



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA OLIGOMERIZACIÓN DE
TRIOSAFOSFATO ISOMERASA EN EL ENQUISTAMIENTO DE *Giardia*
lamblia.**

AUTOR:

GERMÁN ABID GARCÍA CATALÁN

a) Introducción

La resistencia antimicrobiana está en aumento, poniendo a prueba las capacidades de los servicios de salud de tratar las enfermedades infecciosas que representan un problema de salud pública (OMS, 2000). Este fenómeno va en aumento y tiene implicaciones económicas y sociales, ya que las tasas de resistencia antimicrobiana entre los patógenos hospitalarios y comunitarios han aumentado considerablemente durante la última década (Eliopoulos, et al., 2003), observándose un incremento de la duración del tratamiento y, para algunos, la duración prolongada de la hospitalización (Paladino, et al, 2002).

De continuar el incremento en la resistencia a antimicrobianos, se estima que para el año 2050, las infecciones por gérmenes fármaco-resistentes serán la primera causa de muerte de la población humana, superando a cualquier otra enfermedad prevalente (Kukso, 2016).

Las infecciones agudas del tracto gastrointestinal figuran entre las enfermedades infecciosas más frecuentes, los principales agentes infecciosos son: *Escherichia coli* (diarreagénica), *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile*, *Rotavirus*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*, entre otros (Hernández, et al., 2011). De todos estos microorganismos ya existen reportes de resistencia a medicamentos debido principalmente a la aplicación de presión selectiva generada por el uso excesivo de los mismos (Calderón, et al., 2016).

La giardiasis es la enfermedad más común de diarrea infecciosa no bacteriana y no viral, con una distribución cosmopolita, 280 millones de casos sintomáticos y unos 500 000 nuevos casos anualmente (Citado por López Velázquez, et al., 2013). Actualmente, existen estudios que demuestran que este parásito genera resistencia a los medicamentos utilizados en su tratamiento (Citado por López Velázquez et al., 2004), por lo anterior, la necesidad en el desarrollo de nuevos fármacos capaces de reconocer blancos terapéuticos se ve incrementada.

Por ser una enfermedad cosmopolita, el parásito no se limita a una zona geográfica específica. En países desarrollados cerca del 2 % de los adultos y entre el 6 y 8 % de la población infantil están infectados. Mientras que el 33 % de la población de países en vías de desarrollo ha padecido giardiasis (CDC, 2015).

En México, la frecuencia de las parasitosis es muy variable, con cifras que fluctúan del 2 al 39 % (Citado por GPC, 2012). En los últimos dos años, la Secretaría de Salud a través de la Dirección General de Epidemiología reportó 24, 870 nuevos casos de giardiasis (SS,2018).

La giardiasis afecta prácticamente a la población de cualquier edad y condición social, aunque uno de los grupos más vulnerables son los niños (Hernández, et al., 2011). Esta afectación se debe a los factores socioeconómicos, nutricionales e

inmunológicos con los que cuenta dicha población, siendo afectados principalmente en su crecimiento y desarrollo, tanto físico como neurológico (BMN, 2018).

G. lamblia es el agente causal de la giardiasis, es un parásito protista, flagelado, con dos núcleos celulares (Adam, 2001). Durante su ciclo de vida sufre significativos cambios bioquímicos y morfológicos que le permiten sobrevivir en condiciones y ambientes que de otro modo lo destruirían, uno de ellos es la variación de los antígenos de superficie que le permiten al trofozoíto evadir la respuesta inmunológica del hospedero (Prucca, et al., 2010). Otra característica a destacar es el enquistamiento; proceso mediante el cual el parásito forma una rígida pared glicoproteica externa (Lujan, 2006).

El enquistamiento resulta crucial para la transmisión, supervivencia y patogénesis de *Giardia*, ya que es utilizado por el parásito para sobrevivir durante su transmisión (Sulemana, et al., 2014). Este proceso le permite a la célula sobrevivir bajo condiciones de estrés, como lo son: una baja concentración de colesterol, inanición, ajustes de pH, supervivencia en agua dulce y salada durante un periodo de tiempo prolongado, resistir el uso de desinfectantes y el medio ácido propio del estómago (Lauwaet, et al., 2007).

Los quistes infectantes representan el estado infectivo y permanecen quiescentes hasta llegar a su hospedero. Tienen una forma oval, miden entre 11-14 μm de longitud y contienen 4 núcleos, de acuerdo a su madurez, y estructuras residuales de la forma vegetativa (axonemas, restos de disco adhesivos y cuerpos medianos). La pared quística está formada por una capa filamentosa externa y una capa membranosa interna, cuyo grosor es de 0.3 – 0.5 μm (Urribarren, 2018).

