamente la secuencia del grupo B obteniendo dos fragmentos de 326 y 64 pb a partir del producto de 390 pb obtenido en la amplificación con los iniciadores TPIB-F y TPIB-R. Por otro lado, la enzima *Rsal* corta la secuencia del grupo AI en un sitio de restricción y en el grupo AII en dos sitios. Si el producto de amplificación con los iniciadores TPIA-F y TPIA-R pertenece al subgrupo AI, se obtienen dos fragmentos de 539 y 40 pb, y si pertenece al subgrupo AII se obtienen tres productos de 337, 202 y 40 pb. Los productos de las digestiones se separaron por tamaño en electroforesis horizontal en gel de agarosa al 3% y se tiñeron en solución de bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cantidad y calidad del ADN extraído

A partir de un cultivo de trofozoítos en confluencia, se obtuvieron de 2×10^5 a 5×10^6 células/mL, de las cuales se extrajeron de 24 a 50 μ g de ADN (Fig. 1). Este es un buen rendimiento de la cantidad de ADN obtenido, si

se considera que para cada reacción de PCR la cantidad necesaria de ADN templado fue de 40 a 50 ng. Por otra parte, los valores de 1.8 a 2.0 en la relación de absorbancia a 260/280 nm determinan el grado de pureza del ADN extraído (Sambrook *et al.*, 1989). En las cuatro muestras los valores de dicha relación variaron entre 1.4 y 1.7, indicando pureza en el ADN obtenido. La eficiencia en la extracción de ADN es fundamental debido a la necesidad de remover el exceso de proteínas y polisacáridos que interfieren en las reacciones de PCR-RFLP. Los métodos físicos para la destrucción celular, como la congelación en nitrógeno líquido y descongelación en baño a altas temperaturas (65°C), por sí solos no bastan para la extracción eficiente del ADN genómico como lo demostró Deng *et al.* (1999). Por lo tanto, adicionar extracciones químicas con proteinasa K y detergente CTAB son importantes para el buen rendimiento en la extracción de ADN (Clark y Diamond, 1992).

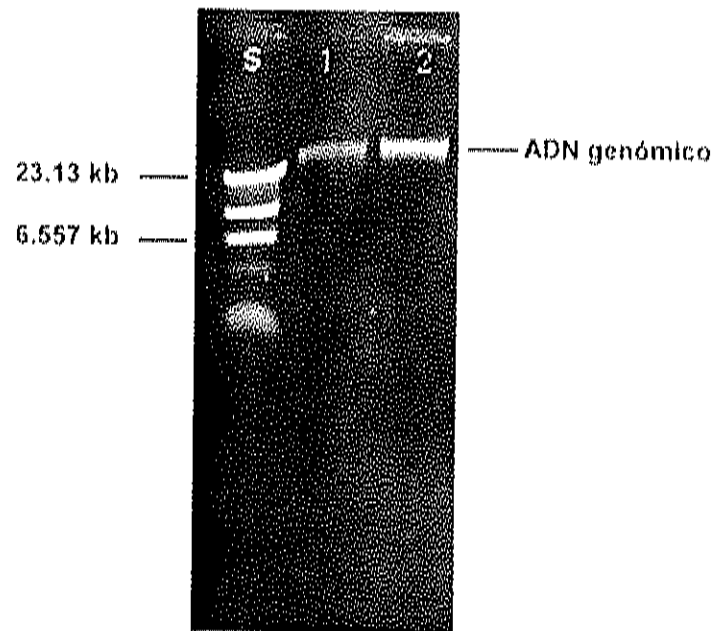


Figura 1. Electroforesis del ADN genómico de *G. lamblia* en gel de agarosa. Carril 1 y 2: ADN genómico de la cepa WB (control A). Carril S: estándar de peso molecular del fago λ digerido con *Hind*III.

Amplificación del fragmento del gen *tpi* por PCR

Se obtuvo el producto de amplificación de 579 pb con los iniciadores específicos para *G. lamblia* del grupo A (TPIA-F y TPIA-R) en la cepa control del grupo A (WB) y en los cuatro aislados de *G. lamblia* provenientes de muestras clínicas. No se obtuvo este producto de amplificación en la cepa control grupo B (GS/H7) (Fig. 2). Por el contrario, al utilizar los iniciadores específicos para el grupo B (TPIB-F y TPIB-R) en las reacciones de amplificación, el producto de 390 pb esperado se obtuvo solamente de la cepa GS/H7 y no en la WB ni de los cuatro aislados (Fig. 3). Estos resultados sugieren que los cuatro aislados clínicos de *G. lamblia* provenientes de pacientes sintomáticos y portadores asintomáticos, pertenecen al grupo A. Como se ha visto en trabajos anteriores (Lu *et al.*, 1998 y Amar *et al.*, 2002), el polimorfismo de las secuencias nucleotídicas del gen *tpi* ha demostrado ser una herramienta muy útil para su clasificación de los aislados de *G. lamblia* en grupos. En este trabajo, las modificaciones realizadas al método PCR-RFLP utilizado por Amar *et al.* (2002), permitió caracterizar los aislados de *G. lamblia* aislados de muestras clínicas.

Amplificación del fragmento del gen *gdh* por PCR

La amplificación por PCR de una fracción del gen *gdh* se realizó con el propósito de obtener productos en las cuatro muestras clínicas para su secuenciación directa. Los productos comprueban las regiones homólogas en la

secuencia del gen *gdh* entre los dos grupos (A y B). Los PCR realizados con los iniciadores GDH-F y GDH-R (para grupo A y B), resultó en el producto de 535 pb que se obtuvo de las cepas WB (control grupo A) y GS/H7 (control grupo B), así como de los aislados provenientes de las muestras clínicas (Figura 4). Una vez secuenciados los productos de PCR se compararon con la base de datos (Monis *et al.*, 1996) para corroborar los resultados obtenidos en la comparación de la secuencia del gen *tpi* de los diferentes aislados de *G. lamblia* analizados en este trabajo.

