

Galarza, Rocío

Roberto Rinaldi, Julieta

**Mecanismos epigenéticos de
regulación génica en el parásito
protozoario *giardia lamblia***

**Tesis para la obtención del título de grado de
Bioquímica**

Director: Pérez Díaz, Luciano

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.



[Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Químicas



**MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE REGULACIÓN GÉNICA
EN EL PARÁSITO PROTOZOARIO *GIARDIA LAMBLIA***

Trabajo Final de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba conforme a los requisitos para obtener el título de grado de Bioquímico

Por
Galarza, Rocío
Roberto Rinaldi, Julieta

Córdoba, 2023.

Director de Trabajo Final

MV Pérez Diaz Luciano

Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra
(INIMEC-CONICET-UNC)

Co-director de Trabajo Final

Dr. Laiolo Jerónimo

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Católica de Córdoba

Cátedra de Trabajo Final

Dr. Nicolás Juan Carlos

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Católica de Córdoba

MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE REGULACIÓN GÉNICA EN EL PARÁSITO PROTOZOARIO *GIARDIA LAMBLIA*

AGRADECIMIENTOS

Hoy, al concluir este importante capítulo de mi vida, no puedo dejar de expresar mi más profundo agradecimiento a cada uno de ustedes.

En primer lugar, les agradezco a mis padres que me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades. También son los que me han brindado el soporte material y económico para poder concentrarme en los estudios y nunca abandonarlos. También a mi hermana porque, a pesar de nuestras peleas y diferencias, me acompañaste en este año tan difícil.

Son muchos los docentes que han sido parte de este largo camino universitario, y a todos ellos les quiero agradecer por transmitirme los conocimientos necesarios para ser una gran profesional.

Agradecerles a todos mis compañeros los cuales muchos de ellos se han convertido en mis amigos. Gracias por las horas compartidas, los trabajos y resúmenes realizados en conjunto y los momentos vividos.

Gracias a mi amiga y compañera de tesis que sin vos esta tesis no habría sido posible. Pasamos momentos de estrés, pero también alegría durante este 2023. Me encanto haber trabajar con vos.

Con cariño,

Rocío

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
RESUMEN	XIV
SUMMARY	XV
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	4
CAPÍTULO IV: MARCO TEÓRICO	6
4.1 Generalidades	6
4.2 Ciclo biológico de <i>G. lamblia</i>	8
4.3 Epigenética en eucariotas superiores	10
4.3.1 Mecanismos epigenéticos	12
4.3.1.1 Metilación del DNA	13
4.3.1.2 RNA de interferencia	15
4.3.1.3 Modificaciones post-traduccionales de histonas	16
4.4 Regulación epigenética en <i>G. lamblia</i>	17
	V

4.4.1	Proceso de enquistamiento de <i>G. lamblia</i>	18
4.4.1.1	Regulación transcripcional del enquistamiento	19
4.4.1.2	Transducción de señales en enquistamiento	20
4.4.2	Proceso de variación antigénica de <i>G. lamblia</i>	22
4.4.3	Mecanismo de resistencia a antiparasitarios	26
4.5	Técnicas de laboratorio utilizadas para evaluar los mecanismos de regulación epigenética	30
4.5.1	Inmunoprecipitación de la cromatina	30
4.5.2	Fármacos inhibidores de enzimas involucradas en PTM	31
4.5.3	Western Blot	32
4.5.4	RT-qPCR	32
4.5.5	Anticuerpos monoclonales	33
4.5.5.1	Microscopia de fluorescencia	34
4.5.6	Espectrometría de masa	34
4.6	Aplicación de técnicas para evidenciar los mecanismos biológicos de <i>G. lamblia</i> regulados epigenéticamente	35
CAPÍTULO V: CONCLUSIÓN		38
CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA		39
Anexo I: Nota de aceptación del director y co-director		46

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A

A	Adenina
ABZ	Albendazol
ABZR	Resistencia al albendazol
ABZSO	Albendazol sulfóxido
ABZSOO	Albendazol sulfona
ARR-VSP	Proteína de superficie variante relacionada con la resistencia a ABZ

B

BER	DNA glicosilasas de reparación por escisión de bases
-----	--

C

C	Citocina
CBS	Sitio de unión de colchicina
ChIP	Cromatina
CPR	Citocromo P450 oxidoreductasa
CT	Cola citoplasmática corta
CYP	Citocromo
Cys	Cisteína
CW	Pared del quiste
CWG	Glicopolímero
CWPs	Polisacáridos/proteínas de la pared celular

D

dcDNA	DNA de doble cadena
dcRNA	RNA doble cadena
DF	Fragmentos de disco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dnmts	DNA metiltransferasas
dNTP	Desoxinucleótidos
E	
ESV	Vesículas específicas del enquistamiento
F	
FAD	Flavin adenin dinucleótido oxidada
Fd	Ferredoxina
FIHb	Flavohemoglobinas
FMO	Monooxigenasa que contiene flavina
G	
G	Guanina
GalNAC	N-acetilgalactosamina
<i>G. lamblia</i>	<i>Giardia lamblia</i>
GIDicer	Endonucleasa de <i>G. lamblia</i> Decer
GIRdRP	RNA polimerasa citoplasmática dependiente de RNA de <i>G. lamblia</i>
G6PI	Glucosamina-6-fosfato isomerasa
H	
HAT	Histonas acetiltransferasas
HCNCp	Proteína quística no variante con alto contenido de cisteína

HDAC	Histonas deacetilasas
HDACi	Inhibidores de la actividad HDAC
I	
IBP	Interacciones proteína-proteína
M	
mAb	Anticuerpos monoclonales
mRNA	RNA mensajero
MS	Espectrometría de masas
MTZ	Metronidazol
MTZR	Resistencia al metronidazol
Myb2	Factores de transcripción relacionados con la mieloblastosis
N	
NAD ⁺	Nicotin adenin dinucleótido oxidada
NADH	Nicotin adenin dinucleótido reducida
NO	Óxido nítrico
NOD	Dioxigenasas de óxido nítrico
NR-1	Nitrorreductasa 1
Nt	Nicotinamida
NTZ	Nitazoxanida
P	
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFOR	Piruvato-ferredoxina oxidorreductasas
PP2A-C	Proteína fosfatasa 2A

PTGS	Modelo de silenciamiento génico post-transcripcional
PTM	Modificación post-traducciona
R	
RE	Retículo endoplásmico
RISC	Complejo silenciador inducido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNAasa III	Ribonucleasa III
RNAi	RNA de interferencia
RNAi- <i>like</i>	Mecanismo similar al RNAi
RNAip	Pequeños RNA de interferencia
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
S	
SAM	S-adenilmetionina
siRNA	RNA pequeño de doble cadena homólogo al RNA mensajero
SIR2	Proteínas deacetilasas dependientes de NAD ⁺
T	
T	Timina
TC	Tallo citoplasmático
TET	C diooxigenasas de traslocación diez-once
TGS	Silenciamiento de genes transcripcionales
TMD	Dominio transmembrana
TSA	Tricostatina A

TrxR Triorredoxina reductasa

V

VSP Proteínas variables de superficie

5 mC 5-metilcitosina

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de quiste de <i>G. lamblia</i>	7
Figura 2	Esquema de trofozoíto de <i>G. lamblia</i>	8
Figura 3	Ciclo biológico de <i>G. lamblia</i>	10
Figura 4	Estructura del nucleosoma	11
Figura 5	Vías de metilación del DNA	14
Figura 6	Enquistamiento de <i>G. lamblia</i>	18
Figura 7	Estructura y localización de las VSP	23
Figura 8	Mecanismo moléculas de control de variación antigénica en <i>G. lamblia</i>	25
Figura 9	Estructura química del Metronidazol	27
Figura 10	Estructura química de ABZ, ABZSO, ABZSOO y vía esquemática del metabolismo de ABZ	28
Figura 11	Polimorfismo E198K	29

RESUMEN

Giardia lamblia (*G. lamblia*) es un microorganismo unicelular eucariota flagelado que comúnmente parasita el intestino delgado de humanos y numerosos vertebrados, ocasionando enfermedades diarreicas en todo el mundo. Este protozoo emplea diversas estrategias para adaptarse a las condiciones ambientales, eludir el sistema inmunológico y resistir la exposición a agentes antimicrobianos. En los últimos años, se ha demostrado la relevancia de la regulación epigenética en la expresión génica de este parásito.

En *G. lamblia*, se han identificado varios mecanismos epigenéticos de importancia. Estos incluyen la regulación del ciclo biológico, abarcando las etapas vegetativas y las quísticas infectantes, lo que le permite sobrevivir en ambientes adversos y, en consecuencia, infectar a diversos mamíferos, incluyendo los seres humanos. También, se ha observado la variación en la expresión génica de proteínas de superficie, lo que le otorga la capacidad de alterar sus antígenos de superficie y, de esta manera, evadir el sistema inmunológico del hospedero, permitiéndole persistir en el intestino delgado. Además, *G. lamblia* muestra una predisposición al desarrollo de mutaciones en los genes que codifican proteínas susceptibles de ser blanco terapéutico para los agentes giardicidas.

Se requieren numerosos estudios para alcanzar una comprensión exhaustiva de los mecanismos epigenéticos empleados por este parásito y su implicación en su biología y patología. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo consiste en recopilar información con el fin de elucidar cómo los mecanismos epigenéticos desempeñan roles fundamentales en la patogenicidad de *G. lamblia*, haciendo hincapié en particular en los mecanismos moleculares relacionados con la diferenciación del parásito, la variación antigénica y la resistencia antimicrobiana. Asimismo, se abordarán las herramientas utilizadas para la detección de estos mecanismos epigenéticos.

SUMMARY

Giardia lamblia (*G. lamblia*) is a unicellular eukaryotic flagellated microorganism that commonly parasitizes the small intestine of humans and numerous vertebrates, causing diarrheal diseases worldwide. This protozoan employs various strategies to adapt to environmental conditions, evade the immune system, and resist exposure to antimicrobial agents. In recent years, the relevance of epigenetic regulation in the gene expression of this parasite has been demonstrated.

Several significant epigenetic mechanisms have been identified in *G. lamblia*. These include the regulation of the life cycle, encompassing both vegetative and cystic infectious stages, allowing it to survive in adverse environments and consequently infect various mammals, including humans. Additionally, variations in the gene expression of surface proteins have been observed, granting it the ability to alter its surface antigens and thereby evade the host's immune system, enabling it to persist in the small intestine. Furthermore, *G. lamblia* exhibits a predisposition to developing mutations in genes encoding proteins susceptible to being therapeutic targets for giardicidal agents.

Numerous studies are required to achieve a comprehensive understanding of the epigenetic mechanisms employed by this parasite and their implications in its biology and pathology. Therefore, the objective of this work is to gather information to elucidate how epigenetic mechanisms play fundamental roles in the pathogenicity of *G. lamblia*, with a particular emphasis on the molecular mechanisms related to parasite differentiation, antigenic variation, and antimicrobial resistance. Additionally, the tools used for the detection of these epigenetic mechanisms will be addressed.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

La giardiasis es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo binucleado flagelado *G. lamblia* en humanos y otros vertebrados (1). Este parásito intestinal representa una de las principales causas de enfermedades diarreicas transmitidas por alimentos y agua en todo el mundo, afectando la capacidad del cuerpo para absorber grasa, lactosa, vitamina A y vitamina B12, lo que puede provocar pérdida de peso y desnutrición (2,3). En casos graves, especialmente en niños, esto puede retrasar el crecimiento y la pubertad, afectar negativamente el desarrollo cognitivo y, en algunos casos, incluso causar la muerte prematura (2,4). Este protozoo se encuentra comúnmente en agua, alimentos y superficies contaminadas con heces de animales o humanos infectados. La infección se transmite por vía oral-fecal, por lo que la higiene personal y las condiciones sanitarias deficientes son factores de riesgo importantes para la transmisión (5,6). El ciclo biológico de *G. lamblia* es muy simple y comprende dos estadios bien diferenciados: el trofozoíto, la forma infectiva que coloniza el intestino delgado, y los quistes, o formas más resistentes y causantes de la transmisión de la enfermedad. Los quistes infecciosos pueden sobrevivir durante meses en el medio ambiente, explicando por qué la infección es estrechamente relacionada con el agua y alimentos contaminados con los mismos (6).

Durante su ciclo biológico, *G. lamblia* sufre cambios bioquímicos y/o morfológicos que le permiten sobrevivir en ambientes y condiciones que de otro modo lo destruiría (7). Al momento en el que se produce la infección al ingerir el quiste, la supervivencia de *G. lamblia* depende no solo de su habilidad para invadir a los individuos, sino también de su capacidad para resistir los mecanismos de defensa generados por el hospedero (6). Por lo tanto, la patogenicidad o virulencia de este protozoo refleja su interacción dinámica con su hospedero y su capacidad de respuesta a los sistemas de defensa que se requieren para su supervivencia y el mantenimiento y/o propagación de la infección (1).

En los últimos años, se ha demostrado la relevancia de la regulación epigenética en la expresión génica de este parásito (8). Se identificaron varios mecanismos epigenéticos de importancia en su ciclo biológico, en la variación en la expresión génica de proteínas de superficie, durante el enquistamiento y en procesos de resistencia a agentes giardicidas (8). Con

la intención de conocer más acerca de estos mecanismos es que surge el interés de realizar una actualización bibliográfica acerca de los procesos de adaptación celular del parásito *G. lamblia*.