La protección que ofrece la estructura quística involucra la expresión de proteínas específicas de enquistamiento (CWPs), que son responsables de sintetizar una pared quística hecha de β -1,3-N-acetilgalactosamina (Lopez, et al., 2003). Las CWPs son transportadas a la membrana celular mediante las vesículas específicas de enquistamiento (ESVs) (Midlej, et al., 2009). Esta pared está compuesta por filamentos exteriores y una porción membranosa interna (Feely, et al., 1989). La porción interna membranosa consta de dos membranas: la membrana interna que bordea el espacio peritrófico (el espacio entre la pared quística y los trofozoítos internos) y la membrana externa que parece servir como un sitio de unión a la pared externa del quiste. Esta pared externa se constituye de filamentos que miden de 7-20 nm de diámetro y que se disponen como una malla de cierre hermético (Erlandsen, et al., 1989).

Por lo anterior, se puede deducir que aquellos factores involucrados en el enquistamiento podrían ser blancos potenciales para el desarrollo de fármacos que afecten este proceso y así pudieran detener o disminuir el poder infectivo de *Giardia*. Aunado en lo anterior y basados en la consideración que en algún momento se hizo de *G. lamblia* como organismo susceptible de ser usado en bioterrorismo (López

Velázquez, et al., 2013), es de suma importancia desarrollar compuestos contra el quiste ya que es la estructura más propicia para propagar al parásito.

Previamente describimos estructural y funcionalmente a la triosafosfato isomerasa de *G. lamblia* (GITIM), destacando que es la única triosafosfato isomerasa de organismos mesofílicos que presenta dímeros y tetrámeros funcionales (López Velázquez, et al., 2004). Es importante hacer notar que el proceso de oligomerización que conlleva la existencia de tetrámeros funcionales de GITIM está mediada por la formación de puentes disulfuro (López-Velázquez, et al., 2004). Además de que la formación de puentes disulfuro está relacionada con la oligomerización de GITIM, estos puentes también están relacionados con la regulación de su actividad enzimática (Reyes-Vivas, et al., 2007). Es importante hacer notar que este proceso de oligomerización ha sido constatado tanto *in vitro* con la enzima recombinante como a nivel celular, observándose tanto en trofozoítos como en quistes (Reyes-Vivas, et al., 2007).

Lo anterior nos impulsa a plantear que el proceso de oligomerización mediado por puentes disulfuro de GITIM (y quizá en otras proteínas del parásito) podría tener un papel importante en la capacidad infectiva de *Giardia*. Por lo tanto y a manera de hipótesis de trabajo, nos planteamos lo siguiente: dado que ya se sabe que la oligomerización de GITIM reduce su eficiencia catalítica y que ésta se recupera de inmediato al encontrarse en un medio de condiciones reductoras (López-Velázquez, et al., 2004), aunado a que en el quiste se encontraron oligómeros de peso molecular mayor incluso que el de tetrámeros (Reyes-Vivas, et al., 2007); entonces, proponemos que cuando los trofozoítos del quiste se liberan en el duodeno e internalizan cisteínas del medio circundante, toda la GITIM que se encuentre latente y oligomerizada, podría transformarse de inmediato en dímeros con una eficiencia catalítica exacerbada. Por lo tanto, la oligomerización mediada por puentes disulfuro podría ser fundamental para la generación de “almacenes” de enzimas en estado quiescente que pueden ser empleadas de inmediato en el proceso infectivo, sin tener que pasar por la transcripción y traducción para tener a las enzimas disponibles.

Es por ello que, en este trabajo tomamos como modelo de abordaje la GITIM. Esto para estudiar el impacto que tiene la oligomerización de proteínas mediada por puentes de disulfuro en la capacidad de enquistamiento de *Giardia*. Para ello analizaremos trofozoítos que sobre expresen a GITIM con su capacidad de oligomerización trunca *versus* aquellos trofozoítos transfectados para sobreexpresar una GITIM capaz de oligomerizar.

b) Justificación

La giardiasis es la causa más común de diarrea infecciosa no bacteriana ni viral que afecta principalmente a la población infantil. En México los casos de giardiasis se triplicaron entre 2010 y 2015, registrando un aumento en el número de casos dentro de las estancias infantiles. De manera conjunta el desarrollado de resistencia a los medicamentos utilizados contra la giardiasis ha puesto sobre la mesa la necesidad de nuevas estrategias de tratamiento.

G. lamblia es el agente causal de esta enfermedad y presenta un estadio de quiste, el cual le permite sobrevivir por periodos de tiempo prolongados bajo condiciones adversas y así transmitirse de un hospedero a otro de manera muy eficiente.

Estas condiciones destacan la importancia del estudio del enquistamiento en *G. lamblia* con el propósito de identificar aquellos factores que lo regulan y así proponer blancos moleculares para el desarrollo de fármacos tendientes a detener la diseminación de esta parasitosis.

El conocimiento generado por nuestro grupo de trabajo nos hace considerar importante para el proceso de enquistamiento de *Giardia* a la oligomerización de proteínas mediada por puentes disulfuro. Es por ello que nos planteamos usar como modelo de abordaje del problema la GITIM y con ella analizar el impacto que tiene este fenómeno de oligomerización en la capacidad de enquistamiento del parásito.