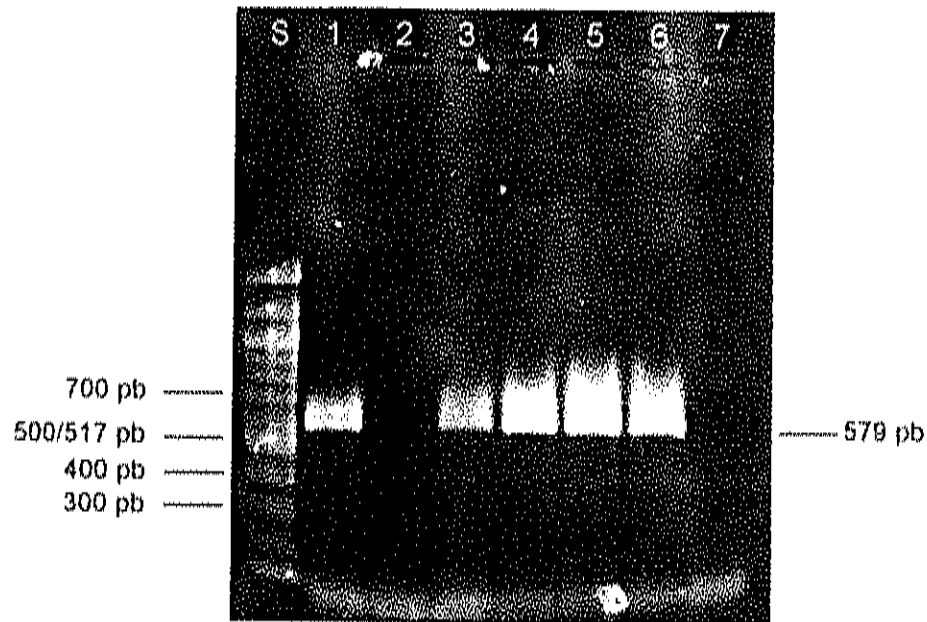


Figura 2. Electroforesis de los productos de PCR para el gen *tpi* del grupo A en gel de agarosa. Carril 1: cepa WB (grupo A). Carril 2: cepa GS (grupo B). Carriles 3 y 4: muestras IMSS 10 y 68 (pacientes sintomáticos). Carriles 5 y 6: muestras IMSS 50 y 51 (portadores asintomáticos). Carril S: marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder). Carril 7: control negativo que contiene todos los reactivos para PCR sin ADN templado.

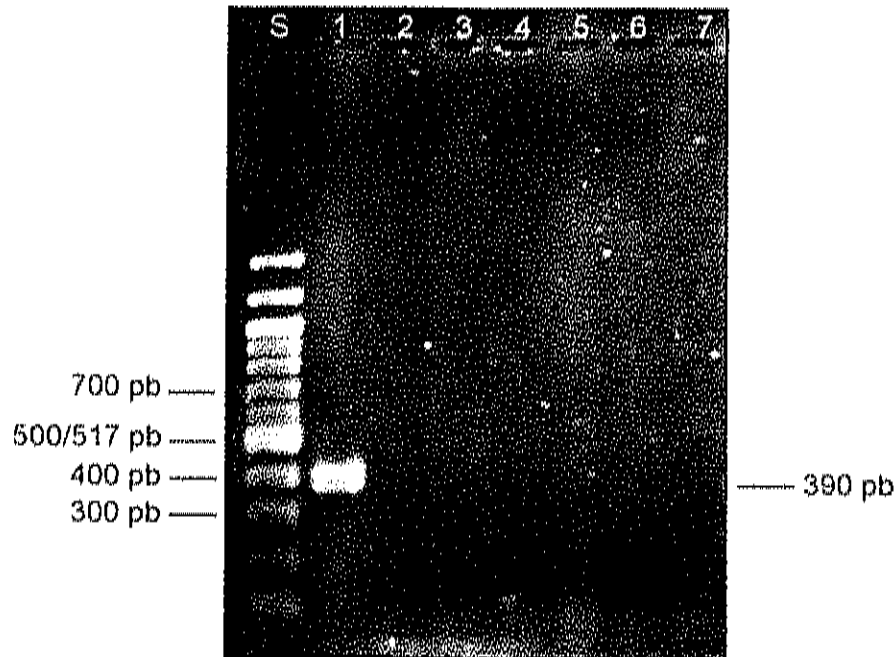


Figura 3. Electroforesis de los productos de PCR para el gen *tpi* del grupo B en gel de agarosa. Carril 1: cepa GS/H7 (grupo B). Carril 2: cepa WB (grupo A). Carriles 3 y 4: muestras IMSS 10 y 68 (pacientes sintomáticos). Carriles 5 y 6: muestras IMSS 50 y 51 (portadores asintomáticos). Carril S: marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder). Carril 7: control negativo que contiene todos los reactivos para PCR sin ADN templado.

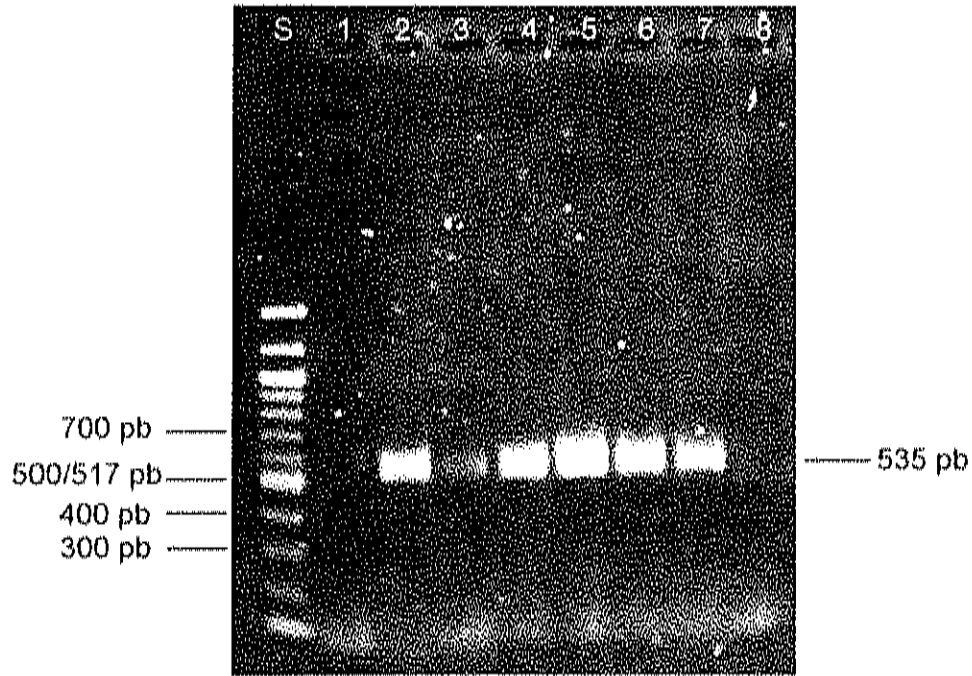


Figura 4. Electroforesis de los productos de PCR para el gen *gdh* en gel de agarosa. Carril 2: cepa WB (grupo A). Carril 3: cepa GS/H7 (grupo B). Carriles 4 y 5: muestras IMSS 10 y 68 (pacientes sintomáticos). Carriles 6 y 7: muestras IMSS 50 y 51 (portadores asintomáticos). Carril S: marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder). Carril 1: producto de 579 pb de la reacción de PCR con los iniciadores TPIA-F y R como control positivo. Carril 8: control negativo que contiene todos los reactivos para PCR sin ADN templado.