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

En base a los antecedentes expuestos, los objetivos de este Trabajo Final son:

2.1 Objetivo general

Realizar una revisión bibliográfica sistemática y actualizada acerca de los procesos celulares básicos y complejos de la biología parasitaria regulados por mecanismos epigenéticos.

2.2 Objetivos específicos

- Describir los procesos de enquistamiento, variación antigénica y resistencia a antiparasitarios detallados en la bibliografía.
- Analizar y describir las técnicas de laboratorio utilizadas para evaluar los mecanismos de regulación epigenética.
- Condensar el conocimiento acerca de los mecanismos celulares parasitarios en conjunto con las técnicas de investigación para asimilar el rol de la epigenética en el organismo *G. lamblia*.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

La búsqueda se realizó en repositorios públicos de publicaciones científicas. Las bases consultadas fueron:

- PubMed, un motor de búsqueda de libre acceso que permite principalmente acceder y consultar el contenido de la base de datos MEDLINE de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos, que incluye referencias bibliográficas de artículos publicados en unas 5.500 revistas médicas desde el año 1966.
- Scopus, una base de datos bibliográfica, de resúmenes y citas de artículos de revistas científicas. Incluye áreas de ciencia, tecnología, medicina y ciencias sociales, incluyendo artes y humanidades, reuniendo más de 35.000 títulos de todas las áreas.
- ScienceDirect, un sitio web que brinda acceso a una gran base de datos de búsqueda científica y médica. Contiene más de 9 millones y medio de artículos y capítulos.
- SciELO, una biblioteca electrónica que alberga publicaciones científicas de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile Colombia, Costa Rica, Cuba, España, México, Paraguay, Perú, Portugal, Uruguay y Venezuela.
- Google Académico que consiste en un motor de búsqueda especializado en literatura científica y académica.

Los motores de búsquedas deben acceder empleando palabras claves y ecuaciones de búsqueda tanto en idioma español como en inglés. Se utilizaron las siguientes palabras claves (se muestran en idioma español): *G. lamblia*, ciclo biológico, epigenética, enquistamiento de *G. lamblia*, modificaciones post-traduccionales, sobrevivencia del parásito intestinal *G. lamblia*, morfología de quiste, morfología de trofozoíto, metilación de DNA, variación antigénica, acetilación, generalidades de *G. lamblia*, enquistamiento, desenquistamiento, mecanismos de resistencia, antiparasitarios, nitrofarmacos, metronidazol, albendazol, Western Blot, Inmunoprecipitación de cromatina, RT-qPCR, modificaciones post-traduccionales, anticuerpos monoclonales, nuclear run-on, microscopia de fluorescencia, flavohemoglobinas, espectrometría de masas.

Las ecuaciones de búsqueda se realizaron empleando operadores booleanos *AND* y *OR*, según corresponda. No se utilizaron operadores complejos, como operadores de proximidad e.g. *NEAR*, dado que no todos los buscadores soportan estos operadores.

CAPÍTULO IV: MARCO TEÓRICO

4.1 Generalidades

G. lamblia es un organismo eucariota unicelular, con un ciclo biológico directo (9), el cual involucra dos etapas: el quiste, que es la etapa infectiva y el trofozoíto, que es la etapa replicativa. La evaluación de la transmisión e infección requiere una caracterización molecular, ya que existe una variación genética considerable dentro de *G. lamblia* (10). Hasta el momento se han identificado ocho genotipos o ensamblajes (A a H) de *G. lamblia* con especificidad de hospedero. De los ocho ensamblajes, (A y B) son capaces de infectar tanto a humanos como otros animales, incluidos perros, gatos, ganado y animales salvajes, mientras que los otros seis ensamblajes (C a H) se encuentran casi exclusivamente en hospederos no humanos como castores, gatos, perros y ganado (11).

En cuanto a la morfología de los quistes de *G. lamblia* (Figura 1), tienen forma ovoide y paredes lisas. Estos tienen una morfología elipsoidal, de 8-12 μm de longitud por 5-8 μm de ancho (11). Poseen un citoplasma granular, fino, claramente separado de una pared quística de 0,3 μm de espesor adosada a la membrana plasmática del parásito. La pared del quiste es refráctil y su porción externa presenta una estructura fibrilar compuesta por 7 a 20 filamentos, mientras, la porción interna es membranosa. Ambas se encuentran separadas por el espacio periplásmico. Los estudios de la pared externa del quiste mediante cromatografía gaseosa, espectrometría de masas y análisis enzimático, demuestran que la galactosamina en forma de N-acetilgalactosamina (GalNAc) es el azúcar mayoritario (6). El disco de succión o ventral puede observarse fragmentado en el citoplasma (12). Los quistes inmaduros o recién formados tienen dos núcleos y se denominan prequistes y los quistes maduros son tetranucleados. Los núcleos se suelen localizar en el extremo del quiste. A su vez, los flagelos se encuentran internalizados en el espacio peritrófico. El cariosoma nuclear, puede tener una posición central o excéntrica y la membrana nuclear carece de cromatina periférica. Los quistes son moderadamente resistentes a la inactivación por varios desinfectantes (ejemplo, cloro) y son ambientalmente estables (15). En cuanto a las proteínas que forman la pared quística (CW), hasta el momento se han descrito 4 polipéptidos: 3 de ellos se conocen con el nombre de CWPs (del inglés, *Cyst Wall Proteins*) y, el

otro, una proteína de superficie rica en cisteína (Cys), tipo proteína variable de superficie, denominado HCNCp (del inglés, *High Cysteine Non-variant Cyst protein*). Estas proteínas se encuentran ausentes en el estadio de trofozoíto, y su síntesis es regulada particularmente durante el proceso de formación del quiste (13).

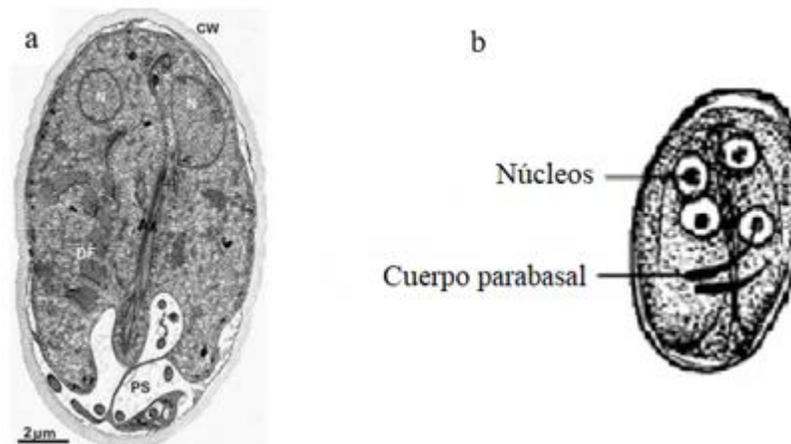


Figura 1. Esquema del quiste de *G. lamblia*: (a) Microscopía electrónica del quiste. Se observan los núcleos (N), fragmentos de disco (DF) y axonemas (Ax), así como la CW y el espacio peritrófico (PS). (b) ilustración del quiste a partir de la microscopía electrónica. (12,14).

El trofozoíto (Figura 2) es de aspecto piriforme con una región dorsal convexa y dos axonemas centrales. Su región ventral es cóncava, contiene un orgánulo espiral o disco de succión, el cual es el que le permite el enlace con la mucosa intestinal del hospedero (15) y está formado por microtúbulos dispuestos en espiral, adyacente a la membrana plasmática. La tubulina es la principal proteína que conforma el disco ventral, la cual puede presentar modificaciones post-traduccionales (PTM) como acetilación y poliglicilación (12). Tiene cuatro pares de flagelos y un par de cuerpos parabasales centralizados (15). Los cuatro pares de flagelos se originan en los cuerpos parabasales y son similares a los flagelos de otros eucariotas. Reciben nombres específicos de acuerdo a su posición: anterior, postero-lateral, ventral y caudal (12). Estos impulsan al trofozoíto en forma desigual, similar a la caída de una hoja (15), permiten la adhesión a la mucosa del hospedero y tienen un rol muy importante en la división celular (12). Estructuralmente muestra dos núcleos y dos cuerpos medios que exhiben diferencias en su morfología lo que permite identificar varias especies de *G. lamblia* (15). Con respecto a las

estructuras celulares internas, *G. lamblia* presenta un sistema de endomembranas particular, ya que carece de un aparato de Golgi morfológicamente discernible y tiene enzimas similares a las de los procariotas. Por otra parte, posee estructuras esféricas delimitadas por una doble membrana denominadas mitosomas, las cuales son organelas que se encuentran en organismos microaerófilos carentes de mitocondrias. El trofozoíto mide de 12 a 20 μm de largo y de 5 a 10 μm de ancho (15).

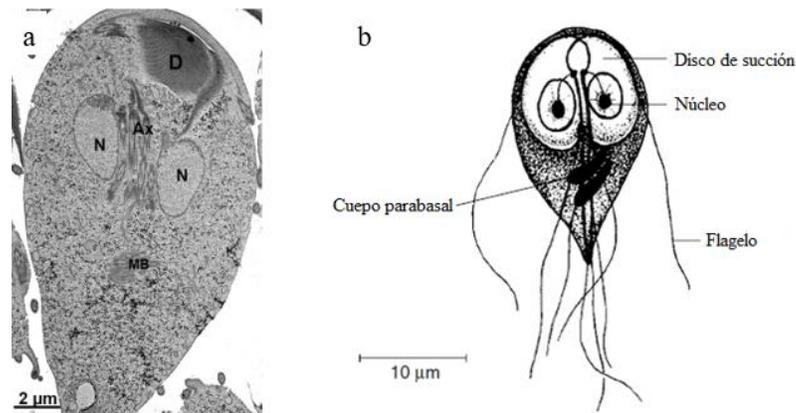


Figura 2. Esquema del trofozoíto de *G. lamblia*: (a) Microscopía electrónica de un trofozoíto que muestra estructuras internas como los núcleos (N), cuerpos medios (MB), discos de succión (D) y Axonemas (Ax) (12,14).

4.2 Ciclo biológico de *G. lamblia*

G. lamblia tiene un ciclo biológico simple (Figura 3) caracterizado principalmente por dos etapas: la forma vegetativa del trofozoíto móvil y la forma de quiste ambientalmente resistente y altamente infecciosa (16). Cuando el hospedero ingiere los quistes infecciosos provenientes de agua y alimentos contaminados, estos ingresan al tracto digestivo. Una vez que los quistes se localizan en el sistema digestivo, son estimulados por el ácido del estómago, la bilis y tripsina en el duodeno para convertirse en trofozoíto. Estos, comienzan a proliferar en un medio ambiente rico en nutrientes y pobre en oxígeno, utilizando su disco de succión para adherirse a la mucosa

intestinal y así poder resistir al peristaltismo. A medida que aumenta la densidad de trofozoítos, estos comienzan a descender por el intestino delgado, donde la concentración de colesterol disminuye, el pH aumenta al igual que las concentraciones de bilis y ácido láctico. Estas condiciones son propicias para que algunos trofozoítos comiencen a diferenciarse a quistes infecciosos, los cuales se excretan en las heces para convertirse en nuevas fuentes de infección (16,17). Este parásito no puede sintetizar colesterol *de novo*, por lo tanto, debe incorporarlo del intestino delgado del hospedero (13). A su vez, las sales biliares forman micelas estables con el colesterol, reduciendo aún más la disponibilidad del lípido para *G. lamblia* (13). Un mecanismo clave que le permite al trofozoíto permanecer en el intestino del hospedero, evadiendo la respuesta inmune humoral es el proceso de variación antigénica. Durante este proceso, cada trofozoíto individual está cubierto por un solo miembro de una familia de proteínas antigénicas diversas llamadas proteínas variables de superficie (VSP del inglés, *Variant-specific Surface Proteins*). Antes de abandonar el intestino del hospedero, el trofozoíto desarrolla una resistente pared glicoproteica, compuesta por 60% de carbohidratos y un 40% de proteínas, para convertirse en quiste (18).

Durante el crecimiento vegetativo, los núcleos ciclan entre un contenido de genoma diploide (2N) y tetraploide (4N) y la célula, en consecuencia, cicla entre 4N y 8N. Los trofozoítos en fase estacionaria se detienen en la fase G₂ con una ploidía de 8N (dos núcleos, cada uno con una ploidía de 4N) (19). En su camino hacia la formación de quistes, en G₁ el trofozoíto pasa por dos rondas sucesivas de replicación cromosómica sin que intervenga un evento de división celular y con un solo evento de cariocinesis. Los quistes completamente diferenciados contienen cuatro núcleos, cada uno con una ploidía de 4N, lo que da como resultado una ploidía del quiste de 16N (19).