Si logramos establecer un vínculo entre la oligomerización de GITIM mediada por puentes disulfuro y el enquistamiento, podríamos a futuro proponer estrategias dirigidas a la interrupción de este proceso y así disminuir la propagación de la enfermedad.

c) Glosario

CFLGITIMWT^{se} = Cintia Fernández Laínez *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase wild type sobreexpresante

CFLGITIMC202A= Cintia Fernández Laínez *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase C202-Alanina

CFLGITIMCWP2= Cintia Fernández Láinez *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase cyst Wall protein 2

CFLGITIMWT= Cintia Fernández Laínez *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase wild type

WT= Wild type, es decir, "nativa o salvaje"

C202A= Grupo al cual se ha sustituido una cisteína por una alanina en la posición 202

WB= Wild “B”, nombre dado a la cepa que se aisló de pacientes afganos

GITIM= Triosa fosfato isomerasa de *Giardia lamblia*

PBS= Buffer salino de fosfatos

Confluencia= Estado de mayor crecimiento celular de los trofozoítos, en el cual se observan como un tapizado sin huecos libres

d) Objetivo General

Caracterizar el efecto que tiene la oligomerización de GITIM en el enquistamiento de *Giardia lamblia*.

e) Objetivos particulares

Elaborar una curva de crecimiento de los trofozoítos CFLGITIMWTse, CFLGITIMC0202A, CFLGITIMCWP2 Y CFLGITIMWT a las 24, 48, 72 y 96 h, para una comparación de su crecimiento

Inducir al enquistamiento a los trofozoítos transfectantes de los grupos CFLGITIMWTse, evaluar el porcentaje de quistes generados y compararlo contra los trofozoítos de los grupos CFLGITIMC202A, CFLGITIMCWP2 Y CFLGITIMWT

Inducir al enquistamiento a los trofozoítos transfectantes de los grupos CFLGITIMC202A, evaluar el porcentaje de quistes generados y compararlo contra trofozoítos de los grupos CFLGITIMWTse, CFLGITIMCWP2 Y CFLGITIMWT

f) Materiales y Métodos

1. Preparación de medio TYI.SS completo

1.1 Colocar 840 mL de agua destilada en agitación magnética

1.2 Agregar cada uno de los reactivos para 1 L de medio:

REACTIVO	CANTIDAD (g)
Cloruro de sodio	2
Fosfato de potasio monobásico	0.6
Fosfato de potasio dibásico	1
Biosate-Peptona digerido pancreático De caseína (65%) y extracto de levadura (35%)	30
D-Glucosa (dextrosa de maíz)	10
L-Cisteína	2
L-ácido ascórbico	0.2
Citrato de amonio férrico	0.0228

Agua doblemente destilada	840 MI
Bilis bovina	0.75
Ceftazimida pentahidratada	0.5
Ampicilina	0.5

1.3 Después de agregar los 30 g de Biosate-Peptona digerido pancreático de caseína se agregan 160 mL para completar un volumen final de 1 L

1.4 Se ajusta el p.H a 7.2

1.5 En condiciones de esterilidad se esteriliza el medio mediante filtración al vacío con una unidad Corning con paso de corte de 0.22 micrometros

1.6 Se alícuota el medio en tubos falcom de 50 ml, llenando cada tubo hasta los 45 MI

1.7 Para completar el medio es necesario agregar en cada alícuota de 45 ml 5 ml de suero fetal bovino (solo al inicio de su utilización)

2. Preparación de medio de preenquistamiento

2.1 La preparación del medio de preenquistamiento es igual que la preparación de medio completo solo que a este medio no se le agrega bilis bovina

3. Preparación de medio enquistamiento

3.1 Colorar 5 ml de suero fetal bovino a cada alícuota de medio de preenquistamiento

3.2 En tubos falcom de 50 ml 10 ml de medio de preenquistamiento, 125 mg de bilis de buey y 0.25 g de ácido láctico

3.3 Filtrar la mezcla anterior utilizando un filtro de 0.22 micrometros en condiciones de esterilidad

3.4 Colocar la mezcla 3.3 ya estéril (10 ml) en el medio de preequistamiento

3.5 Se ajusta el p.H a 8

4. Descongelamiento de trofozoítos de *G. lamblia*

4.1 Los criotubos con los trofozoítos de cada grupo se sacarán del tanque de Nitrógeno líquido, el cual se encuentra a una temperatura de -170 °C y se colocarán en una gradilla por una hora dentro de un tanque de hielo (-4°C) para su descongelamiento

4.2 Bajo condiciones de esterilidad, el contenido de cada criotubo (1.8 ml) se colocará en un tubo de ensaye de 12 x 75 rotulado y con un contenido de 5.7 ml de medio TYI-SS completo, los cuales se deberán homogenizar tres veces invirtiendo el tubo sobre su propio eje de forma muy suave

4.3 Se colocarán en incubación a una temperatura de 37 °C por 24 horas

5. Cultivo de trofozoítos de *G. lamblia*

Los trofozoítos de *G. lamblia* (cepa WB, proporcionada por el laboratorio de Biomoléculas del Instituto Nacional de Pediatría), se cultivarán en Medio TYI-S-33 como ha sido descrito por Mowatt y colaboradores (Mowatt, 1991).