RFLP de los productos de amplificación del gen *tpi*

Los fragmentos amplificados de 579 pb (WB y muestras clínicas) y de 390 pb (GS/H7) de la sección del gen *tpi* se digirieron incubando con las endonucleasas *RsaI* y *XhoI*. Cuando el aislado de *G. lamblia* pertenece al grupo B, en la digestión del producto de 390 pb con *XhoI*, se obtienen dos fragmentos de 326 pb y 64 pb. Si se trata de muestras del grupo A no hay digestión. La figura 5 muestra que en la cepa GS/H7 (grupo B), la diferencia de tamaño entre el producto digerido y sin digerir es equivalente a 64 pb de acuerdo al marcador de peso molecular (Figura 5, línea S). En la cepa WB (grupo A), utilizada como control negativo, y en las cuatro muestras no se observa digestión. Esto indica que la enzima reconoció el sitio de restricción que existe sólo en la secuencia del grupo B (Paintlia *et al.*, 1998), por lo tanto, se confirma que los aislados de *G. lamblia* provenientes de las muestras clínicas pertenecen al grupo A.

Cuando la *G. lamblia* pertenece al grupo A (subgrupo AI), en la digestión con *RsaI* se obtienen dos fragmentos de 539 pb y 40 pb. Si se trata del subgrupo AII, se obtienen tres fragmentos de 337 pb, 202 pb y 40 pb. Por el contrario, si la muestra pertenece al grupo B no hay digestión, ya que no poseen los sitios de restricción reconocidos por la *RsaI*. Tanto en la cepa WB como en las cuatro muestras, la diferencia de tamaño entre el producto digerido y sin digerir es equivalente a 40 pb de acuerdo al marcador de peso molecular (Figura 6). En la cepa GS/H7 (grupo B), utilizado como control negativo, no se

observa digestión. Esto indica que la enzima solo reconoció un sitio de restricción y no dos, lo cual sugiere que las muestras clínicas pertenezcan al subgrupo A1 (Amar *et al.*, 2002).

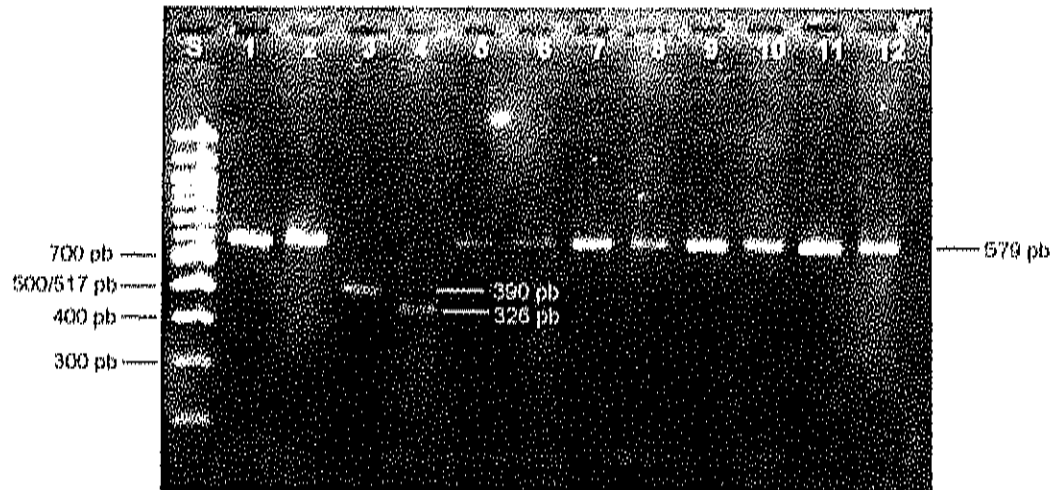


Figura 5. Electroforesis de productos de digestión con *XhoI*. Carriles 1 y 3: cepas control WB (grupo A) y GS (grupo B) respectivamente. Carriles 5 y 7: muestras IMSS 10 y 68 (pacientes sintomáticos). Carriles 9 y 11: muestras IMSS 50 y 51 (portadores asintomáticos). A la derecha de cada muestra se encuentran sus fragmentos obtenidos después de la incubación con la endonucleasa (carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12). Carril S: marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder).

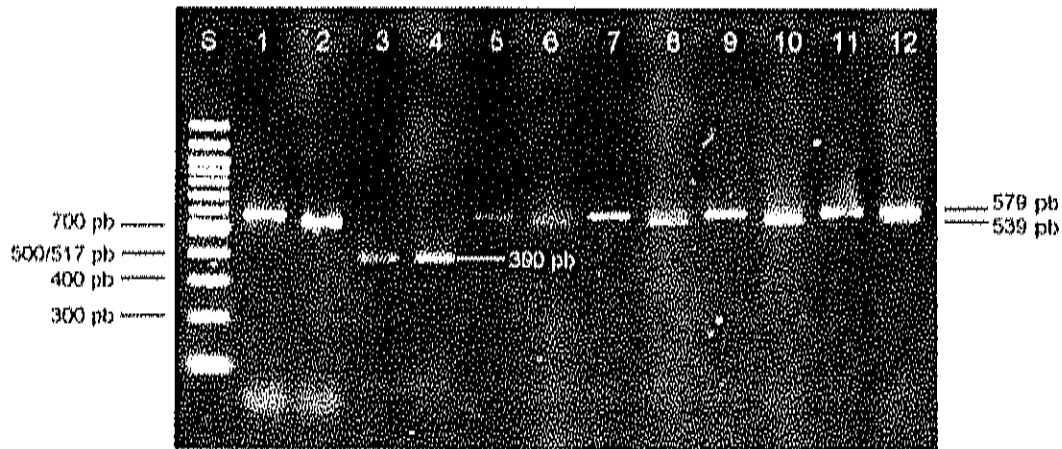


Figura 6. Electroforesis de productos de digestión con *RsaI*. Carriles 1 y 3: cepas control WB (grupo A) y GS/H7 (grupo B) respectivamente. Carriles 5 y 7: muestras IMSS 10 y 68 (pacientes sintomáticos). Carriles 9 y 11: muestras IMSS 50 y 51 (portadores asintomáticos). A la derecha de cada carril se encuentra su producto de digestión (carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12). Carril S: marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder).