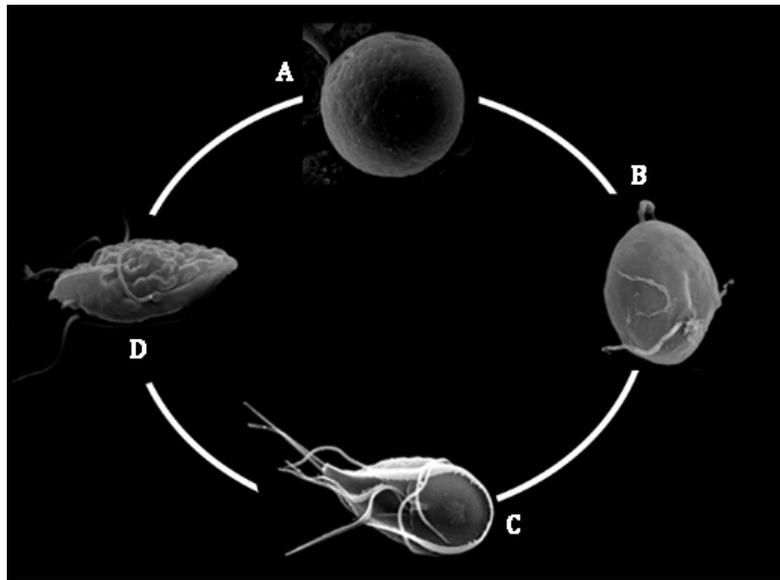


Figura 3. Ciclo biológico de *G. lamblia*. Los quistes (A) a través de un proceso de desenquistamiento (B) que comienza en el estómago, liberan los trofozoítos (C). Estos, se duplican en el intestino delgado (fundamentalmente en el yeyuno), y a medida que descienden por el intestino son inducidos a enquistarse (D). Los quistes formados son finalmente eliminados con las heces cerrando el ciclo vital del parásito (13).

4.3 Epigenética en eucariotas superiores

En todos los eucariotas, la información genética contenida en las moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA, del inglés *deoxyribonucleic acid*) está organizada en cromosomas, que contienen genes (13,20).

Las secuencias de DNA están formadas por millones de nucleótidos formados por pares de bases, abreviadas en cuatro letras: adenina (A), guanina (G), timina (T) y citosina (C), las cuales crean regiones codificantes y no codificantes en el genoma. En los eucariotas superiores, la molécula de DNA mide aproximadamente dos metros de largo, por lo que debe condensarse para almacenarse en los núcleos de las células. Así, el empaquetamiento del DNA se produce a través de proteínas denominadas histonas, de las cuales se distinguen cinco tipos: H1, H3, H4, H2A y H2B; dando como resultado la formación de estructuras repetitivas de DNA y proteínas

llamadas nucleosomas, que son las unidades básicas de la cromatina. Cada nucleosoma está conformado por dos dímeros de histonas H2A y H2B y un tetrámero de las histonas H3 y H4, formando así un octámero de histonas en el cual se enrolla el DNA. Entre cada nucleosoma queda un segmento de DNA denominado *DNA linker* (Figura 4) (21).

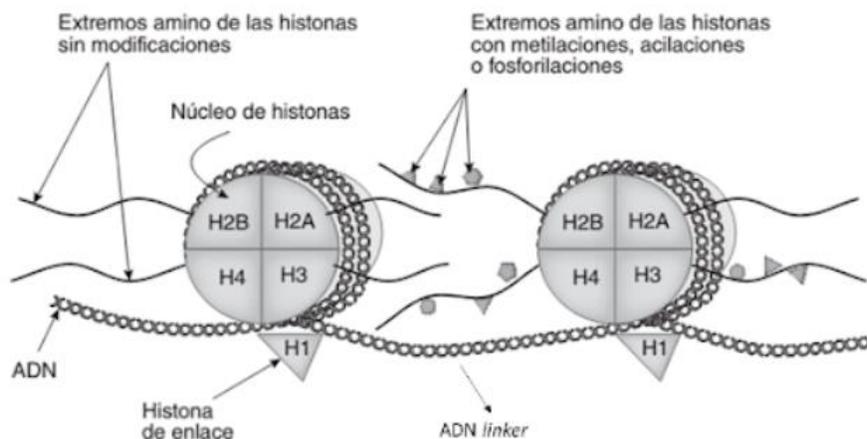


Figura 4. Estructura del nucleosoma.

La cromatina, a su vez, puede presentarse en dos formas diferentes, desde fibras altamente condensadas, heterocromatina, hasta una forma laxa en la que se pueden expresar genes, eucromatina. Pueden ocurrir cambios entre los dos estados compactados debido a la introducción de proteínas inusuales (variantes de histonas), una estructura alterada de la cromatina (remodelación de la cromatina) y la adición de ciertas PTM. Además, la adición de grupos metilo a bases de C en secuencias de DNA, denominada metilación del DNA, puede proporcionar sitios de señalización para ciertas proteínas que alteran el estado de la cromatina o afectan las modificaciones covalentes de las histonas adyacentes, aunque esta base no es la única que puede ser metilada (13,22).

El segmento de DNA que queda entre dos nucleosomas se asocia con la histona H1 que ayuda al empaquetamiento, facilitando la formación de la estructura llamada solenoide. Esta estructura se genera debido al enrollamiento de los nucleosomas, cada 6 nucleosomas se enrollan para generar un polinucleosoma (21).

Una vez generado el solenoide, se pliega y se condensa aún más formando estructuras de asas amplias superenrolladas, las cuales se anclan a proteínas de andamio y dan lugar a lo que se conoce como asas cromatínicas. Por último, estas asas se compactan y forman un cromosoma condensado, el cual es visible durante la interfase. Los cromosomas en su estado más condensado se observan durante la metafase (21).

Estos mecanismos proporcionan a la cromatina los principios para regular y organizar el genoma a un nivel funcional. Es por esta razón, que la epigenética puede definirse como una rama de la genética que estudia los cambios heredables en el DNA e histonas que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos y modifican la estructura y condensación de la cromatina por lo que afectan la expresión génica y el fenotipo (13,20).

4.3.1 Mecanismos epigenéticos

La genética es el estudio de los cambios hereditarios en la actividad o función de los genes debido a la alteración directa de la secuencia del DNA. Dichas alteraciones incluyen mutaciones puntuales, deleciones, inserciones y translocaciones. Por el contrario, la epigenética es el estudio de cambios hereditarios en la actividad o función de los genes que no están asociados con ningún cambio en la secuencia del DNA en sí. Aunque prácticamente todas las células de un organismo contienen la misma información genética, no todos los genes se expresan simultáneamente en todos los tipos de células. En un sentido más amplio, los mecanismos epigenéticos median los perfiles diversificados de expresión génica en una variedad de células y tejidos en organismos multicelulares (23).

Los sistemas epigenéticos están altamente conservados en los eucariotas, incluidos factores de transcripción, proteínas de cromatina, proteínas de unión a ácido ribonucleico (RNA, del inglés *ribonucleic acid*), RNA reguladores y nucleosomas. Además, cumplen un papel esencial en la modulación de la definición del desarrollo, morfología y fisiología de un organismo, mediante la regulación de la expresión génica. Por otro lado, permiten a los organismos adaptarse a cambios ambientales. Las experiencias previas pueden afectar a la

capacidad de respuesta de un organismo a largo plazo e incluso durante generaciones (8,13). A continuación, se describen los mecanismos epigenéticos presentes en eucariotas superiores.

4.3.1.1 Metilación del DNA

Un importante mecanismo epigenético que involucra una modificación química directa del DNA es la metilación de DNA, implicados en la regulación de la expresión génica en mamíferos (23). En 1948, Rollin Hotchkiss descubrió por primera vez la C modificada en una preparación de timo de ternera mediante cromatografía en papel. Hotchkiss planteó la hipótesis de que esta fracción era 5-metilcitosina (5 mC) porque se separaba de la C de una manera similar a la forma en que la T (también conocida como metiluracilo) se separaba del uracilo, y sugirió además que esta C modificada existía naturalmente en el DNA. Aunque muchos investigadores propusieron que la metilación del DNA podría regular la expresión genética, no fue hasta la década de 1980 que varios estudios demostraron que la metilación del DNA estaba involucrada en la regulación genética y la diferenciación celular. Ahora se reconoce ampliamente que la metilación del DNA, junto con otros reguladores, es un factor epigenético importante que influye en las actividades de los genes (23).

La metilación del DNA esta catalizada por una familia de DNA metiltransferasas (Dnmts) que transfieren un grupo metilo a la S-adenil metionina (SAM) al quinto carbono de un residuo de C para formar 5 mC (Figura 5), que se produce predominantemente en los dinucleótidos CpG en las células somáticas (23,24). Las regiones del genoma que tienen una alta densidad de CpG se denominan “islas CpG”, y la metilación del DNA en estas islas se correlaciona con la represión transcripcional (13).

Los Dnmts pueden ser por metilación *novo* (Dnmt3a y Dnmt3b), actúan después de la replicación del DNA, transfiriendo grupos metilo al DNA desnudo; o por metilación de mantenimiento (Dnmt1), agregan grupos metilo al DNA hemi-metilado (DNA bicatenario en el que una sola de las cadenas se encuentra metilada) durante la replicación del DNA (Figura 5) (23).

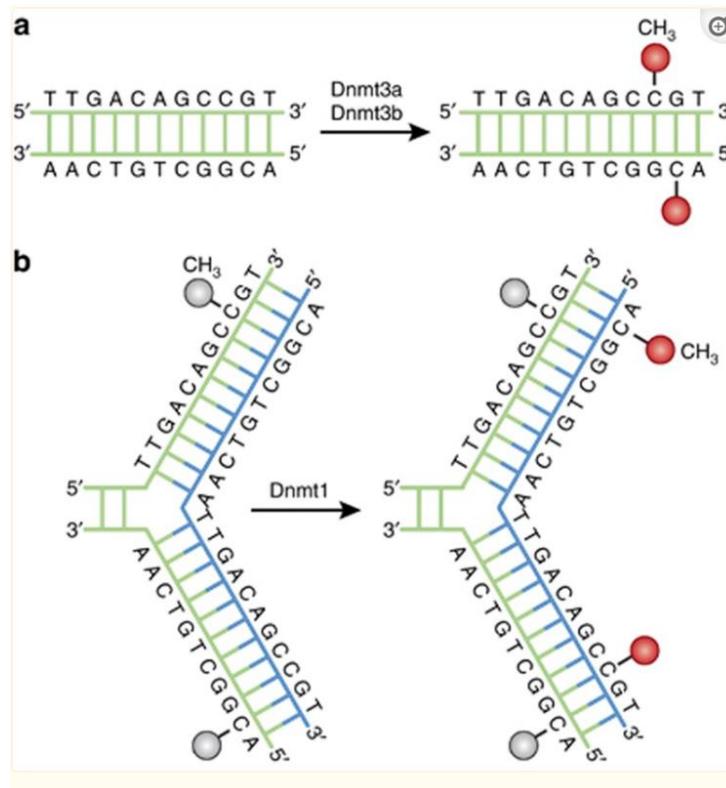


Figura 5. Vías de metilación del DNA. (a) Dnmt3a y Dnmt3b son los Dnmt *de novo* y transfieren grupos metilo (rojo) al DNA desnudo. (b) Dnmt1 es el Dnmt de mantenimiento y mantiene el patrón de metilación del DNA durante la replicación. Cuando el DNA sufre una replicación semiconservadora, el DNA parental conserva el patrón de metilación del DNA original (gris). Dnmt1 se asocia en los focos de replicación y replica con precisión el patrón de metilación del DNA original agregando grupos metilo (rojo) a la cadena hija recién formada (azul).

La maquinaria implicada en la metilación del DNA también comprende diferentes proteínas reguladoras incluyendo a las desmetilasas del DNA, proteínas de unión a metil-CpG, enzimas modificadoras de histonas y complejos remodeladores de la cromatina, las C dioxigenasas de translocación diez-once (TET) y las DNA glicosilasas de reparación por escisión de bases (BER). Además, la formación de la heterocromatina en muchos organismos está mediada en parte por la metilación del DNA y sus proteínas de unión, en combinación con RNA no codificante y con modificaciones de proteínas histonas que son características de cromatina

silenciada. La metilación del DNA es de vital importancia para mantener el silenciamiento génico en el desarrollo normal, la impronta genómica y la inactivación del cromosoma X (23,25,26).

En los procariotas, la metilación de los residuos de A y C contribuye a los sistemas de restricción del hospedero y protege a la célula de materiales genéticos extraños, como los genomas bacterianos y virales. Por el contrario, la metilación del DNA en eucariotas multicelulares se produce predominantemente, pero no exclusivamente, en los residuos de C dentro de los dinucleótidos CpG. En los vertebrados, la metilación del DNA es una forma importante de modificación epigenética y se regula durante el desarrollo para controlar los tejidos y los estados de diferenciación. Además, los patrones de metilación del DNA están alterados en los cánceres y en los embriones producidos por transferencia nuclear de células somáticas. Estos cambios contribuyen significativamente a la patología molecular de estos estados (24).

4.3.1.2 RNA de interferencia

La interferencia de RNA (RNAi) es un mecanismo de regulación génica utilizado como herramienta molecular para silenciar genes a nivel post-transcripcional. La interferencia por RNA proporciona una estrategia fácil y rápida para degradar los RNA mensajeros (mRNA) mediante la introducción de un RNA pequeño de doble cadena homólogo (siRNA) al mRNA celular de interés, removiendo de una manera secuencial específica (27). Esta degradación del RNA en RNA cortos activa las ribonucleasas para dirigirse al siRNA (20). Este silenciamiento de RNA es un nuevo mecanismo regulador de genes que limita el nivel de transcripción, ya sea suprimiendo la transcripción (silenciamiento de genes transcripcionales [TGS]), o activando un proceso de degradación de RNA específico de secuencia (silenciamiento de genes post-transcripcional [PTGS]/RNAi) (28).