- 5.1 Los tubos con los cultivos en confluencia se colocarán en hielo por 15 minutos
- 5.2 Los tubos se deberán centrifugar por 15 minutos, a 1800 rpm y una temperatura de 4 °C
- 5.3 Bajo condiciones de esterilidad se deberá decantar el sobrenadante de cada tubo quedando solo el botón celular, el cual deberá resuspenderse con una pipeta pasteur estéril y colocado en un tubo de ensaye de 12 x 75 con 7 mL de medio TYI-SS respectivamente
- 5.4 Los cultivos se incubarán a 37 °C durante 72 h, para posteriormente ser lavados con buffer fosfato salino (PBS), pH=7.3. y usarse en los ensayos programados

6. Inducción al preenquistamiento

- 6.1 Colocar los cultivos que están en confluencia en medio completo completo en hielo durante 15 minutos
- 6.2 Centrifugar los tubos 15 minutos a 4 °C
- 6.3 En condiciones de esterilidad se decanta el medio y se colocarán en cada tubo 7 ml de PBS estéril
- 6.4 Realizar de 2 a 3 lavados, cada uno por 30 segundos a 2200 rpm
- 6.5 Decantar el sobrenadante tras el último lavado y colocar 7 ml de medio de preenquistamiento en cada tubo
- 6.6 Se dejarán en incubación por 48 horas a 37 °C

7. Inducción al enquistamiento

- 7.1 Colocar los tubos con medio de preenquistamiento en hielo por 15 minutos
- 7.2 Centrifugar 15 minutos a 4 °C
- 7.3 En condiciones de esterilidad Se decanta el medio y se colocan 7 ml de PBS estéril
- 7.4 Realizar de 2 a 3 lavados, cada uno por 30 segundos a 2200 rpm
- 7.5 Decantar el sobrenadante tras el último lavado y colocar 7 ml de medio de enquistamiento
- 7.6 Dejar 24 horas en incubación a 37 °C

8. Aislamiento y conteo de quistes

- 8.1 Colocar los tubos con medio de enquistamiento en hielo por 15 minutos
- 8.2 Centrifugar 15 minutos, 1800 rpm a 4 °C
- 8.3 En condiciones de esterilidad se decanta el medio y se resuspende en 1 ml de PBS

- 8.4 Colocar las células en tubos eppendorf de 2 ml
- 8.5 Preparar para cada cepa dos diluciones;
 - 8.5.1 Dilución 1:100; 1 microlitro de células + 99 microlitros de PBS
 - 8.5.2 Dilución 1:1; 10 microlitros de la dilución anterior + 10 microlitros de azul tripano
- 8.6 Tomar 20 microlitros de la dilución 1:1 y colocar en la cámara de Neubauer

9. Curva de crecimiento a 24, 48, 72 y 96 horas

- 9.1 Se colocan los tubos con los trofozoítos en confluencia en hielo por 15 minutos
- 9.2 Centrifugar los tubos a 1500 rpm, a 4 °C por 15 minutos
- 9.3 Decantar medio y colocar 1 ml de PBS estéril
- 9.4 Colocar el ml en tubos eppendorf de 1.5 ml estériles
- 9.5 Se realiza el conteo de células utilizando la cámara de Neubauer, y tras determinar el número total de células por cada tubo para cada cepa se ajusta el número de células para cada tubo igual a 15, 000
- 9.6 En tubos eppendorf de 1.5 ml colocar 1 ml de medio TYI completo y añadir la cantidad necesaria de células para ajustar a un número de 15 000 por ml
- 9.7 Incubar los tubos eppendorf a 37 °C hasta que sean utilizados

10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizará mediante el uso de la prueba de “análisis de la varianza de un factor” (ANOVA)

g) Resultados

Se trabajó con los grupos CFLGITIMWTse, CFLGITIMC202A, CFLGITIMCWP2, los cuales previamente fueron transfectados para expresar una característica específica, CFLGITIMWTse sobreexpresa el gen que codifica a la enzima glucolítica, y por lo cual tiene una mayor capacidad de oligomerizar; CFLGITIMC202A, se le ha sustituido su cisteína en la posición 202 por una alanina en la misma posición y por lo tanto no es capaz de oligomerizar; CFLGITIMCWP2, la cual expresa una proteína de pared del quiste conocida como CWP2; y el grupo CFLGITIMWT (control), el cual no fue transfectado previamente.