Los análisis de PCR selectivos que utilizan iniciadores diseñados en base a la heterogeneidad del gen *tpi* entre *G. lamblia* grupo A y B, demostraron ser eficientes para la clasificación de aislados como se ha reportado en otros estudios (Amar *et al.*, 2002). Sin embargo, su acoplamiento a los análisis de polimorfismo en sitios de restricción (RFLP), proporciona una técnica más completa y confiable, cuya estandarización facilita el estudio de un mayor número de muestras.

Secuenciación de los productos de PCR

Los productos de amplificación del fragmento del gen *tpi* en las cuatro muestras fueron completamente secuenciados en ambas cadenas (100%) y después alineados con las secuencias de las cepas control WB (L02120), JH (U57897) y GS/H7 (L02116) reportadas en GenBank (Figura 7). Las cuatro muestras clínicas demostraron una identidad de 100 % con el grupo A. Con respecto al subgrupo AII, la similitud fue de 0.8% (5 bases sustituidas de 557) y 17.7% (99 bases sustituidas de 557) con el grupo B. Estas diferencias fueron semejantes a las observadas por otros autores que han estudiado el polimorfismo de este gen (Lu *et al.*, 1998; Amar *et al.*, 2002). La secuencia de este segmento del gen *tpi* permite observar la existencia del sitio de restricción reconocido por la endonucleasa *RsaI* que clasifica las muestras clínicas en el subgrupo AI. De la misma manera, se demuestra la ausencia del sitio de

restricción para la endonucleasa *Xho*I, lo cual explica la resistencia a la digestión con esta enzima (Figura 5).

El segmento del gen *gdh* amplificado en las cuatro muestras clínicas, también fue secuenciado en su totalidad (Figura 8) y la similitud entre las cuatro muestras entre sí y el grupo A fue también del 100%. Se observó una semejanza de 1.0% (5 bases sustituidas de 495) con el grupo AII y en 11.1% (55 bases sustituidas de 495) con el grupo B. Estas diferencias entre los subgrupos AI, AII y el grupo B, se asemejan a las observadas por Monis (1996).

Al comparar los segmentos de los genes *tpi* y *gdh*, entre el grupo A y el grupo B, se obtiene la misma similitud que cuando se comparan segmentos de los genes completos (82% para el gen *tpi* y 89% para el gen *gdh*). Por lo tanto, no es necesario amplificar todo el gen para determinar el polimorfismo ya que la diversidad genética entre estos genes es relativa al tamaño de la secuencia.

```

L02120      1  TCCGACATCGGTTTCAGAGCGTGTGTATGATGAGCCGCTCTGTGAAAGACGACAGATCTACCGGGGCGCTCCGCGCGACAGGTCCTAGCGTCCCGTTCAGAGGAG 111
tp1-10      1  .....
tp1-58      1  .....
tp1-50      1  .....
tp1-51      1  .....
U57897      1  .....
L02116      1  G.T.....GC...A...A...A...T.....C...A.T...G.T.T...G.....T.....C.A.

L02120      111  GGATGACGGTCACTCTTCGCTGGGAGCACTTTCGACGACGCTTCGACGACGCGGACGATGCGATGAGGTGATATATGATGCGGACCTTGCAGAGAGAGGATTCGAGGAG 111
tp1-10      111  .....
tp1-58      111  .....
tp1-50      111  .....
tp1-51      111  .....
U57897      111  T.....T.T.....AC.....C...T.A.....TPA...T.....T.P.T.T...CCTGGG...T...AGG.....A.T.....A.T.....A
L02116      111  T.....T.T.....AC.....C...T.A.....TPA...T.....T.P.T.T...CCTGGG...T...AGG.....A.T.....A.T.....A

L02120      221  TCCAGCATGCTCTGCGAAGGAGGCTTTCATCTCATGACGCGCCGCTTCGCTCCATTCGCAAGGCGCGCTGCTGCGACGCGGCGGACGAGCGGCGGATGCGAAGGCGGATTCG 221
tp1-10      221  .....
tp1-58      221  .....
tp1-50      221  .....
tp1-51      221  .....
U57897      221  .....
L02116      221  A...A.T.A...G.A.C...A...C.T...G...T.C...T.C...A.G...A...G...A...C...

L02120      331  AAMPGCGGTTCGCGCAGAGAGCTTTCGCGGAGGCGGACGACGATTCGCGATGATTCGCGATTCGCGCATTCGCGAAGGCGGATTCGCGAAGGCGGATTCGCGAGGCTTGCAGAGG 331
tp1-10      331  .....
tp1-58      331  .....
tp1-50      331  .....
tp1-51      331  .....
U57897      331  C...A...A...A...C.A.A.T.G...C...C...C.T.A.G.T...G.T...C...C...

L02120      441  TTGCGCGCTTCCTTCGCGGCGGCTTCCTCGACGCGGAGGCTTATGCGATGATTCGCGATGATTCGCGATTCGCGATTCGCGATTCGCGATTCGCGATTCGCGATTCGCG 557
tp1-10      441  .....
tp1-58      441  .....
tp1-50      441  .....
tp1-51      441  .....
U57897      441  C.....A...C...A.T.....A...CA...T.T...CS...T.G...A...GCTT...A...
L02116      441  C.....A...C...A.T.....A...CA...T.T...CS...T.G...A...GCTT...A...

```

Figura 7. Alineación múltiple del fragmento de la secuencia del gen *triosa fosfato isomerasa* de los aislados clínicos de *G. lambdella*. La secuencia es delimitada por los indicadores sentido y antisentido. Los aislados se indican con los números: 10 y 68 (asintomáticos) y 50 y 51 (asintomáticos). Las cepas VB (grupo A), 84 (grupo AII) y GS (grupo B) se indican con su número de acceso en GenBank (L02120, U57897 y L02116 respectivamente). Los puntos indican bases iguales al grupo A). Las diferencias se señalan en negrita y los sitios de restricción para *Xba*I (CTCGAG) y *Rsa*I (GTAC) con subrayado.

Los segmentos de los genes *tpi* y *gdh* amplificados entre las cuatro muestras fueron 100 % similares, lo cual demuestra que, basándose en el polimorfismo de estos genes, no hay diferencia entre las muestras clínicas obtenidas de pacientes sintomáticos y de portadores asintomáticos. Esto concuerda con los resultados de los trabajos realizados anteriormente con estos aislados, en los que no se encontró diferencia en diversas propiedades fenotípicas como son patrones isoenzimáticos (Cedillo-Rivera *et al.*, 1989), capacidad de crecimiento *in vitro* (Cedillo-Rivera *et al.*, 1991), capacidad de daño celular *in vitro* (Chávez *et al.*, 1995) y efecto en el crecimiento de jerbos (Astiazarán-García *et al.*, 2000).