Un análisis genético y bioquímico exhaustivo reveló un mecanismo de dos pasos de silenciamiento de genes inducido por RNAi. El primer paso implica la degradación del RNA doble cadena (dcRNA) en pequeños RNA de interferencia (RNAip), de 21 a 25 nucleótidos de

longitud, mediante una actividad similar a la ribonucleasa III (RNAasa III). En el segundo paso, los RNAip se unen a un complejo de RNAasa, complejo silenciador inducido por RNA (RISC), que actúa sobre el mRNA afín y lo degrada. Se han identificado varios componentes clave, como Dicer, RNA polimerasa dependiente de RNA, helicasas y endonucleasas de dcRNA, en diferentes organismos por sus funciones en la RNAi. Algunos de estos componentes también controlan el desarrollo de muchos organismos mediante el procesamiento de muchos RNA no codificantes, llamados microRNA. La biogénesis y la función de los microRNA se parecen en gran medida a las actividades del RNAi. Estudios recientes indican que en el contexto de RNAi, el genoma también sufre alteraciones en forma de metilación del DNA, formación de heterocromatina y eliminación programada del DNA. Como resultado de estos cambios, el efecto silenciador de las funciones genéticas se ejerce con la mayor intensidad posible. Debido a su exquisita especificidad y eficiencia, el RNAi se considera una herramienta importante no solo para la genómica funcional, sino también para actividades terapéuticas específicas de genes que se dirigen a los mRNA de genes relacionados con enfermedades (28).

4.3.1.3 Modificaciones post-traduccionales de histonas

Se conoce que las proteínas unidas al DNA en el núcleo eucariota, especialmente las proteínas histonas, podrían estar involucradas en modificar las funciones asociadas al DNA (18).

Las histonas son proteínas básicas de bajo peso molecular (11-16 kDa) que consisten en un dominio globular y un extremo amino terminal variable y cargado (cola de la histona). Estas colas amino terminales de las cuatro histonas canónicas son susceptibles a sufrir una serie de PTM. Las modificaciones que pueden ocurrir son acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y SUMOilación, la cual es una PTM mediante de cual alguna de las proteínas celulares es covalentemente modificada a través de la adición de otra pequeña proteína; entre otras (29–31).

Las modificaciones en las histonas afectan la estructura de la cromatina mediante la relación entre diferentes modificaciones en histonas y las modificaciones en el DNA. Las PTM,

como acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación y ADP ribosilación de los altamente conservados núcleos de las histonas, influyen en el potencial de expresión genética del DNA al modificar la accesibilidad que tiene la maquinaria transcripcional a este. La acetilación de histonas reduce la carga positiva neta en el nucleosoma desestabilizando la asociación de las histonas con el DNA (cargado negativamente), lo cual facilita el acceso a los factores de asociación de la cromatina y promueve, de una manera más prominente, la transcripción (24,25). Por lo tanto, equilibrando los niveles y la actividad de histonas acetiltransferasas (HAT) y deacetilasas (HDAC), que agregan y eliminan respectivamente grupos acetilo de las histonas (y otras proteínas), la transcripción puede activarse o reprimirse. Entre los diferentes tipos de modificaciones de histonas, la metilación de residuos específicos de lisina en los extremos aminoterminales son fundamentales para la formación de dominios funcionales de cromatina, como eucromatina y heterocromatina facultativa y constitutiva (24,25). La acetilación-deacetilación de lisinas se correlaciona con accesibilidad de la cromatina y transcripción, mientras que el efecto de la metilación de lisinas depende del número de grupos metilo y posición de los residuos de lisina (24,25).

4.4 Regulación epigenética en *G. lamblia*

G. lamblia muestra diferentes estrategias para adaptarse a las condiciones ambientales, evadir el sistema inmunológico y resistir la exposición a agentes antimicrobianos. Se ha demostrado que la regulación epigenética de la expresión génica tiene un papel relevante tanto en la función de trofozoíto como el quiste en el ciclo biológico, incluido el enquistamiento. Curiosamente, el análisis del genoma de *G. lamblia* reveló la presencia de enzimas responsables de las PTM (18,32–34).

G. lamblia es un protozoario que se caracteriza por poseer diversos mecanismos los cuales le permiten adaptarse dentro o fuera del hospedero. La supervivencia de *G. lamblia* depende de la efectividad de sus mecanismos de adaptación. Entre ellos podemos mencionar los procesos de enquistamiento, variación antigénica y resistencia a antiparasitarios (18).

4.4.1 Proceso de enquistamiento de *G. lamblia*

Un paso importante en el ciclo biológico del protozoo patógeno *G. lamblia* es la transformación gradual del trofozoíto móvil, flagelado, binucleado (4N), con forma de media pera en el quiste no proliferativo (16N) (Figura 6); esta transformación es crucial para la supervivencia del parásito fuera del hospedero (35,36).

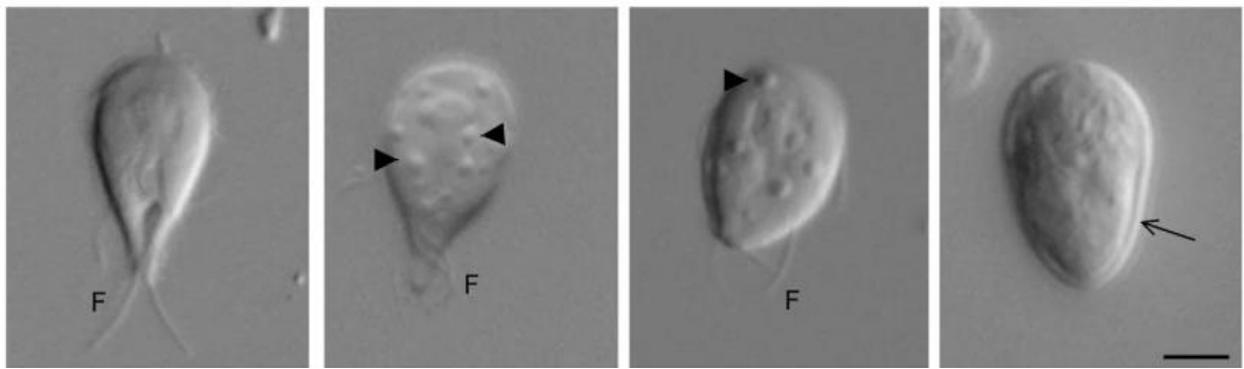


Figura 6. Enquistamiento de *G. lamblia*: del trofozoíto al quiste. Las imágenes de izquierda a derecha muestran un trofozoíto vegetativo, trofozoítos a las 21 y 42 h de enquistamiento y un quiste resistente al agua. Los trofozoítos enquistados gradualmente se redondean y desarrollan numerosos ESV (puntas de flecha) que exportan componentes CW (flecha). F, flagelos. Barra: 5 mm.

El análisis morfológico mostró que durante la transformación trofozoíto-quiste se producen cambios importantes, dividiéndose en dos etapas: la temprana y la tardía. En la etapa temprana se produce la modificación de la forma del protozoo, internalización de los flagelos, fragmentación del disco de succión y aparición de vesículas específicas del enquistamiento (ESV), las cuales transportan CWP 1-3, contenidas en el retículo endoplásmico (RE); que luego se fusionan con la membrana plasmática formando la pared celular (35,37,38). Las ESV cuentan con la maquinaria necesaria para el procesamiento post-traducciona l y la posterior participación de los CWP en distintas fases. Los CWP constituyen la mayor parte de la pared del quiste, junto

con el homopolímero de GalNAc unido a β -1,3. En la fase tardía ocurre la división de los 2 núcleos, replicación del DNA y se finaliza la maduración de la pared del quiste (37).

Varios estudios transcriptómicos *in vitro* e *in vivo* han proporcionado importantes conocimientos sobre el proceso de enquistamiento en *G. lamblia*. Estas investigaciones revelaron cambios en el metabolismo glucolítico, proteolítico y lipídico, el cambio de proteínas de superficie y la importancia de los factores de remodelación de la cromatina durante el enquistamiento (37,39).

4.4.1.1 Regulación transcripcional del enquistamiento

El control molecular del enquistamiento no se conoce del todo. La expresión de RNA de las tres enzimas biosintéticas CWP y glicopolímero (CWG) está en gran medida regulada positivamente transcripcionalmente (36).

Se han descrito tres factores de transcripción de unión al DNA giardiales. Sólo GARP *glp1* y el factor de transcripción Myb2 (del inglés, *Myeloblastosis-related transcription factors*) están regulados positivamente en enquistamiento. Myb2 se une a secuencias diana en las regiones proximales *upstream* de los genes CWP y de glucosamina-6-fosfato isomerasa (G6PI), enzima involucrada en la biosíntesis de GalNAc, y del propio Myb2. Las transcripciones de la mayoría de los genes giardiales se inician en secuencias similares a iniciadores ricos en A/T cerca del inicio de la traducción. Se informó que una región *downstream* afecta la estabilidad de la transcripción (36).

Se descubrió que las proteínas reguladoras de la cromatina, como las HDAC, HMT, HAT, así como la helicasa remodeladora de la cromatina SNF2 (del inglés, *Sucrose Non Fermentable*) exhibieron cambios coordinados en la expresión, lo que sugiere que el proceso de enquistamiento es regulado de manera epigénética (18). Además, se demostró que los niveles de acetilación de *G. lamblia* disminuyen durante el enquistamiento, y mostraron que la inhibición de HDAC disminuye la formación de quistes al bloquear la expresión de los genes específicos del enquistamiento, Myb1, CWP 1-3, G6PI (33).

Utilizando un modelo murino *in vivo* se mostró que *G. lamblia* coloniza e induce enquistamiento en alta densidad tanto en el intestino delgado proximal como en el distal (40). En particular, esta alta densidad de parásito puede limitar las concentraciones locales de nutrientes, alterar el pH local y aumentar el nivel de nicotin adenin dinucleótido oxidada (NAD^+), que podría activar las sirtuinas, que se conocen como una familia de proteínas con funciones versátiles, como el control metabólico, la modificación epigenética y la extensión de la vida (40). La familia de proteínas deacetilasas dependientes de NAD^+ (SIR2) demostró ser importante en la primera etapa de enquistamiento, especialmente porque estas proteínas pueden funcionar como sensores metabólicos. *G. lamblia* tiene 5 ORFs identificados como sirtuinas mediante búsquedas homológicas: ORF10707, ORF10708 y ORF11676 (Clase I), ORF16569 (Clase III), relacionado específicamente con Sirt5 mitocondrial de humanos, y finalmente ORF6942 (que se sugiere pertenece a la subclase U). En particular, sólo el ORF10707 se ha caracterizado experimentalmente como una deacetilasa dependiente de NAD^+ (18,33). Las células de *G. lamblia* tratadas con Tricostatina A (TSA) y butirato de sodio (NaB), inhibidores comunes de las histonas deacetilasas independientes de NAD^+ , aumentaron la señal de H3K9ac y H4K8ac, mientras que la inhibición con nicotinamida (Nt), un inhibidor de las sirtuinas, elevó las señales de H3K9ac, H4K8ac y principalmente niveles de H4K16ac. Además, se observó una disminución temporal en las marcas H4K8ac y H4K16ac durante el enquistamiento temprano (primeras 4-5 horas del proceso) (18). Curiosamente, se observaron niveles basales elevados de H4K8ac en la región 5' *upstream* del gen CWP2 en los trofozoítos cuando este gen no se expresa, mientras que se produce una disminución significativa en la acetilación de esta región al principio de la fase del enquistamiento, lo que sugiere que puede ser necesario un estado de cromatina abierta para la represión de genes específicos del enquistamiento (18).

4.4.1.2 Transducción de señales en enquistamiento

Durante el enquistamiento, las modificaciones morfológicas se coordinan con la salida del ciclo celular y la disminución del metabolismo (36). La señalización celular es lo que controla las principales funciones en todas las células eucariotas, y las quinasas y fosfatasa tienen un papel

importante como interruptores moleculares, en función de su mayor expresión de mRNA o proteínas y/o su localización en ESV y CW (35,36). Se identificó una quinasa cAMP (PKA, PKAc y PKAr) en *G. lamblia* denominada gPKA y se sugirió que tuviera participación en la motilidad durante el crecimiento y desenquistamiento (38). La misma proteína tiene una subunidad catalítica y reguladora, que tiene un incremento en la actividad y expresión durante el enquistamiento. PKB también se demostró estar presente en *G. lamblia* y está regulado durante el enquistamiento, teniendo la histona H1 como sustrato en una frecuencia notable (37). Además, se evidenció que ERK1 y ERK2 (miembros de la familia MAPK) están presentes en *G. lamblia*, aunque su expresión es menor durante el enquistamiento (36). Han comprobado que la proteína fosfatasa 2A (PP2A-C) está regulada positivamente durante el enquistamiento y el enfoque de expresión antisentido mostró menos ESV y quistes sanos, lo que sugiere un papel importante de esta PP2A en la diferenciación (36). Más recientemente mostraron diversas formas de PKCb en *G. lamblia*, aumentando las tasas de expresión y los cambios de localización durante el enquistamiento. Se identificaron 2 supuestos genes PI3K (Gipi3k1 y Gipi3k2, tipo I y tipo III, respectivamente, que controlan la transducción de señales extracelulares y el seguimiento de vesículas) lo que sugiere un papel importante de esta quinasa en el desenquistamiento (39).