Curva de crecimiento de células transfectadas vs células no transfectadas

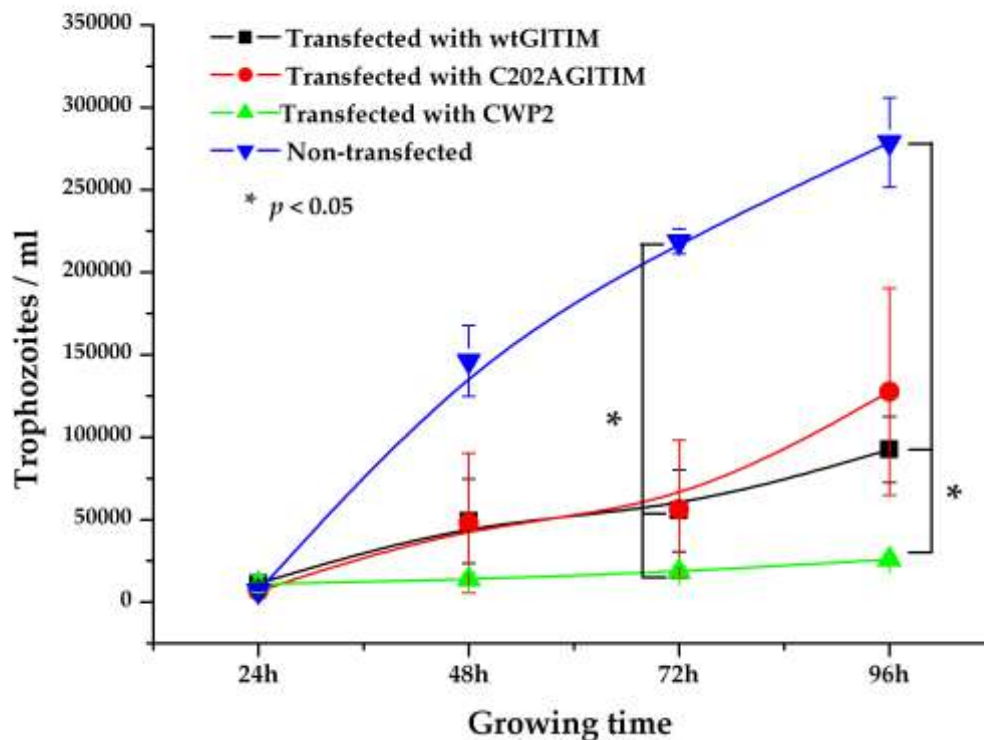


Fig. 1 Concentración de trofozoítos a diferentes tiempos. Los grupos transfectados CFLGITIMWTse, CFLGITIMC202A, CFLGITIMCWP2 y CFLGITIMWT se incubaron a una temperatura de 37 ° C durante diversos tiempos de crecimiento, y los inóculos de cada cepa se realizaron con 1500 trofozoítos por mL de medio TYI completo.

En la curva de crecimiento de *Giardia lamblia* los trofozoítos de cada uno de los grupos utilizados se incubaron a 37° C durante diferentes tiempos, se pudo observar que los trofozoítos del grupo no transfectado presentaron un crecimiento más

elevado si se les compara con el resto de los grupos, es decir, con las células transfectadas. Al realizar el análisis estadístico planteado para el conjunto de datos obtenidos se determinó que existe una diferencia significativa entre los datos de crecimiento obtenidos del grupo no transfectados y los grupos transfectados (CFLGITIMWTse, CFLGITIMC202A y CFLGITIMCWP2) a las 72 y 96 horas, lo que de alguna forma haría posible que el crecimiento celular de los trofozoítos se viera afectado por la tranfección, sin embargo, la capacidad de sobreexpresión de GITIM en el grupo CFLGITIMWTse o la carencia de una sobreexpresión en el caso de CFLGITIMC202A, CFLGITIMCWP2 y el grupo control no se involucra en el crecimiento celular ya que no existe diferencia significativa entre ellas.

Capacidad de enquistamiento de las células transfectadas vs células no transfectadas