Los grupos de *G. lamblia* A1 y B han sido encontrados en otros organismos, como perros y ganado, al igual que en humanos, mientras el grupo A11 solo se ha encontrado en humanos (Thompson *et al.*, 2000). El riesgo zoonótico es mayor en los grupos A1 y en menor caso el grupo B, por lo tanto, existe la posibilidad de que los cuatro aislados clínicos, pertenecientes al grupo A1, sean de origen zoonótico.

Las cuatro muestras clínicas de *G. lamblia* obtenidas de pacientes sintomáticos y portadores asintomáticos pertenecieron al grupo A1. Esta tendencia es contraria a lo encontrado por otros autores que relacionan la presencia de síntomas con el grupo B (Nash *et al.*, 1987; Homan *et al.*, 2000) o con el grupo A (Read *et al.*, 2002; Paintlia *et al.*, 1998). Para establecer una relación contundente entre el genotipo de *G. lamblia* y la manifestación

clínica de la infección, son necesarios análisis epidemiológicos que incluyan una evaluación objetiva apropiada de los síntomas de los pacientes y un mayor número de muestras.

CONCLUSIÓN

La caracterización molecular realizada en base al polimorfismo en la secuencia de los genes *tpi* y *gdh* indica que los cuatro aislados de *G. lamblia* analizados, pertenecen al grupo A, subgrupo A1. Esto abre la posibilidad de que en los casos de giardiasis en México, predomine un solo genotipo de *G. lamblia*, aunque es evidente la necesidad de estudios a nivel epidemiológico. Sin embargo, en este estudio no se encontró relación entre la manifestación clínica de la giardiasis y el genotipo de *G. lamblia* debido a la semejanza molecular en los genes estudiados entre los aislados provenientes de pacientes sintomáticos y portadores asintomáticos. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la presencia de síntomas en una giardiasis se relaciona principalmente con las condiciones del organismo hospedero, aunque no es posible descartar que existan diferencias en otros genes entre las cepas de *G. lamblia*.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 14(3), 447-475.
- Amar, C.L.F., Dear, P.H., Pedraza Díaz, S., Looker, N., Linnane, E. y McLauchlin, J. 2002. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. J Clin Microbiol. 40(2), 446-452.
- Astiazarán-García, H., Espinosa-Cantellano, M., Castañón, G., Chávez-Munguía, B., Martínez-Palomo, A., 2000. *Giardia lamblia*: Effect of Infection with Symptomatic and Asymptomatic Isolates on the Growth of Gerbils (*Meriones unguiculatus*). Exp. Parasitol. 95, 128-135
- Buret, A., Gall, D. G., Nation, P. N. and Olson, M. E. 1990. Intestinal protozoa and epithelial cell kinetics, structure and function. Parasitology Today. 6 (12), 375-380.
- Berkman, D. S., Lescano, A. G., Gilman, R. H., López, S. L. and Black, M. M. 2002. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. Lancet. 16;359 (9306), 564-71

- Cacció, S.M., De Giacomo, M., Pozio, E., 2002. Sequence analysis of the *β-giardin* gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cyst from human faecal samples. *Int. J. Parasitol.* 32, 1023-1030.
- Cedillo-Rivera, R., Enciso-Moreno, J.A., Martínez-Palomo, A., Ortega-Pierres, G., 1989. *Giardia lamblia*: isoenzyme analysis of 19 axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 83,644-646.
- Cedillo-Rivera, R., Enciso-Moreno, J.A., Martínez-Palomo, A., Ortega-Pierres, G., 1991. Isolation and axenization of *Giardia lamblia* isolates from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Arch Invest Méd (Mex.)* 22, 79.
- Cedillo-Rivera, R., Darby, J. M., Enciso-Moreno, J. A., Ortega-Pierres, G. and Ey, P. L. 2003. Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in México. *Parasitol. Res.* 90, 119-123.
- Chávez, B., González-Mariscal, L., Cedillo-Rivera, R., Martínez-Palomo, A., 1995. *Giardia lamblia*: In vitro cytopathic effect of human isolates. *Exp Parasitol.* 80, 133-138.
- Clark, C.G. y Diamond, L.S. 1992. The Laredo strain and other *Entamoeba histolytica*-like amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46, 11-18.

- Deng, M., Cliver, D. O., 1999. Rapid DNA extraction methods and new primers for randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Giardia duodenalis*. J Microbiol. Meth. 37, 193-200.
- Farthing, M. J. G. 1992. New perspectives in giardiasis. J. Med. Microbiol. 37, 1-2.
- Furness, B. W., Beach, M. J. and Roberts, J. M. 2000. Giardiasis surveillance United States, 1992-1997. Morb. Mortal. Wkly. Rep. CDC Surveill. Summ. 49 (SS-7), 1-16.
- Goto, R., Panter-Brick, C., Northrop-Clewes, C. A., Manahdhar, R. and Tuladhar, N. R. 2002. Poor intestinal permeability in mildly stunted Nepali children: associations with weaning practices and *Giardia lamblia* infection. Br. J. Nutr. 88 (2): 141-9.
- Harms, G., Dorner, F., Bienzle, U., Stark, K. 2002. Infections and diseases after travelling. Dtsch. Med. Wochenschr. 127(34-35), 1748-53.
- Homan, W. L., van Eckevort, F. H., Limper, L., van Eys, G. J., Schoone, G. J., Kasprzak, W., Majewska, A. C. and van Knapen, F. 1992. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. Parasitol. Res. 78, 316-323
- Homan, W. L. and Mank, T. G. 2001. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. Int J Parasitol. 31, 822-826.
- Hopkins, R.M., Meloni, B.P., Groth, D.M., Wetherall, J.A., Reynoldson, J.A. y Thompson, R.C.A. 1997. Ribosomal RNA Sequencing Reveals