Todas estas proteínas de señalización (excepto ERK2 y PKCb) se localizan constitutivamente en los cuerpos basales/centrosomas de *G. lamblia*. También se localizan en estructuras citoesqueléticas exclusivas de *G. lamblia*, como los característicos bastones paraflagelares y el disco de succión. Su orientación diversa sugiere que cada proteína de señalización tiene un papel distinto en el enquistamiento. La localización de PKAc/r, PP2A-C, PKCb y ERK1/2 cambia en respuesta a los estímulos fisiológicos que inducen el enquistamiento (36,39).

4.4.2 Proceso de variación antigénica de *G. lamblia*.

La variación antigénica es el proceso por el cual los distintos protozoarios tienen la capacidad de modificar las proteínas de su superficie para evitar la detección y el ataque del sistema inmunológico del hospedero (41). Con respecto a *G. lamblia*, esto le permite persistir en el intestino delgado y causar infecciones crónicas en humanos y otros vertebrados (42).

La variación antigénica en *G. lamblia* involucra a las VSP que cubren toda la superficie del trofozoíto y son los principales antígenos reconocidos por el sistema inmunitario del hospedero. Las VSP son resistentes a la digestión proteolítica y al pH extremo y protegen al parásito de las duras condiciones de la parte superior del intestino delgado. Se ha visto, además, que las VSP coordinan metales como el hierro y el zinc (43). Estas son proteínas de membrana integral con dominios extracelulares antigénicamente variables que contienen múltiples motivos CXXC (Figura 7) y una región altamente conservada en el extremo C-terminal que comprende un dominio transmembrana (TMD) hidrofóbico y una cola citoplasmática corta (CT). La región N-terminal extracelular de las VSP es de longitud variable y rica en Cys, con múltiples motivos CXXC, la cual desempeña un papel importante en la interacción entre el hospedero y el medio ambiente (43,44). Esta abundancia de residuos Cys, además de promover la resistencia a las proteasas intestinales y a las sales biliares, puede estar implicada en la detección y/o transducción de señales provenientes del ambiente extracelular (44). Los múltiples motivos CXXC se consideran elementos claves contra las variaciones redox, actuando como un reóstato que impide la destrucción de proteínas (44).

También se producen cambios en la expresión de VSP durante el proceso de enquistamiento. Anteriormente se mencionó que la regulación de la expresión de VSP está controlada post-transcripcionalmente por un mecanismo similar al RNAi. Además, se demostró que los miRNA podrían estar implicados en el control de la expresión de VSP a nivel traduccional (29).

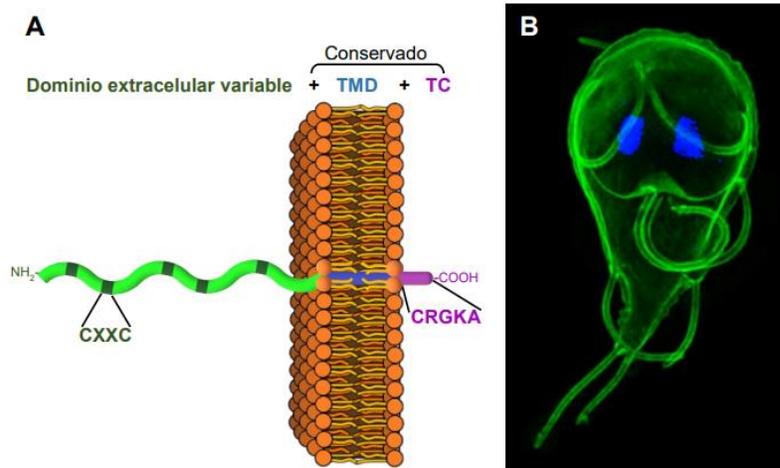


Figura 7. Estructura y localización de las VSP de *G. lamblia* (45). (A) Diagrama de la estructura proteica de una VSP. Se esquematiza el dominio extracelular variable (verde) con múltiples motivos CXXC (C, Cys; X, cualquier aminoácido) y el extremo conservado constituido por el dominio transmembrana (TMD, azul) y el tallo citoplasmático (TC, violeta) de secuencia CRGKA. (B) Localización de las VSP en trofozoítos de *G. lamblia*. Imagen de microscopía de iluminación estructurada (SIM) de ensayo de inmunofluorescencia mostrando la localización de la VSP TSA417 sobre la superficie de un trofozoíto mediante la utilización del anticuerpo monoclonal (mAb) específico 7C2 (verde). Los núcleos están teñidos con DAPI (azul).

Se pudieron estudiar entre 190 y 200 genes que codifican para las distintas VSP, pero se vio que *G. lamblia* expresa solo una VSP en la superficie del parásito en un momento determinado. Como en la mayoría de los genes de *G. lamblia*, los genes de VSP no tienen intrones y sus 59 regiones *upstream* son relativamente cortas y se localizan lejos de los telómeros. Se ha descubierto que tienen una conservación de secuencia limitada o nula (44). Además, no hay promotores eucarióticos típicos en estas regiones. Las 39 regiones *downstream* de los genes de *G. lamblia*, incluidos los genes que codifican VSP, también tienden a ser cortas, normalmente de 0 a 30 nucleótidos de longitud (44).

Debido a que *G. lamblia* es un organismo binucleado, cualquier mecanismo molecular que controle la variación antigénica debe coordinar la expresión de VSP entre ambos núcleos del parásito. Por ende, un mecanismo de control post-transcripcional suele ser muy favorable para *G. lamblia* (44). Esta expresión de VSP post-transcripcional está regulada por un mecanismo similar

al RNA de interferencia (RNAi-like). La variación antigénica en *G. lamblia* implica tres características: 1) una gran familia de genes homólogos que codifican antígenos de superficie inmunodominantes; 2) un mecanismo que permite la expresión de un solo miembro de dicha familia en células individuales; y 3) un sistema molecular de expresión reversible, que determina el cambio de un antígeno por otro (42). El número de genes de VSP desempeña un papel importante a la hora de considerar los mecanismos propuestos para controlar la variación antigénica en este parásito (44). La regulación de la expresión de dichas proteínas implica un sistema que comprende una RNA polimerasa dependiente de RNA para poder cambiar espontáneamente la expresión de estas (41). Como se puede observar en la Figura 8, la variación de las VSP en la superficie de los parásitos se puede dar tanto por factores externos como por anticuerpos anti-VSP creados por el sistema inmune como defensa, o también por cambios en el estado nutricional de la célula. Los cambios conformacionales que se van a dar en los antígenos de superficie a raíz de estos factores pueden iniciar una cascada de transducción de señales que van a modificar la tasa de transcripción de diferentes genes de VSP mediante factores epigenéticos o activando la vía de las PTGS (13). La remodelación de la cromatina podría desempeñar un papel fundamental en la regulación de la transcripción de las VSP. La mayoría de las VSP se transcriben simultáneamente, aunque con diferente eficiencia. La RNA polimerasa citoplasmática dependiente de RNA de *G. lamblia* (GIRdRP) detecta múltiples mRNA de VSP homólogos y genera RNA antisentido dirigidos a todos los transcritos de VSP menos a uno. La endonucleasa de *G. Lamblia* Dicer (GIDicer) procesa los dcRNA de VSP en siRNA. El silenciamiento de GIRdRP o GIDicer conduce a un cambio en la expresión de VSP única a múltiple en la superficie del trofozoíto. Solo un transcripto se traduce a la VSP que se expresa en la superficie del trofozoíto (13).

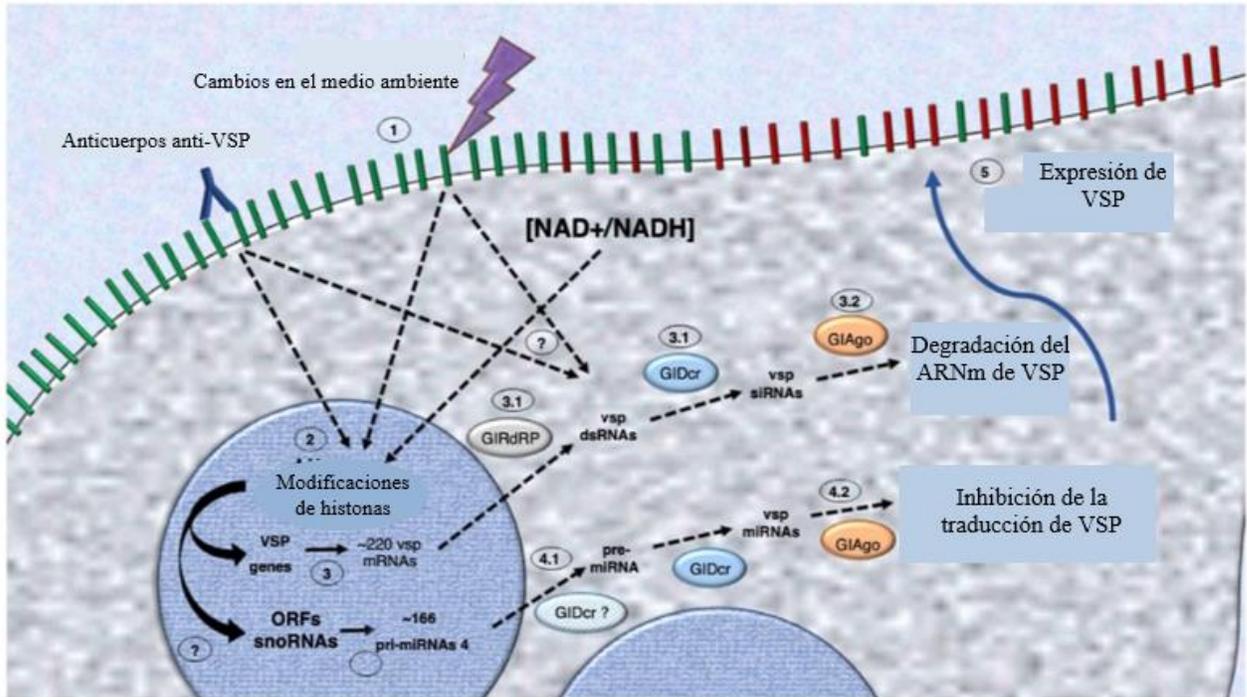


Figura 8. Mecanismo moléculas de control de variación antigénica en *G. lamblia*.

Para indagar en los mecanismos moleculares implicados en la variación antigénica de *G. lamblia*, se realizó experimentos de nuclear run-on para determinar si la regulación de la expresión de las VSP se controla a nivel transcripcional o post-transcripcional. A través de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) se investigó la existencia de RNA sentido y anti-sentido en trofozoítos y la actividad de enzimas implicadas en la síntesis y degradación de dcRNA en algunos eucariotas, como la GIRdRP, GIDicer y Argonauta. Se demostró que en poblaciones clonales de trofozoítos que expresaban la misma VSP se transcribían eficazmente varios genes VSP, pero solo se observaban transcritos correspondientes a la VSP que se estaba expresando (13).

4.4.3 Mecanismo de resistencia a antiparasitarios

Existen varias clases de medicamentos antimicrobianos disponibles para el tratamiento de la giardiasis que abarcan a los derivados de 5-nitroimidazol como el metronidazol (MTZ), tinidazol, secnidazol y ornidazol; bencimidazoles como el albendazol (ABZ), mebendazol; otros como nitazoxanida (NTZ), un derivado del 5-nitrotiazol con actividad de amplio espectro contra protozoos, helmintos y algunas bacterias; furazolidona, quinacrina, cloroquina y paromomicina, con diferente disponibilidad dependiendo del país (46). Los más utilizados en todo el mundo son miembros de la familia 5-nitroimidazol como MTZ (Figura 9) y tinidazol (47,48). Sin embargo, esta terapia de primera línea falla en hasta 20% de los casos y puede producirse resistencia cruzada entre diferentes agentes, como es el caso de la corresponsencia de MTZ con NTZ (48,49). Se ha reportado resistencia a todos los principales fármacos giardicidas registrándose diferentes mecanismos de resistencia al MTZ y a los bencimidazoles, como el ABZ y mebendazol (50,51).

Aunque, como se enuncio anteriormente, las tasas de eficacia varían de alrededor del 73% al 100% debido al aumento de resistencia clínica y diversos efectos secundarios que conducen al fracaso del tratamiento (12).

El mecanismo de acción correspondiente a MTZ se caracteriza por actuar sobre las proteínas transportadoras de electrones en la cadena respiratoria de *G. lamblia* (52). Es por ello, que el MTZ y otros nitrofármacos se reducen a un nitro radical por enzimas oxidorreductasas que incluyen: piruvato-ferredoxina oxidorreductasas (PFOR), ferredoxina (Fd), nitrorreductasa 1 (NR-1) y tiorredoxina reductasa (TrxR) induciendo estrés oxidativo en *G. lamblia* (52,53). Expresado de otro modo, MTZ ingresa al trofozoíto, y una vez dentro de la célula, las proteínas transportadoras de electrones Fd del parásito donan electrones al grupo nitro del fármaco. El fármaco se “activa” por la reducción de este grupo nitro y esta reacción de reducción establece un gradiente que favorece el transporte intracelular del MTZ. El MTZ reducido actúa como aceptor terminal de electrones que se une covalentemente a las macromoléculas de DNA. Esto produce daño en el DNA en forma de pérdida de la estructura helicoidal, deterioro de la función de la plantilla y rotura de la cadena, con la posterior muerte del trofozoíto consecuencia de la liberación de intermediarios reactivos, tóxicos y parcialmente reducidos (48).