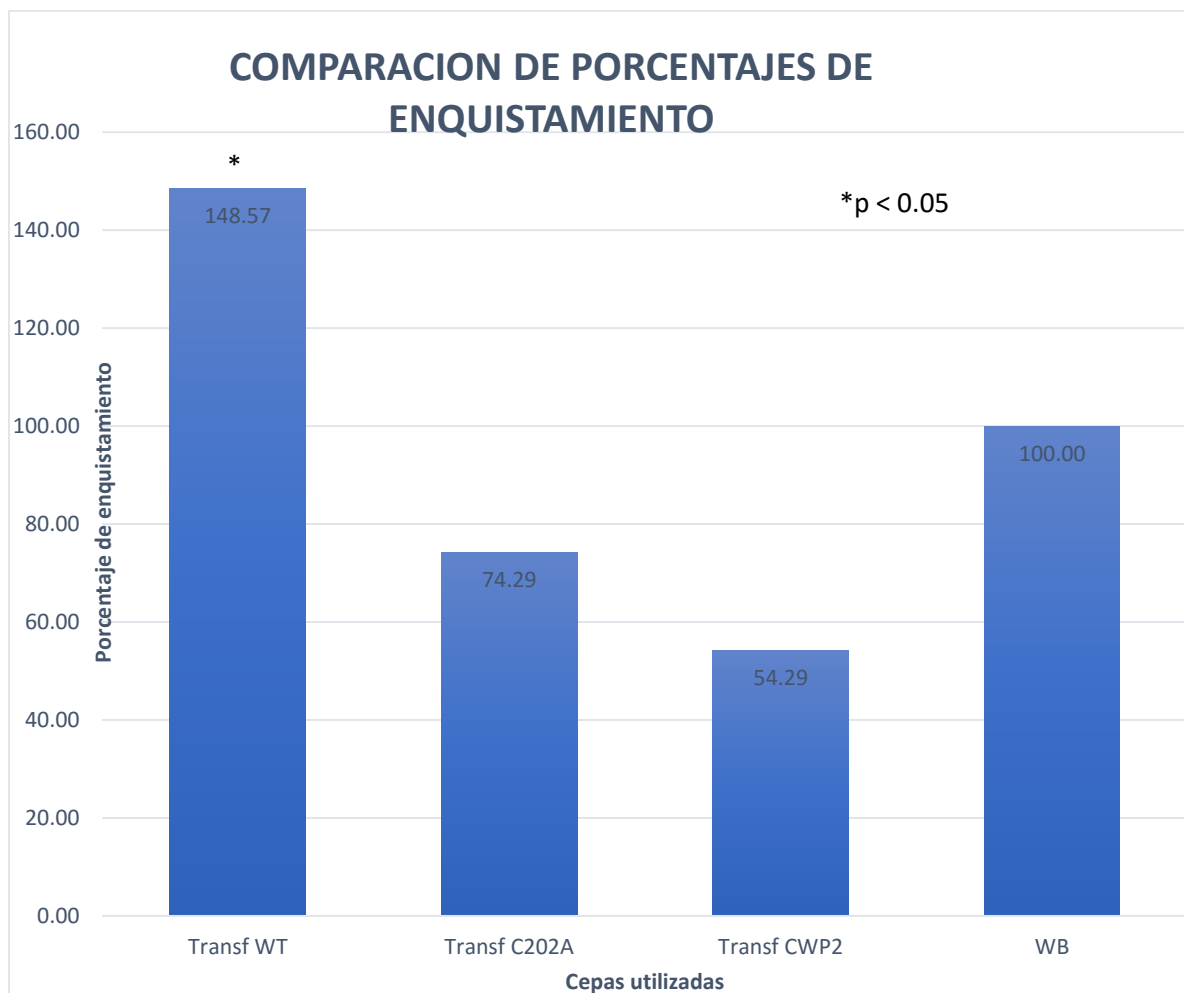


Fig. 2 Porcentaje de enquistamiento. Se indujo al enquistamiento a cada una de las cepas utilizando medio de pre-enquistamiento y se incubaron a 37 ° por 24 horas.

Los porcentajes de enquistamiento (fig.2) de cada uno de los grupos utilizados muestran una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo CFLGITIMWTse y los grupos CFLGITIMC202A, CFLGITIMCWP2 y el grupo control, los cuales presentan una diferencia significativa entre ellos. La capacidad de oligomerización de la enzima glucolítica mediante la formación de puentes disulfuro entre las C202 en la cepa wtGITIM plantea seriamente la posibilidad de que la GITIM tiene un papel fundamental durante el proceso de enquistamiento.

h) Discusión

Las consideraciones mencionadas al inicio de este trabajo plantean la cuestión de si las características de GITIM, particularmente en su capacidad de oligomerizar, ya sea mediante la formación de tetrámeros u oligómeros de alto peso molecular con una disminución importante en sus funciones fisiológicas. El proceso de transfección de alguna forma se relaciona con el proceso de crecimiento celular de los trofozoítos en cada uno de los grupos, ya que el grupo no transfectado presentó una diferencia significativa respecto a su crecimiento celular a las 72 y 96 horas (figura 1) si se le compara con las células transfectadas, lo que nos hace suponer que el gasto energético en estos grupos sometidas a modificaciones genéticas es mayor o bien que este proceso pueda estar interviniendo en alguna o algunas vías metabólicas, ralentizando a si el crecimiento celular.