- Differences between the Genotypes of *Giardia* Isolates Recovered from Humans and Dogs Living in the Same Locality. *J. Parasitol.* 83(1), 44-51.
- Keister, D. B. 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 44, 487-488.
- Kucheria, T.V., Polushkina, M.G., Anishchenko, N.V., Gorban'Lja, Avdiukhina, T.I. 2002. Outbreak of Giardiasis at a Preschool Children Establishment in the Town of Perm. *Med Parasitol (Mosk)* 2, 51-3.
- Larrosa-Haro, A., Ruiz-Pérez, M. y Aguilar-Benavides, S. 2002. Utility of Studying Feces for the Diagnosis and Management of Infants and Preschool Children with Acute Diarrhea. *Salud Pública Mex.* 44, 328-34.
- Lu, S., Baruch, A. y Adam, R.D. 1998. Molecular comparison of *Giardia lamblia* isolates. *Int J Parasitol.* 28, 1341-1345.
- Mayrhofer, G., Andrews, R. H., Ey, P. L. and Chilton, N. B. 1995. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology.* 111, 11-17.
- Monis, P., Andrews, R., Mayrhofer, G., Homan, W. L., Limper, L., Ey, P., 1996. Molecular Genetic Analysis of *Giardia intestinalis* Isolates at the Glutamate Dehydrogenase Locus. *Parasitology* 112, 1-12.
- Monis, P., Andrews, R., Mayrhofer, G., Mackrill, J., Kulda, J., Isaac-Renton, J. L. y Ey, P. L. 1998. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by

- genetic análisis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitology*. 116, 7-19
- Muñiz, P. T., Ferreira, M. U., Ferreira, C. S., Conde, W. L. y Monteiro, C. A. 2002. Intestinal parasitic infections in young children in Sao Paulo, Brazil: prevalences, temporal trends and associations with physical growth. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 95 (5), 503-12.
- Nash, T.E., Herrington, D. A., Losonsky, G. A., Levine, M. M. 1987. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* 156, 974-984.
- Nash, T.E., Conrad, J. T. and Mowatt, M. R. 1995. *Giardia lamblia*: identification and characterization of a variant-specific surface protein gene family. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42, 604-609.
- Northrop-Clewes, C. A., Rousham, E. K., Mascie-Taylor, C. N. and Lunn, P. G. 2001. Anthelmintic treatment of rural Bangladeshi children: effect on host physiology, growth, and biochemical status. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (1), 53-60.
- O'Handley, R.M, Olson, M, Fraser, D, Adams, P y Thompson, R.C.A. 2000. Prevalence and genotypic characterization of *Giardia* in calves from Western Australia and Western Canada. *Vet Parasitol.* 90, 193-200.
- Paintlia, A.S, Descoteaux, S., Spencer, B., Chakraborti, A., Mahajan, R.C, Ganguly, N. y Samuelson, J. 1998. *Giardia lamblia* groups A and B among young adults in India. *Clin Infect Dis* 26,190-191.

- Read, C., Walters, J., Robertson, R., Thompson, R.C.A. 2002. Letter to editor: Correlation between genotype of *Giardia lamblia* and diarrhoea. *Int J Parasitol.* 32, 229-231.
- Sackey, M. E., Weigel, M. M. and Armijos, R. X. 2003. Predictors and nutritional consequences of intestinal parasitic infections in rural Ecuadorian children. *J. Trop. Pediatr.* 49 (1), 17-23
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2da ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U. S. A.
- Shubair, M. E., Yassin, M. M., al-Hindi, A. I., al-Wahaidi, A. A., Jadallah, S. Y., Abu Shaaban, N. al-D. 2000. Intestinal parasites in relation to haemoglobin level and nutritional status of school children in Gaza. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 30 (2): 365-75.
- Thompson, R.C.A., Hopkins, R. y Homan, W. 2000. Nomenclature and Genetic Grouping of *Giardia* infecting Mammals. *Parasitology today.* 16(5), 210-17.
- Yong, T.S., Park, S.J., Hwang, U.W., Yang, H.W., Lee, K.W., Min, D.Y., Rim, H.J., Wang, Y. and Zheng, F. 2000. Genotyping of *Giardia lamblia* Isolates from Humans in China and Korea using Ribosomal DNA Sequences. *J Parasitol.* 86(4), 887-891.

ANEXO

En esta sección se incluye información detallada acerca de la metodología utilizada en este trabajo para la caracterización molecular de aislados de *G. lamblia*. Aquí se describe desde la forma de reactivar los trofozoitos criopreservados, hasta la electroforesis en gel de agarosa para el análisis de los productos de digestión con endonucleasas. Esta metodología se puede adaptar al tipo de muestra que se va a estudiar, es decir, si los aislados de *G. lamblia* se encuentran en forma de quiste o si se trata de cualquier otro organismo.

Extracción de ADN Genómico a Partir de Trofozoitos Criopreservados:

Primer paso.- Reactivación de Trofozoitos

Los trofozoitos criopreservados se encuentran en medio de cultivo TYI-S-33 adicionado con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% como conservador. Para el crecimiento de los trofozoitos es preciso eliminar este DMSO y resuspenderlos en un medio TYI-S-33 nuevo.

Materiales.

- Incubadora 37°C
- Tubo de ensayo 13 x 100 con tapón de rosca
- Microscopio
- Vaso de precipitado de 250 ml.

Reactivos.

- Medio de cultivo TYI-S-33
- Solución de Benzaldehído con agua (1:1)

Procedimiento.

- 1) El primer paso consiste en retirar los trofozoitos del nitrógeno líquido y descongelar a temperatura ambiente. Una vez descongelados, pasar el contenido a dos tubos de ensayo de 13 x 100 con tapón de rosca.
- 2) Llenar el tubo con medio TYI-S-33 e incubar a 37°C por 15 minutos.
- 3) Observar al microscopio con objetivo 10x la presencia de trofozoitos adheridos a la superficie del tubo, En el caso de no observar adherencia de trofozoitos, continuar incubando hasta un máximo de media hora.
- 4) Si los trofozoitos se adhieren al vidrio, decantar el medio de cultivo .

Nota: el medio de cultivo debe de desecharse en un vaso de precipitado de 250 mL que contenga un poco de benzaldehído. Repetir dos veces los pasos 2 y 3 para eliminar el medio de cultivo que contiene DMSO.

- 5) Incubar a 37°C por 72 horas o hasta observar confluencia, es decir, que se forme una capa de trofozoitos en el tubo con el medio de cultivo.

Segundo Paso.- Cuenta Celular

La cuenta de células es importante porque, además de indicar la eficiencia en el lavado de trofozoitos, permite relacionar la cantidad de células con la cantidad de ADN extraído. Esta información es de gran valor si existe la necesidad de optimizar el material con el que se cuenta.

Materiales.

- Baño de agua con hielo
- Cronómetro
- Centrifuga
- Vaso de precipitado de 250 mL
- Tubos cónicos de 1.5 μ L
- Micropipetas de 20 μ L y 1 mL
- Puntas para micropipeta
- Hemacitómetro o cámara de Neubauer
- Pipeta Pasteur
- Contador de células

Reactivos.