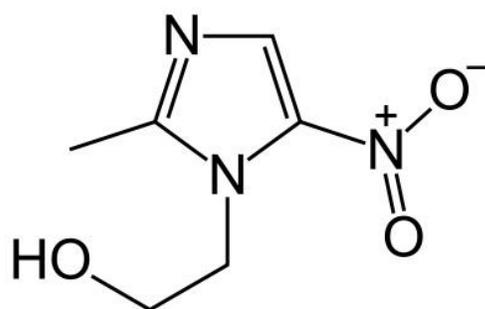


Figura 9. Estructura química del Metronidazol (54).

Se comprobó que las modificaciones epigenéticas y la expresión de distintas proteínas están relacionadas a fenotipos de resistencia a metronidazol (MTZR). Esto se debe a que varias proteínas dentro de las líneas de MTZR están sujetas a ubiquitinación, fosforilación, metilación y acetilación diferenciales. Las sirtuinas también están asociadas con MTZR. Pueden ser consideradas reguladoras de la respuesta transcripcional inicial contra el estrés oxidativo debido a que utilizan NAD^+ en el proceso de HDAC y su actividad aumenta de acuerdo con el aumento de la relación intracelular de NAD^+ / nicotin adenin dinucleótido reducida (NADH) (18).

Las cepas resistentes de *G. lamblia* pueden volverse sensibles tanto después de la enquistamiento como de la desenquistamiento y después de crecer durante varias generaciones sin presión selectiva (52). Por otro lado, niveles crecientes de *G. lamblia* clínicamente resistente a MTZ se transfieren entre pacientes, lo que implica que la resistencia es un fenotipo estable y transmisible (52).

El ABZ tiene impactos importantes en *G. lamblia* sobre la morfología y estructura celular, lo que conduce particularmente a defectos morfológicos y desintegración del disco de succión y los flagelos, y a la interrupción del ciclo celular, más notablemente la transición de G_2/G_1 . Este fármaco, es un antiparasitario de amplio espectro que se une a la interfaz del dímero de tubulina superponiéndose al sitio de unión de colchicina (CBS) de la β -tubulina impidiendo así su polimerización; esto a su vez desestabiliza los microtúbulos dentro de la célula, inhibiendo así la movilidad y el transporte molecular (51,55). ABZ se transforma en sulfóxido (ABZSO), el principal metabolito citotóxico, y posteriormente en sulfona (ABZSOO) mediante la acción principalmente de las monooxigenasas del citocromo (CYP) P450 y de la monooxigenasa que

contiene flavina (FMO). La estructura de dichos compuestos puede observarse en la Figura 10 (55). Los CYP son proteínas hemo que catalizan la biotransformación de una amplia variedad de compuestos químicos y estructuralmente diversos, incluido >85% de los fármacos terapéuticos utilizados actualmente. Los CYP activan el oxígeno molecular mediante la entrada secuencial de dos electrones a través de las actividades de la NADPH-CYP P450 oxidorreductasa (CPR) y el CYP *b5*. Curiosamente, *G. lamblia* lleva a cabo la biotransformación de ABZ en ABZSO y ABZSOO, a pesar de la ausencia de FMO y CYP (55).



Figura 10. Estructura química de ABZ, ABZSO, ABZSOO y vía esquemática del metabolismo de ABZ.

La resistencia a ABZ parece ser causada principalmente por polimorfismos de un solo nucleótido en tres codones (167, 198 y 200) del gen de la β -tubulina, que cambian la estructura de la β -tubulina de la proteína y alteran su unión a ABZ; más notablemente en F167, que corresponde a una adición de fenilalanina en el aminoácido 167, E198K, debido a una mutación del ácido glutámico a lisina en el aminoácido 198 (Figura 11) (51) y F200, se correlaciona a una adición de fenilalanina en el aminoácido 200. Estas mutaciones interrumpen la unión de ABZ en el sitio de unión de colchicina (CBS) formado entre la interfaz de tubulina α y β durante la polimerización de microtúbulos (56). Estudios de la resistencia a ABZ en *G. lamblia* mostraron que los trofozoítos resistentes acumulan niveles más bajos de metabolitos de ABZ y tienen una mayor expresión de mRNA de genes que codifican enzimas involucradas en la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (NADH oxidada, peroxiredoxina 1a y proteína flavodiiron), proteína de superficie variante relacionada con la resistencia a ABZ (ARR-VSP) y una mayor reserva de tioles (55).

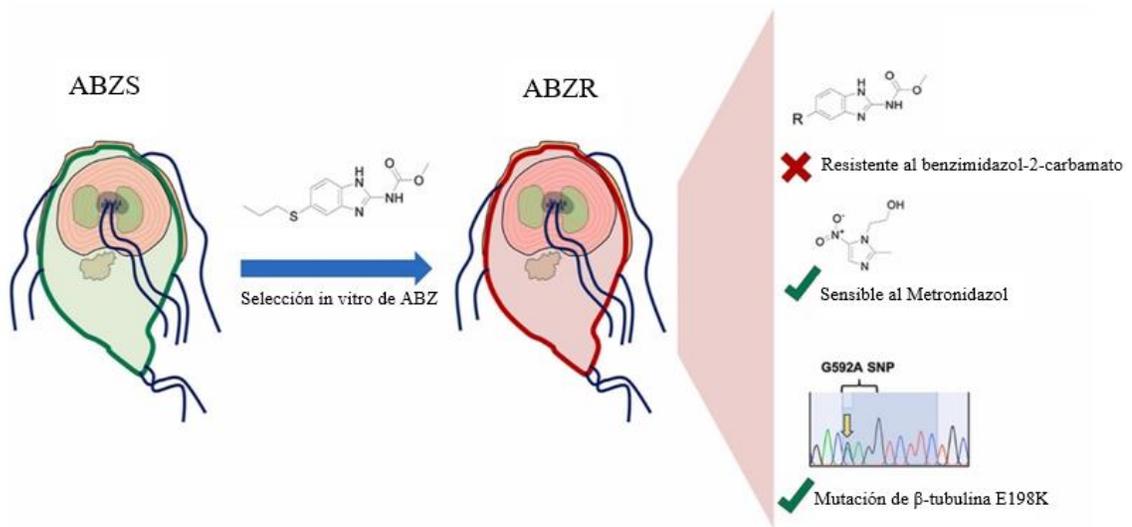


Figura 11. Polimorfismo E198K. La secuenciación de *G. lamblia* identificó un polimorfismo de un solo nucleótido que resulta en una mutación del ácido glutámico a lisina en el aminoácido 198 (E198K).

Otro mecanismo de resistencia al ABZ mostrado por *G. lamblia* es la enzima perteneciente a la clase de flavohemoglobina (gFIHb). La gFIHb contribuye a la biotransformación de ABZ a ABZSO a través de la oxigenación. Este proceso empieza con el flujo de electrones desde NADH y/o NADPH al aceptor final CYP. La expresión de mRNA del gen respectivo está regulada negativamente en parásitos resistentes a ABZ (55). *G. lamblia* al carecer de mitocondrias y no es capaz de sintetizar hemo, tiene al menos cinco proteínas hemo; cuatro de ellos son miembros de la familia del CYP *b*₅ de proteínas de transferencia de electrones y la gFIHb. Estas enzimas, son mejor conocidas por su capacidad para actuar como dioxigenasas de óxido nítrico (NOD), en las que un electrón suministrado por un cofactor de NADH se transfiere a través de flavín adenín dinucleótido oxidada (FAD) al dominio de globina donde se combina con oxígeno molecular y óxido nítrico (NO) para producir nitrato. De esta manera se consume el radical libre NO potencialmente dañino. De acuerdo con esta función, los niveles de mRNA, proteína y actividad NOD de gFIHb aumentan en los trofozoítos de *G. lamblia* sometidos a estrés nitrosativo en cultivo (55).

4.5 Técnicas de laboratorio utilizadas para evaluar los mecanismos de regulación epigenética

El estudio de los mecanismos de regulación epigenética en *G. lamblia* es un campo de investigación relativamente nuevo, el cual se encuentra en desarrollo. Para evaluar dichos mecanismos, se pueden utilizar diversas técnicas como las que se nombran a continuación:

- Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)
- Fármacos inhibidores de enzimas involucradas en PTM
- Western Blot
- RT-qPCR
- Anticuerpos monoclonales (mAb)
- Microscopía de fluorescencia
- Espectrometría de masa

4.5.1 Inmunoprecipitación de la cromatina

La ChIP es una técnica ampliamente utilizada en el campo de la epigenética debido a que permite el estudio de las interacciones proteína-gen, lo cual genera la posibilidad de comprender la estructura de la cromatina y la regulación de la expresión génica. Usando ChIP, las interacciones DNA-proteína se estudian dentro del contexto de la célula. Los pasos básicos de esta técnica son la fijación, la sonicación, la inmunoprecipitación y el análisis del DNA inmunoprecipitado (57). La asociación entre las proteínas y el DNA es crucial para muchas funciones celulares vitales, como la transcripción de genes, la replicación y recombinación del DNA, la reparación, la segregación, la estabilidad cromosómica, la progresión del ciclo celular y el silenciamiento epigenético. Es importante conocer los objetivos genómicos de las proteínas de unión al DNA y los mecanismos mediante los cuales controlan y guían las vías de regulación genética y la proliferación celular (57).

La estructura tridimensional de la cromatina se mantiene mediante la unión de histonas y otras proteínas reguladoras al DNA. Es vital saber cómo las proteínas de unión al DNA afectan el funcionamiento de cualquier gen en particular e identificar qué proteína en particular se une a una secuencia de DNA específica *in vivo*. Debido a que las proteínas se capturan en los sitios de unión con el DNA, ChIP ayuda a detectar las interacciones DNA-proteína que tienen lugar en las células vivas (57).

Hay dos tipos principales de ensayos ChIP: X-ChIP y N-ChIP. El método X-ChIP utiliza cromatina fija fragmentada por sonicación, mientras que el N-ChIP utiliza cromatina nativa, que no está fijada y se digiere con nucleasas (57).

Para la secuenciación de inmunoprecipitación de ChIP en *G. lamblia* se utilizó X-ChIP (58). Esta técnica se puede utilizar dentro del estudio de las modificaciones epigenéticas en *G. lamblia* para investigar si la expresión de RNA ribosomal está regulada por modificaciones en las histonas. Para realizar dicho estudio se debe realizar ChIPs utilizando diferentes anticuerpos para lograr la identificación de regiones reguladoras (58).

4.5.2 Fármacos inhibidores de enzimas involucradas en PTM

Dentro de este grupo, existen fármacos como TSA, un ácido hidroxamínico derivado de *Streptomyces*, y NaB, un ácido lipídico de cadena corta, son moléculas que inhiben las deacetilasas independientes de NAD⁺ al bloquear el sitio activo de la enzima, y Nt, un inhibidor de las HDAC dependientes de NAD⁺ (29). Estos fármacos, al inhibir las HDAC, causan un aumento en la acetilación de las histonas, lo que puede llevar a la expresión aumentada o disminuida de ciertos genes. Son utilizados en el estudio de las PTM debido a que permiten comprender mejor los mecanismos epigenéticos y regulaciones génicas debido a su capacidad para modificar histonas (29).

4.5.3 Western Blot

Western Blot es una técnica analítica ampliamente utilizada para el estudio de proteínas. Este método permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica (59,60).

Esta técnica se utiliza para detectar PTM involucradas en mecanismos epigenéticos en *G. lamblia*. Al detectar las modificaciones como acetilación, fosforilación, entre otras, se obtiene información sobre cómo pueden afectar los cambios epigenéticos en la regulación génica y aquellos fenotipos observados. Además, mediante el uso de anticuerpos comerciales dirigidos contra PTM podemos saber si esas marcas están o no presentes en el parásito (59,60).

Los pasos generales para la realización de esta técnica constan de preparación de la muestra para extraer proteínas, seguido de una electroforesis en gel mediante SDS-PAGE. El siguiente paso es la transferencia de las proteínas a un soporte sólido que une e inmoviliza las proteínas, permitiendo así la detección de un anticuerpo mediante inmunotinción (59,60).

4.5.4 RT-qPCR

Los cambios de la expresión génica se dan como resultado a cambios en el ambiente o cambios internos. La PCR cuantitativa en tiempo real con transcripción reversa (RT-qPCR) es un método maravilloso para el análisis de la expresión genética, el cual es rápido, preciso y sensible (61). La RT-qPCR- implica varias etapas:

- 1^{ra} etapa: obtención, aislamiento y purificación del mRNA contenido en la célula, mediante extracción con solventes orgánicos (62).
- 2^{da} etapa: retrotranscripción. El mRNA servirá como plantilla para la acción de la retrotranscriptasa, que sintetizará moléculas de DNA complementario (cDNA) (62).