Sin embargo, al analizar los datos relacionados con el proceso de enquistamiento (figura 2), se observó que el grupo capaz de llevar a cabo el enquistamiento fue aquel en donde GITIM se encontraba siendo sobreexpresada, incrementando el porcentaje de enquistamiento con respecto a las demás cepas, ya que se encontró una diferencia estadísticamente significativa respecto a las demás cepas, lo cual supone que el proceso de oligomerización de GITIM en dímeros y tetrámeros de mayor peso molecular y mediado por puentes disulfuro es fundamental para el desarrollo del estado infectivo de *G. lamblia*. Y resulta fundamental el desarrollo de nuevos medicamentos capaces de evitar la oligomerización de esta enzima glucolítica.

Por lo tanto, debe considerarse la posibilidad de que la tetramerización sea relevante para la vida del parásito. El ciclo de vida de *G. lamblia* implica la transformación de quistes en trofozoítos; por lo tanto, podría ser que la transición de los tetrámeros a oligómeros de mayor peso molecular o viceversa, este guiada por las condiciones intracelulares en un estado fisiológico.

El enquistamiento involucra especies oligoméricas variadas, y que forman parte de una "conformación de almacenamiento" que participa en una transición a un estado metabólico más alto. Por lo tanto, la capacidad de crecimiento celular y la capacidad de enquistamiento merece más estudios.

i) Agradecimientos

El autor está en deuda con el Dr. Gabriel López Velázquez, profesor investigador perteneciente al Instituto Nacional de Pediatría y con la Dra. Karina Sánchez Herrera, profesora investigadora perteneciente a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco por su supervisión para la mejora del manuscrito. También agradezco a la Dra. Itzhel García Torres, a la M.C. Cynthia Fernández Laínez, al Dr. Ignacio de la Mora de la Mora y al Dr. Sergio Enríquez Flores por sus consejos sobre el mejoramiento de la metodología y el manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Organización Mundial de la Salud. (2000). Resistencia a los antimicrobianos: los hechos. Boletín de medicamentos esenciales, N° 28 y 29: 7 - 8. Recuperado el 15 de noviembre de 2018, de <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s2250s/s2250s.pdf>

[2] Eliopoulos, G. M. Consgrrove, S. E. Carmeli, Y. (2003). The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. Clinical Infection Diseases, 36: 1433-1437. <https://doi.org/10.1086/375081>

[3] Paladino, J. A. Sunderlin. J. L. Price, C. S. Schetang, J. J. (2002). Economic consequences of antimicrobial resistance. Surgical Infections, 3(3). <https://doi.org/10.1089/109629602761624225>

[4] Kukso, F. (2016). Para 2050 la resistencia a los antibióticos será la principal causa de muerte. Scientific American Español. Recuperado el 16 de noviembre de 2018, de <https://www.scientificamerican.com/espanol/noticias/para-2050-la-resistencia-a-los-antibioticos-sera-la-principal-causa-de-muerte/>

[5] Hernández, C. Aguilera, Ma. Castro, G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. Enf Inf Microbil. 31: 137-151. <http://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2011/ei114f.pdf>

[6] Calderón G. Aguilar, L. (2016). Infectología: resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. Revista médica de costa rica y Centroamérica, LXXIII (621): 757-763. <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/621/art03.pdf>

[7] López-Velázquez, G. Reyes-Vivas, H. Hernández-Alcántara, De la Mora-de la Mora, I. Enríquez-Flores, S. Ortiz, C. Castillo-Villanueva, A. Méndez, S. García-Torres, I. Marcial, J. Torres, A. Oria-Hernández, J. Vayone-Carlo, A. Gómez-Manso, S. (2013). LAS CRÓNICAS DE GIARDIA. EL PARÁSITO, LA MOLÉCULA Y EL FÁRMACO. Mensaje Bioquímico, XXXVII: 201-202. [file:///C:/Users/GERMY/Downloads/Mensaje Bioq13 V37p196-212 Gabriel Lopez Velazquez.pdf](file:///C:/Users/GERMY/Downloads/Mensaje%20Bioq13%20V37p196-212%20Gabriel%20Lopez%20Velazquez.pdf)

[8] López-Velázquez, G. Molina-Ortiz, D. Cabrera, N. Hernández-Alcántara, G. Peon-Peralta, J. Yépez-Mulia, L. Pérez-Montfort, R. Reyes-Vivas, H. (2004). An Unusual Triosephosphate Isomerase from the Early Divergent Eukaryote *Giardia lamblia*. PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics, 55: 824-834. <https://doi.org/10.1002/prot.20097>

[9] Center for Disease Control and Prevention. (2015). Parasites- *Giardia* Sources of Infection and Risk Factors, General Epidemiology. Recuperado el 17 de noviembre de 2018, de <https://www.cdc.gov/parasites/giardia/infection-sources.html>

[10] Ordoñez-Gutiérrez, E. Martínez, A. Gonzáles-Arenas, E. Sifuentes-Vela, C. Acosta-Martínez, Ma. Martínez-Marín, E. Vázquez-Frías R. Guía Práctica Clínica ISSSTE 252-12. Prevención, diagnóstico y tratamiento farmacológico de las Giardiasis en niños y adolescentes de 1 a 8 años en el primero y segundo nivel de atención. 8-9.