- Benzaldehído
- Buffer PBS (16 mM K_2HPO_4 , 4 mM KH_2PO_4 , 15 % NaCl y 0.03 % de NaN_3 , pH 7.2) frío

Procedimiento

- 1) Colocar el tubo con el medio en agua con hielo por 15 min para despegar los trofozoitos del vidrio.
- 2) Centrifugar a 1000xg por 10 min a 4°C. Después, decantar el sobrenadante en solución con benzaldehido.
- 3) Agregar buffer PBS (pH 7.2) frío, agitar y centrifugar a 1000xg por 10 min. a 4°C. Repetir este paso con el fin de lavar los trofozoitos.
- 4) Después de centrifugar, eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular con 1 mL de buffer PBS (pH 7.2)
- 5) Preparar una alícuota (dilución 100x) con 10 µL de esta suspensión y 990 µL de buffer PBS.
- 6) Contar las células en un hemacitómetro (cámara de Neubauer) utilizando los cuatro cuadros de las esquinas para cuenta de glóbulos blancos. El número total de células dividirlo entre 4 y con el total de células contadas se calcula la cantidad de trofozoitos por mL con la siguiente ecuación:

$$(\# \text{ de células contadas}) (100) (1000) = \text{trofozoitos/mL}$$

Tercer paso.- Extracción de ADN genómico

En la extracción de ADN es importante remover el exceso de proteínas y polisacáridos, ya que éstos interfieren en las reacciones de PCR-RFLP. En este trabajo se alternan la extracción química, utilizando proteinasa K y detergente CTAB (Clark y Diamond, 1992), con la extracción física, utilizando ciclos de congelación y descongelación con nitrógeno líquido y baño de agua a 65°C (Deng *et al.*, 1999) para un mayor rendimiento del ADN obtenido.

Materiales.

- Centrífuga
- Tubos cónicos de 1.5 mL
- Pipeta Pasteur
- Vasos de precipitado de 500 mL
- Incubadora a 37, 55 y 65°C
- Pinzas
- Micropipeta
- puntas para micropipeta

Reactivos

- Proteinasa K (10 mg/mL)
- Buffer de lisis (EDTA 0.1 M, pH 8.0, SDS 0.25%) esterilizado
- Nitrógeno líquido, **Nota:** El nitrógeno líquido debe manejarse con mucha precaución, se requiere el uso de bata, lentes protectores y guantes.

- Solución de NaCl 0.7 M
- Detergente CTAB al 1 %
- Cloroformo/alcohol isoamílico (24:1)
- Fenol saturado con Tris HCl, pH 8.0
- RNAsa A(1 mg/mL)
- Acetato de sodio (NaOAc) 3 M, pH 5.2
- Etanol frío, 100 % y 70%
- Evaporador Speed Vac (opcional)
- Buffer TE (Tris 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0) estéril

Procedimiento.

- 1) Centrifugar la suspensión madre de trofozoitos a 1000xg por 10 minutos a 4°C, decantar el sobrenadante y el sedimento celular resuspenderlo con buffer de lisis (EDTA 0.1 M, pH 8.0, SDS 0.25%) estéril. Este contenido se transfiere a un tubo cónico de 1.5 mL.
- 2) Sumergir el microtubo (ayudado por las pinzas) en un vaso de precipitado de 500 mL con nitrógeno líquido por dos minutos y después descongelar sumergiéndolo en baño de agua a 65°C por dos minutos. Repetir el proceso cinco veces (Deng y Cliver, 1999).
- 3) Agregar 2.5 µL de proteinasa K (10 mg/mL), agitar e incubar a 55°C por 2 horas como mínimo.

- 4) Agregar 75 μL de NaCl 0.7 M y 42 μL de CTAB al 1%, mezclar bien e incubar por 15 minutos a 65°C.
- 5) Agregar 420 μL de una mezcla (24:1) de cloroformo/alcohol isoamílico y mezclar.
- 6) Centrifugar a 14000xg por 10 minutos a 4°C. Eliminar cuidadosamente con ayuda de una micropipeta la capa inferior de solventes y la capa intermedia de proteínas sin perder la fase acuosa (capa superior).
- 7) Agregar 420 μL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). **Nota:** se recomienda que se agreguen por separado 210 μL de fenol y 210 μL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (Clark y Diamond, 1992).
- 8) Centrifugar a 14000xg por 10 minutos.
- 9) Recuperar la fase acuosa con el mismo cuidado procurando no perder muestra.
- 10) Agregar 10 μL de RNAsa A (1 mg/mL) y 1/10 de volúmen (aprox. 20 μL) de acetato de sodio (NaOAc) 3 M, pH 5.2. Incubar a 37°C por dos horas como mínimo.
- 11) Precipitar el ADN agregando dos volúmenes de etanol absoluto frío (aprox. 400 μL) y reposar a -20°C toda la noche o por dos horas como mínimo.
- 12) Centrifugar a 10,000 xg por 20 minutos a 4°C.
- 13) Lavar el sedimento con etanol al 70% y centrifugar igual.

- 14) Decantar el etanol con la ayuda de una micro pipeta (Nota: tener precaución de no perder el sedimento).
- 15) Secar el sedimento al aire cubriéndolo ligeramente con papel aluminio o si es posible en un evaporador Speed Vac por 10 minutos.
- 16) Finalmente, resuspender en 100 μ L de buffer TE 1x (Tris 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0) esterilizado.

Cualificación del ADN Extraído

La calidad del ADN extraído se determina por electroforesis en gel de agarosa al 0.6 % de acuerdo al manual de laboratorio "Molecular Cloning", capítulo seis (Sambrook *et al.*, 1989).

Cuantificación del ADN

A partir del ADN extraído, se utilizan 10 μ L y se diluyen con 990 μ L (dilución 100X) de buffer TE 1X (Tris 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0). En un espectrofotómetro leer las absorbancias de esta solución a 260 y 280 nm. Con los valores obtenidos, calcular la relación 260/280, la cual indica pureza en el ADN extraído si sus valores son de 1.8 a 2.0. Considerando que la densidad óptica (OD) de 1 a 260 nm corresponde aproximadamente a 50 μ g/mL de ADN de doble cadena y tomando en cuenta que se realizó la dilución anteriormente descrita, calcular la concentración de ADN por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Conc. ADN } (\mu\text{g } / \mu\text{L}) = (\text{Absorbancia a } 260 \text{ nm} \times 50 \times 100) / 1000$$

Amplificación por PCR

Reacción de PCR

Para las amplificaciones por PCR se deben de seguir el método de amplificación descrito por Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989).