- 3^{ra} etapa: amplificación del cDNA: mediante la utilización de oligonucleótidos específicos (*primers forward y reverse*) que actuarán como cebadores de la acción de la polimerasa, se amplificará el cDNA de aquellos genes cuya expresión nos interese analizar (62).

Esta amplificación puede llevarse a cabo con fines cualitativos (PCR convencional) o con fines cuantitativos (RT-qPCR) (62).

La RT-qPCR se diferencia de la PCR convencional en varios puntos. El más importante es que mediante la amplificación con PCR sólo podemos observar el punto final. Es decir, podemos observar si hay o no expresión del gen de interés (cualitativa). La RT-qPCR nos permite saber cuánto hay de cada gen estudiado (cuantitativo) (62).

En epigenética, se utiliza RT-qPCR, principalmente para cuantificar los niveles de mRNA correspondiente a los genes que están bajo la influencia de los mecanismos epigenéticos que se estén estudiando, además de que permite el estudio de PTM (33).

4.5.5 Anticuerpos monoclonales

La detección de proteínas con mAb es una técnica altamente específica y sensible. Es posible detectar y cuantificar VSP en *G. lamblia* a partir de la generación de anticuerpos monoclonales. Dependiendo de la etiqueta utilizada, se emplea un método de detección adecuado. Por ejemplo, si se utilizó una etiqueta de fluorescente, se puede utilizar un microscopio de fluorescencia para visualizar la señal. Si se utilizó una enzima, se puede realizar una reacción enzimática que produzca un producto detectable (63). Para la generación de los mAb se debe inmunizar un animal con la VSP que se quiere detectar en *G. lamblia*. Luego se aíslan las células productoras de anticuerpos y se fusionan con las células productoras de mieloma para crear hibridomas que producen mAb. Los anticuerpos producidos se pueden etiquetar con sustancias fluorescentes, enzimas u otras moléculas que permitan su detección, los cuales facilitan la visualización o medición de las proteínas de interés (63).

4.5.5.1 Microscopia de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una técnica avanzada de microscopía que se utiliza para observar y estudiar estructuras y procesos celulares y subcelulares mediante el uso de fluoróforos, los cuales son moléculas que emiten luz fluorescente cuando son excitadas por luz de una longitud de onda específica (64,65).

De esta manera, luego de la correcta unión del mAb a la proteína de interés, una de las maneras que se utiliza para detectar la presencia de la misma es a través de la utilización de un microscopio de fluorescencia. Por ejemplo, si a un trofozoíto que en su superficie expresa la VSP9B10, se lo marca con un mAb dirigido contra esta proteína y este está marcado con un conjugado, entonces la forma de detectar la presencia de la proteína de interés es a través de inmunofluorescencia. Por otro lado, como en el caso de la técnica de Western Blot, la microscopía de fluorescencia también admite el uso de anticuerpos dirigidos contra marcas covalentes ubicadas en las histonas. De esta manera se puede localizar estas PTM dentro del contexto celular y también se puede evaluar su intensidad de fluorescencia a lo largo del ciclo particular del modelo con el que se esté trabajando (64).

4.5.6 Espectrometría de masa

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica instrumental de alto rendimiento altamente sensible. Se utiliza para determinar la masa molecular, pero también proporciona información sobre la estructura molecular e incluso se utiliza para la cuantificación. En el campo de la epigenética y particularmente en *G. lamblia*, la espectrometría de masas se utiliza para estudiar PTM. Su función principal es detectar y caracterizar las modificaciones específicas que ocurren en las proteínas durante su síntesis. La alta velocidad, resolución y la posibilidad de combinar MS con técnicas de separación, han convertido a la MS en la técnica elegida para el descubrimiento y la cuantificación de PTM de histonas. Esta técnica es mucho más sensible que

aquellas que utilizan anticuerpos para la detección de PTM ya que, las modificaciones pueden escapar a la detección de anticuerpos que no están diseñados específicamente para reconocerlas (66).

Dentro de las ventajas del uso de MS se puede mencionar que es una técnica capaz de monitorear simultáneamente múltiples PTM en experimentos únicos. También es posible realizar una cuantificación relativa precisa de los cambios globales de las histonas PTM. Es una técnica que presenta alto rendimiento, velocidad, resolución y sensibilidad (67).

Por otro lado, las desventajas que presenta son en base a que se sigue recomendado la validación de los resultados de MS con técnicas basadas en anticuerpos, como ChIP o Western Blot, ya que son estrategias más aceptadas (67).

4.6 Aplicación de técnicas para evidenciar los mecanismos biológicos de *G. lamblia* regulados epigenéticamente

Para poner en evidencia que los mecanismos biológicos de *G. lamblia* están regulados epigenéticamente se pueden utilizar las técnicas ya descritas, las cuales se implementaron en los experimentos que se mencionan a continuación.

Para poder investigar si el proceso de enquistamiento en *G. lamblia* está regulado epigenéticamente, se realizó un estudio que proporciona la posible implicancia de mecanismos dependientes de la acetilación de histonas. A razón de este ensayo, se compararon los niveles de acetilación de histonas en el trofozoíto y en las células enquistadas. Para probar esto, se incubaron parásitos aislados con un anticuerpo anti-acetil lisina después de la fijación química y la permeabilización con detergente. El anticuerpo utilizado tiene la capacidad de reconocer PTM mediante la acetilación de los grupos amina en los residuos de lisina que se encuentran en las histonas (68). Luego, se realizó un análisis de inmunofluorescencia el cual reveló que el marcaje estaba restringido a los núcleos y que se superponía con el DNA teñido con DAPI, como se esperaba para las histonas marcadas. Los dos núcleos se tiñeron de manera similar, lo que indica que la cromatina de ambos núcleos puede modificarse mediante la marca de acetilación. No se

observó reacción cruzada con proteínas acetiladas citosólicas, incluida la tubulina, lo que indica que el anticuerpo reconoce exclusivamente proteínas acetiladas restringidas al núcleo. A continuación, se cuantificó el grado de acetilación de histonas en trofozoítos y células enquistadas mediante citometría de flujo. El análisis mostró que la intensidad de la tinción disminuyó en los trofozoítos en diferenciación, lo que sugiere que los niveles de acetilación de histonas están regulados en el parásito de una manera específica (33).

Se obtuvo otra forma para determinar la asociación entre diferentes modificaciones de histonas y genes específicos relacionados con los procesos de diferenciación en *G. lamblia*. Se utilizaron ensayos de ChIP seguidos de amplificación y cuantificación por RT-qPCR para analizar el gen CWP2 en diferentes condiciones de cultivo, con y sin inhibidores de HDAC (TSA y Nt). Los resultados mostraron que la inhibición de las HDAC afecta el proceso de enquistamiento y la expresión de genes específicos relacionados con el enquistamiento. Además, se observaron cambios en los patrones de lisina acetilada durante el enquistamiento, lo que indica que la primera etapa del proceso está regulada, al menos en parte, por la actividad de las HDAC dependientes e independientes de NAD⁺. Se llevaron a cabo experimentos adicionales replicando los cambios observados en los patrones de lisina acetilada durante el enquistamiento. En esta ocasión, se introdujeron inhibidores después de 4 horas desde el inicio del enquistamiento. Como resultado de estos experimentos, se observó la formación de quistes maduros y la expresión de CWP. Estos resultados sugieren que la primera etapa del enquistamiento de *G. lamblia* está regulada en parte por la actividad de las HDAC dependientes e independientes de NAD⁺ (29,33).

Como se mencionó anteriormente, *G. lamblia* tiene la característica de poseer al menos 200 VSP codificadas en su genoma, de las cuales se expresa tan solo uno en su superficie en un momento dado. La remodelación de la cromatina podría estar implicada en la regulación de la transcripción de las VSP. Para determinar si la activación del gen VSP está asociada con la acetilación de histonas, se utilizó un ensayo de ChIP con anticuerpos específicos para las lisinas acetiladas, seguido de la amplificación del DNA mediante PCR con cebadores específicos del gen. Los resultados mostraron que la activación de la transcripción del gen *vsph7* se correlaciona con la acetilación de las histonas en los nucleosomas ubicados *upstream* del gen. Esto sugiere una relación entre la acetilación de histonas y la regulación de la expresión génica en *G. lamblia* (69).

A fin de identificar la enzima responsable del metabolismo de ABZ y su papel en la resistencia a ABZ en *G. lamblia*, primero se determinó que el cofactor hemo que contiene hierro induce niveles más altos de expresión de mRNA de gFIHb en los trofozoítos de *G. lamblia* (55).

Con el objetivo de poner en evidencia la resistencia a los nitro fármacos en *G. lamblia* se cultivaron las cepas de MTZ y NTZ y se compararon con sus correspondientes tipos salvajes mediante análisis de espectrometría de masas de sus proteomas. Por consiguiente se concluye que todas las cepas resistentes experimentaron variación antigénica con distintos antígenos de superficie, como VSP o proteínas ricas en Cys, según la cepa y el compuesto nitro, es decir, que no hubo patrones comunes entre las cepas y los fármacos (70).

En cuanto a la investigación de los mecanismos epigenéticos involucrados en la MTZR, se realizaron estudios en los que se utilizó Western Blot para evaluar la acetilación, metilación, ubiquitinación y fosforilación de proteínas en tres tipos genéticos diferentes y líneas isotópicas relacionadas con la MTZR. También se utilizaron inhibidores químicos como TSA para explorar más a fondo las PTM. Con este estudio se logró comprobar que las modificaciones epigenéticas y la expresión diferencial de proteínas están asociadas con los fenotipos de MTZR en *G. lamblia* (70).

De esta manera, afirmamos que estas técnicas ayudan a comprender los mecanismos subyacentes de la regulación génica y proporcionan información valiosa sobre cómo los cambios epigenéticos pueden influir durante el enquistamiento, variación antigénica y resistencia a diferentes fármacos.

CAPÍTULO V: CONCLUSIÓN

El propósito de este trabajo fue elucidar los mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la expresión génica y la plasticidad genotípica de *G. lamblia*, además de describir las técnicas de laboratorio para su estudio. Se demostró que el enquistamiento es un proceso complejo que involucra cambios en la expresión génica, señalización celular y regulación transcripcional. Se ha observado que la acetilación de histonas de *G. lamblia* disminuye durante el enquistamiento y que la inhibición de HDAC reduce la formación de quistes al bloquear la expresión de genes específicos de este proceso. La alta carga parasitaria dentro del hospedero también juega su rol al limitar la disponibilidad de nutrientes, pH y enzimas necesarias durante el enquistamiento, activando sirtuinas que desempeñan un papel crucial en la fase inicial del proceso. La regulación transcripcional del enquistamiento se relacionó con factores de transcripción como GARP *glp1* y *Myb2*, junto con cambios en la expresión de proteínas reguladoras de la cromatina. Conjuntamente, la señalización celular también desempeña un papel fundamental, involucrando quinasas y fosfatasa como interruptores moleculares.

La variación antigénica en este parásito implica la expresión de VSP en su superficie, regulada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, y por interferencia de RNA. En cuanto a la resistencia a antiparasitarios, se concluye que representa un problema creciente que afecta tanto la eficacia del tratamiento como la salud pública. Se observó resistencia a medicamentos como ABZ y MTZ, identificando los mecanismos moleculares responsables de dicha resistencia, como cambios en proteínas de unión a RNA y enzimas de biotransformación.

En relación a las técnicas de laboratorio para evaluar los mecanismos epigenéticos, desempeñan un papel fundamental en la comprensión de cómo estos mecanismos influyen en la expresión génica y el desarrollo de enfermedades. Sin embargo, *G. lamblia* representa un campo de estudio relativamente nuevo y desafiante. A medida que avance la tecnología y se desarrolle una comprensión más profunda de la epigenética en este parásito, se logrará una mejor comprensión de su biología y se podrán desarrollar enfoques terapéuticos más específicos.

CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA

1. Buret AG, Cacciò SM, Favennec L, Svärd S. Update on Giardia: Highlights from the seventh International Giardia and Cryptosporidium Conference. *Parasite*. 2020 Aug 7;27(49).
2. Fink MY, Singer SM. The Intersection of Immune Responses, Microbiota, and Pathogenesis in Giardiasis. *Trends Parasitol*. 2017 Nov;33(11):901–13.
3. Savioli L, Smith H, Thompson A. Giardia and Cryptosporidium join the “Neglected Diseases Initiative.” *Trends Parasitol*. 2006 May;22(5):203–8.
4. Bolaños-Meade J, Vogelsang GB. Chronic graft-versus-host disease. *Curr Pharm Des*. 2008;14(20):1974–86.
5. Ryan U, Hijjawi N, Feng Y, Xiao L. Giardia: an under-reported foodborne parasite. *Int J Parasitol*. 2019 Jan 1;49(1):1–11.
6. Leung AKC, Leung AAM, Wong AHC, Sergi CM, Kam JKM. Giardiasis: an overview. *Recent Patentes in Inflammation and Allergy Drug Discovery*. 2019;13(2):134–43.
7. Cernikova L, Faso C, Hehl AB. Five facts about Giardia lamblia. *PLoS Pathog*. 2018 Sep 27;14(9).
8. García R, Ayala PA, Perdomo SP. Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Rev Cienc Salud*. 2012 Feb;10(1):59–71.
9. Rivero MR, Feliziani C, De Angelo C, Tiranti K, Salomon OD, Touz MC. Giardia spp., the most ubiquitous protozoan parasite in Argentina: human, animal and environmental surveys reported in the last 40 years. *Parasitol Res*. 2020 Oct;119(10):3181–201.
10. Ryan U, Cacciò SM. Zoonotic potential of Giardia. *Int J Parasitol*. 2013 Nov;43(12–13):943–56.
11. Lujan HD. Giardia y giardiasis [Giardia and giardiasis]. *Medicina (B Aires)*. 2006;66(1):70–4.
12. Benchimol M, Gadelha AP, de Souza W. Unusual Cell Structures and Organelles in Giardia intestinalis and Trichomonas vaginalis Are Potential Drug Targets. *Microorganisms*. 2022 Nov 2;10(11).