<http://sgm.issste.gob.mx/medica/medicadocumentacion/guiasautorizadas/Pediatrica/ISSSTE-252-12-Giardiasis/giardiasis270812.pdf>

[11] Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas. Biblioteca Médica Nacional. Enfermedades Infecciosas Intestinales. Epidemiología y Mortalidad, Bibliomed. 25 (3). 2. <http://files.sld.cu/bmn/files/2018/03/bibliomed-marzo-2018.pdf>

[12] Rodney D. Adam. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev., 14 (3), 447-475. doi: [10.1128/CMR.14.3.447-475.2001](https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001)

[13] Prucca, C. Slavin, I. Quiroga, R. Elías, E. Rivero, F. Saura, A. Carranza, P. Luján, H. (2008). Antigen variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*. 456: 750-758. <https://doi.org/10.1038/nature07585>

[14] Lujan, H. (2006). GIARDIA Y GIARDIASIS. *Medicina (Buenos Aires)*; 66:70-74. <https://www.medicinabuenosaires.com/demo/revistas/vol66-06/1/GIARDIA%20Y%20GIARDIASIS.pdf>

[15] Sulemana, A. Page, T. Jaroll, E. (2014). Commitment to cyst formation in *Giardia*. *Microbiology*, 160: 33-39. doi: [10.1099/mic.0.072405-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.072405-0)

[16] Lauwaet, T. Davids, B. Reiner, D. Gillin, F. (2007). Encystment of *Giardia lamblia*: A model for others parasites. *Curr Opin Microbiol*, 10(6): 554-559. doi: [10.1016/j.mib.2007.09.011](https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.011)

[17] Uribarren, T. (2018). Giardiasis o Giardiosis. Departamento de Microbiología y Parasitología – Recursos en Parasitología. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/giardiasis.html>

[18] Lopez, A. B., Sener, K., Jarroll, E. L. & van Keulen, H. (2003). Transcription regulation is demonstrated for five key enzymes in *Giardia intestinalis* cyst wall polysaccharide biosynthesis. *Mol Biochem Parasitol*, 128 (1), 51–57. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00049-5)

[19] Midlej, V. Benchimol. M. (2009). *Giardia lamblia* behavior during encystment: How morphological changes in shape occur. *Parasitology International*, 58:1, 72-82. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.11.002>

[20] Feely, D.E., Erlandsen, S.L. and Chase, D.G. (1984) Structure of the trophozoite and cyst. *Giardia and Giardiasis*, 3-31. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0594-9_1

[21] Erlandsen, S.L., Bemrick, W. and Pauley, J. (1989) High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall of *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *J. Parasitol.* 75, 787-797.

[22] Reyes-Vivas, H. Diaz, A. Peon, J. Mendoza-Hernandez, J. Hernandez-Alcantara, G. De la Mora-De la Mora, I. Enriquez-Flores, S. Dominguez-Ramirez, L. Lopez-Velazquez, G. (2007). Disulfide Bridges in the Mesophilic Triosephosphate Isomerase from *Giardia lamblia* Are Related to Oligomerization and Activity. *J. Mol. Biol.* 365: 752-763. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.053>

[23] Mowatt MR, Aggarwal A, Nash TE. (1991). Carboxy-terminal sequence conservation among variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.* 4(2): 15–228.

[24] Steffan N. Ho. Henry D. Hunt. Robert M. Horton. Jeffrey K. Pullen. Larry R. Pease. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77: 51-59.

<https://pdfs.semanticscholar.org/4e14/5553821f90a2376aa550aed3664f2d327672.pdf>

[25] Enríquez-Flores S, Rodríguez-Romero A, Hernández-Alcántara G, OriáHernández J, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Hernández G, de la Mora-de la Mora I, Castillo-Villanueva A, García-Torres I, Méndez ST, Gómez-Manzo S, TorresArroyo A, López-Velázquez G, Reyes-Vivas H. (2011) Determining the molecular mechanism of inactivation by chemical modification of triosephosphate isomerase from the human parasite *Giardia lamblia*: a study for antiparasitic drug design. *Proteins*, 79(9):2711-24.

[26] Singer SM, Yee J, Nash TE. (1998). Episomal and integrated maintenance of foreign DNA in *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol*, 92(1):59-69.

[https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00225-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00225-9)

[27] Fernández, C. (2017). Caracterización funcional y estructural *in vitro* e *in situ* de las mutantes sencillas y múltiples de cisteínas de triosafosfato isomerasa de *Giardia lamblia*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

[28] Davids, B. Gillin, F. (2011). Cap. 23 Methods for *Giardia* Culture, Cryopreservation, Encystation, and Excystation *in vitro*. Springer Science y Business Media. *Giardia: A Model Organism*, 281-292.