Materiales.

- Termociclador
- Micro pipetas para manejar volúmenes de 1 μL hasta 100 μL .
- Puntillas para micro pipeta
- Puntillas para micro pipeta con barrera protectora
- Tubos para PCR estériles y libres de DNAsa y RNAsa
- Guantes de látex
- Gradilla para microtubos, si es posible una micro placa para ensayos de ELISA

Reactivos.

- Buffer para PCR 10X (Tris-HCl 100 mM, KCl 500mM, pH 8.3)
- Cloruro de magnesio (MgCl_2) 25mM
- Mezcla de deoxinucleótidos (dNTP's) 10 mM

- Primers o iniciadores sentido (forward) y antisentido (reverse) 20 μM cada uno
- Enzima *Taq* polimerasa
- Agua grado mili Q o grado HPLC estéril
- ADN templado llevado a una concentración de 40 a 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Procedimiento.

Además de las instrucciones dadas en el manual "Molecular Cloning" de Sambrook *et al.* (1989), se recomienda tomar en cuenta las siguientes sugerencias:

- 1) Todo material debe ser esterilizado previamente e irradiado con luz UV por 5 minutos aproximadamente. Nota: evitar irradiación con UV en reactivos que contengan ADN (primers, dNTP's, ADN templado). Todos los reactivos deben mantenerse en hielo excepto el agua, el buffer PCR 10X y el MgCl_2 .
- 2) Marcar los tubos para PCR con plumón.
- 3) Es necesario que se tenga un esquema o tabla de las reacciones de PCR en la libreta de laboratorio personal con los volúmenes a emplear de cada reactivo. Agregar las cantidades indicadas en la tabla que se muestra a continuación (Tabla 1) en orden descendente, excepto el ADN templado y la polimerasa que se agregan en este orden al final.

Tabla 1. Esquema para la adición de cada reactivo a la reacción de PCR

Reactivo	Control positivo	Reacción A	Reacción B	Control negativo	Concentración final
ADN control	50 ng	-	-	-	50 ng
ADN muestra A	-	50 ng	-	-	50 ng
ADN muestra B	-	-	50 ng	-	50 ng
Buffer PCR 10X	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L	1 X
MgCl ₂ (25 mM)	3 μ L	3 μ L	3 μ L	3 μ L	75 pM
dNTPs (10 mM)	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	20 pM
Primer sentido (forward)	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	0.04 p
Primer antisentido (reverse)	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	0.04 pM
Taq polimerasa	2 μ L*	2 μ L*	2 μ L*	2 μ L*	2 U
Agua	†	†	†	†	-
Volumen total	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	-

* Dos unidades de enzima por reacción, en el caso de utilizar enzima en diferentes concentraciones, ajustar el volumen.

† El volumen debe ajustarse para completar los 50 μ L del volumen total, también se pueden hacer reacciones con diferentes volúmenes finales, solo manteniendo las concentraciones finales de todos los componentes

Una vez mezclados todos los reactivos, tapar bien los tubos y evitar la formación de burbujas. Después se colocan las muestras en el termociclador e iniciar los siguientes ciclos de amplificación:

Tabla 2. Ciclos para la reacción de PCR.

Ciclo	Desnaturalización	Alineación	Amplificación
Primero	94°C por 3 min.	60°C por 1 min.	72°C por 3 min.
Segundo	94°C por 3 min.	52°C por 1 min.	72°C por 3 min.
Ciclo de 30 repeticiones	94°C por 1 min.	55°C por 1 min.	72°C por 3 min.
Terminación	72°C por 10 min.		
Final	4°C por siempre		

Una vez terminadas las reacciones de amplificación, los productos se analizan por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de acuerdo al manual de laboratorio "Molecular Cloning" Sambrook *et al.* (1989). Las condiciones de reacción pueden variar de acuerdo al tipo de termociclador, primers y ADN templado utilizados.

Purificación de productos de PCR

Para la purificación de los productos obtenidos por PCR se utilizan columnas GPX™ siguiendo el protocolo de purificación proporcionado por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech). Existen otros sistemas de purificación que también pueden ser utilizados

Análisis de Polimorfismo en Sitios de Restricción (RFLP)

Este análisis permite reconocer los sitios de restricción para determinadas endonucleasas en una secuencia genética, y en base a la presencia de estos sitios, es posible comprobar el polimorfismo genético entre los diferentes organismos.

Digestión con endonucleasa *RsaI*

Materiales

- Incubadora a 37°C
- Micropipeta
- Puntillas para micropipeta
- microtubo Eppendorf 1.5 mL

Reactivos.

- Buffer NE-1 10X (incluido con la enzima)

- Endonucleasas *Rsa*I y *Xho*I
- Agua grado mili Q o HPLC estéril

Procedimiento.

- 1) Mezclar por cada reacción en un microtubo de 1.5 mL, 5 μ L del producto purificado (50 a 100 ng de ADN)
- 2) Agregar 1.3 μ L de buffer NE-1 10X (incluido con la enzima)
- 3) Agregar 0.5 μ L (5 Unidades) de la enzima *Rsa* I
- 4) Agregar 1.5 μ L de agua grado mili Q o HPLC estéril
- 5) Incubar a 37°C por 2 horas

Nota: los volúmenes dependen de la concentración de ADN con la que se cuente, por lo tanto, estos valores se pueden ajustar.

Digestión con endonucleasa *Xho*I

Procedimiento.

- 1) Mezclar por cada reacción en un microtubo Eppendorf 5 μ L del producto purificado
- 2) Agregar 1.0 μ L de buffer NE-2 10X (incluido con la enzima)
- 3) Agregar 1.0 μ L de buffer BSA 10X (incluido con la enzima)
- 4) Agregar 0.25 μ L (5 Unidades) de la enzima *Xho* I
- 5) Agregar 2.75 μ L de agua grado mili Q o HPLC estéril
- 6) Incubar a 37°C por 2 horas

- 7) Una vez terminadas las reacciones de digestión, los productos se analizan por electroforesis en gel de agarosa al 2,5 % de acuerdo al manual de laboratorio "Molecular Cloning" Sambrook et al. (1989).

REFERENCIAS

- Clark, C.G. y Diamond, L.S. 1992. The Laredo strain and other *Entamoeba histolytica*-like amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. Mol. Biochem. Parasitol. 46, 11-18.
- Deng, M., Cliver, D. O., 1999. Rapid DNA extraction methods and new primers for randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Giardia duodenalis*. J Microbiol. Meth. 37, 193-200.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N. Y., U. S. A.