13. Agostina S, Rópolo AS. MODIFICACIONES DE LA CROMATINA Y SU RELACIÓN CON EL CICLO DE VIDA DEL PROTOZOARIO GIARDIA LAMBLIA [Tesis Doctoral]. [Córdoba, Argentina]: INIMEC-CONICET-UNC; 2020.
14. Fundacion iO. Parasito Giardia Intestinalis [Internet]. 2023 [cited 2023 Aug 23]. Disponible en: <https://fundacionio.com/salud-io/enfermedades/parasitos/giardia-intestinalis/>
15. Rivera M, De la Parte MA, Urtado P, Magaldi L, Collazo M. Giardiasis Intestinal. Mini-*Revisión*. *Invest clín*. 2002 Jun;43(2):119–28.
16. Lagunas-Rangel FA, Yee J, Bermúdez-Cruz RM. An update on cell division of *Giardia duodenalis* trophozoites. *Microbiol Res*. 2021 Sep;250.
17. Hagen KD, McNally SG, Hilton ND, Dawson SC. Microtubule organelles in *Giardia*. In: *Advances in Parasitology*. California, United States; 2020. p. 25–96.
18. Lagunas-Rangel FA, Bermúdez-Cruz RM. Epigenetics in the early divergent eukaryotic *Giardia duodenalis*: An update. *Biochimie*. 2019 Jan;156:123–8.
19. Bernander R, Palm JE, Svärd SG. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell Microbiol*. 2001 Jan 3;3(1):55–62.
20. Mansisidor AR, Risca VI. Chromatin accessibility: methods, mechanisms, and biological insights. *Nucleus*. 2022 Dec;13(1):236–76.
21. Universidad de Guanajuato. NODO UNIVERSITARIO. 2021 [cited 2023 Oct 22]. Replicación del ADN II. Disponible en: <https://blogs.ugto.mx/rea/clase-digital-3-replicacion-del-adn-ii/>
22. Retureau R, Foloppe N, Elbahnsi A, Oguey C, Hartmann B. A dynamic view of DNA structure within the nucleosome: Biological implications. *J Struct Biol*. 2020 Jul 1;211(1).
23. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):23–38.
24. Meng H, Meng H, Cao Y, Qin J, Song X, Zhang Q, et al. DNA methylation, its mediators and genome integrity. *Int J Biol Sci*. 2015 Apr 8;11(5):604–17.

25. Mattei AL, Bailly N, Meissner A. DNA methylation: a historical perspective. *Trends in Genetics*. 2022 Jul;38(7):676–707.
26. He S, Feng X. DNA methylation dynamics during germline development. *J Integr Plant Biol*. 2022 Dec;64(12):2240–51.
27. Han H. RNA interference to knock down gene expression. In: *Diseases Gene Identification: Methods and Protocols*. 2nd ed. Phoenix, USA: Humana Press In; 2018. p. 293–302.
28. Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA Interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003 Dec;67(4):657–85.
29. Carranza PG, Gargantini PR, Prucca CG, Torri A, Saura A, Svärd S, et al. Specific histone modifications play critical roles in the control of encystation and antigenic variation in the early-branching eukaryote *Giardia lamblia*. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016 Dec;81:32–43.
30. Hatakeyama A, Hartmann B, Travers A, Nogues C, Buckle M. High-resolution biophysical analysis of the dynamics of nucleosome formation. *Sci Rep*. 2016 Jun 6;6.
31. Salusso A, Zlocowski N, Mayol GF, Zamponi N, Rópolo AS. Histone methyltransferase 1 regulates the encystation process in the parasite *Giardia lamblia*. *FEBS Journal*. 2017 Aug;284(15):2396–409.
32. Gillin FD, Reiner DS, Mccaffery JM. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annual Reviews Microbiology*. 1996;50:679–705.
33. Sonda S, Morf L, Bottova I, Baetschmann H, Rehrauer H, Caflisch A, et al. Epigenetic mechanisms regulate stage differentiation in the minimized protozoan *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol*. 2010 Apr;76(1):48–67.
34. Cavagnari BM. Regulation of gene expression: how do epigenetic mechanism work. *Arch Argent Pediatr*. 2012 Apr;110(2):132–6.
35. Bittencourt-Silvestre J, Lemgruber L, De Souza W. Encystation process of *Giardia lamblia*: morphological and regulatory aspects. *Arch Microbiol*. 2010 Apr;192(4):259–65.

36. Lauwaet T, Davids BJ, Reiner DS, Gillin FD. Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Curr Opin Microbiol*. 2007 Dec;10(6):554–9.
37. Rojas-López L, Krakovka S, Einarsson E, Ribacke U, Xu F, Jerlström-Hultqvist J, et al. A detailed gene expression map of giardia encystation. *Genes (Basel)*. 2021 Nov 30;12(12).
38. Thomas EB, Sutanto R, Johnson RS, Shih HW, Alas GCM, Krtková J, et al. Staging Encystation Progression in *Giardia lamblia* Using Encystation-Specific Vesicle Morphology and Associating Molecular Markers. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Apr 27;9.
39. Balan B, Emery-Corbin SJ, Sandow JJ, Ansell BRE, Tichkule S, Webb AI, et al. Multimodal regulation of encystation in *Giardia duodenalis* revealed by deep proteomics. *Int J Parasitol*. 2021 Sep;51(10):809–24.
40. Ji Z, Liu GH, Qu J. Mitochondrial sirtuins, metabolism, and aging. *Journal of Genetics and Genomics*. 2022 Apr;49(4):287–98.
41. Prucca CG, Slavin I, Quiroga R, Elías EV, Rivero FD, Saura A, et al. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*. 2008 Dec 11;456(7223):750–4.
42. Tenaglia AH, Luján LA, Ríos DN, Molina CR, Midlej V, Iribarren PA, et al. Antibodies to variable surface antigens induce antigenic variation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Nat Commun*. 2023 May 3;14(1).
43. Rodríguez-Walker M, Molina CR, Luján LA, Saura A, Jerlström-Hultqvist J, Svärd SG, et al. Comprehensive characterization of Cysteine-rich protein-coding genes of *Giardia lamblia* and their role during antigenic variation. *Genomics*. 2022 Sep;114(5).
44. Gargantini PR, Serradell MDC, Ríos DN, Tenaglia AH, Luján HD. Antigenic variation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Curr Opin Microbiol*. 2016 Aug;32:52–8.
45. Tenaglia AH. Mecanismos moleculares involucrados en la señalización y recambio de las proteínas variables de superficie durante el proceso de variación antigénica en el parásito intestinal *Giardia lamblia* [Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas]. [Córdoba, Argentina]: CIDIE-UCC/CONICET; 2021.

46. Mørch K, Hanevik K. Giardiasis treatment: an update with a focus on refractory disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2020 Oct 1;33(5):355–64.
47. Riches A, Hart CJS, Trenholme KR, Skinner-Adams TS. Anti- Giardia Drug Discovery: Current Status and Gut Feelings. *J Med Chem.* 2020 Nov 25;63(22):13330–54.
48. Gardner TB, Hill DR. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Jan;14(1):114–28.
49. Loderstädt U, Frickmann H. Antimicrobial resistance of the enteric protozoon *Giardia duodenalis* - A narrative review. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2021 Jul 1;11(2):29–43.
50. Ansell BRE, McConville MJ, Ma'ayeh SY, Dagley MJ, Gasser RB, Svärd SG, et al. Drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Biotechnol Adv.* 2015 Nov;33(6):888–901.
51. Emery-Corbin SJ, Su Q, Tichkule S, Baker L, Lacey E, Jex AR. In vitro selection of *Giardia duodenalis* for Albendazole resistance identifies a β -tubulin mutation at amino acid E198K. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2021 Aug;16:162–73.
52. Argüello-García R, Cruz-Soto M, Romero-Montoya L, Ortega-Pierres G. In vitro resistance to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in *Giardia duodenalis*: Variability and variation in gene expression. *Infection, Genetics and Evolution.* 2009 Dec;9(6):1057–64.
53. Lopes-Oliveira LAP, Fantinatti M, Da-Cruz AM. In vitro-induction of metronidazole-resistant *Giardia duodenalis* is not associated with nucleotide alterations in the genes involved in pro-drug activation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2020 Nov 2;115(10):1–4.
54. Dingsdag SA, Hunter N. Metronidazole: An update on metabolism, structure-cytotoxicity and resistance mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2018 Feb 1;73(2):265–79.
55. Pech-Santiago EO, Argüello-García R, Vázquez C, Saavedra E, González-Hernández I, Jung-Cook H, et al. *Giardia duodenalis*: Flavohemoglobin is involved in drug biotransformation and resistance to albendazole. *PLoS Pathog.* 2022 Sep 27;18(9).
56. Su Q, Baker L, Emery S, Balan B, Ansell B, Tichkule S, et al. Transcriptomic analysis of albendazole resistance in human diarrheal parasite *Giardia duodenalis*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2023 Aug;22:9–19.

57. Das PM, Ramachandran K, VanWert J, Singal R. Chromatin immunoprecipitation assay. *BioTechniques* . 2004 Dec;37(6):961–9.
58. Kim J, Park EA, Shin MY, Park SJ. Identification of target genes regulated by encystation-induced transcription factor Myb2 using knockout mutagenesis in *Giardia lamblia*. *Parasit Vectors*. 2022 Oct 7;15(1).
59. Meftahi GH, Bahari Z, Zarei Mahmoudabadi A, Iman M, Jangravi Z. Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2021 Jul;49(4):509–17.
60. Pillai-Kastoori L, Schutz-Geschwender AR, Harford JA. A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Anal Biochem*. 2020 Mar 15;593.
61. Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*. 2010 Apr;50(4):227–30.
62. National Collaborating Centre for Infectious Diseases [Internet]. 2021 [cited 2023 Oct 22]. Understanding RT-PCR tests and results. Disponible en: https://nccid.ca/wp-content/uploads/sites/2/2021/02/RT-PCR-Guidence_ENG.pdf
63. Graczyk TK, Grimes BH, Knight R, Da Silva AJ, Pieniazek NJ, Veal DA. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent in situ hybridization and a monoclonal antibody. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003 Feb;68(2):228–32.
64. Petazzi RA, Aji AK, Chiantia S. Fluorescence microscopy methods for the study of protein oligomerization. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Postdam, Germany: Elsevier B.V.; 2020. p. 1–41.
65. Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb Protoc*. 2014 Oct 1;2014(10):1042–65.
66. Önder Ö, Sidoli S, Carroll M, Garcia BA. Progress in epigenetic histone modification analysis by mass spectrometry for clinical investigations. *Expert Rev Proteomics*. 2015 Sep 3;12(5):499–517.

67. Buchberger AR, DeLaney K, Johnson J, Li L. Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights. *Anal Chem.* 2018 Jan 2;90(1):240–65.
68. Guan KL, Yu W, Lin Y, Xiong Y, Zhao S. Generation of acetyllysine antibodies and affinity enrichment of acetylated peptides. *Nat Protoc.* 2010 Sep;5(9):1583–95.
69. Kulakova L, Singer SM, Conrad J, Nash TE. Epigenetic mechanisms are involved in the control of *Giardia lamblia* antigenic variation. *Mol Microbiol.* 2006 Sep;61(6):1533–42.
70. Müller J, Braga S, Heller M, Müller N. Resistance formation to nitro drugs in *Giardia lamblia*: No common markers identified by comparative proteomics. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2019 Apr;9:112–9.

Anexo I

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CÁTEDRA TRABAJO FINAL
NOTA DE ACEPTACIÓN DEL DIRECTOR Y CODIRECTOR¹

Córdoba, 27 de Octubre de 2023.

Prof. Titular Trabajo Final
Dr. Juan Carlos Nicolás
S-----//-----D

De mi consideración:

Por la presente dejo constancia de mi aceptación como DIRECTOR/CODIRECTOR DE TRABAJO FINAL de la Carrera de Bioquímica, de los/as alumnos/as, GALARZA, ROCIO DNI N° 42131226 y ROBERTO RINALDI, JULIETA DNI N° 41656924, sobre el Trabajo Final cuyo título es MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE REGULACIÓN GÉNICA EN EL PARÁSITO PROTOZOARIO GIARDIA LAMBLIA.



Firma director

Luciano Díaz Pérez

Aclaración director



Firma Co-director

Jerónimo Laiolo

Aclaración Co-director

¹ en caso de tener el alumno Director y Codirector, ambos firmarán el mismo ejemplar