**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

# Prevalencia y potencial zoonótico de *Giardia intestinalis* en perros del centro de México

TESIS

Que como parte de los requerimientos para obtener el Grado de

Doctora en Ciencias Biológicas

Presenta

M en SPAS. Elsa María Godínez Galaz

Dirigido por:

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón
Presidente

Dr. Feliciano Milián Suazo
Secretario

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez
Vocal

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú
Suplente

Dr. Carlos Agustín Vega y Murguía
Suplente

Campus Juriquilla, Santiago de Querétaro, Qro.

Octubre, 2019

Dirección General de Bibliotecas UAQ

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

**La presente obra está bajo la licencia:**
**https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es**

# CC BY-NC-ND 4.0 DEED

## Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:

**Atribución** — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

**SinDerivadas** — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad, o derechos morales pueden limitar la forma en que utilice el material.

RESUMEN

*Giardia intestinalis* es un protozoario de distribución mundial, capaz de infectar gran número de especies, incluidos humanos y animales domésticos. Posee ocho grupos genéticos o ensamblajes, morfológicamente iguales, pero genéticamente diferentes, siendo A y B los considerados zoonóticos. Los perros pueden representar un riesgo en la salud pública debido a la infección cruzada por ensamblajes zoonóticos, sin embargo, no se cuenta información sobre su prevalencia y frecuencia de dichos ensamblajes en perros del centro de México, por lo que el objetivo de este trabajo es conocer esta información. Para lo que se colectaron 402 muestras de heces de perros procedentes de distintas poblaciones, se diagnosticaron por examen coproparasitoscópico de flotación, obteniendo una prevalencia del 25%. Se concentraron los quistes de 28 muestras y se les extrajo DNA, por último, se amplificó por PCR el gen *β-Giardin* en 24 de ellas y se diferenciaron ensamblajes por medio de RFLP con las enzimas *Hae III* y *Hha I*. El único ensamblaje presente fue el A, detectado en el 100% de las muestras, siendo el 83% AI y el 17% AII. Por lo tanto, los perros en el centro de México representan un riesgo en la transmisión zoonótica de este parásito, acentuando la importancia de controlar esta enfermedad en dicha especie.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ABSTRACT

*Giardia intestinalis* is a protozoan of worldwide distribution capable of infecting a large number of species, including humans and domestic animals. Dogs represent a risk to public health due to cross-infections by the zoonotic assemblages. However, there is no information concerning the prevalence and frequency of this parasite and its assemblages in dogs of the Central Region of Mexico, so this study aims to reveal this information. A total of 402 feces samples from dogs of different settings (shelter, breeding establishments, domestic and stray) were obtained and direct coproparasitoscopic examination by flotation revealed a prevalence of 25%. PCR was performed for amplification of the *β-Giardin* gene, to which 24 samples were positive. Assemblages were obtained through RFLP analysis, using enzymes *Hae III* and *Hha I*. All of the 24 samples were genotyped as assemblage A, with 83% as AI and 17% as AII. Thus, these findings confirm that dogs in the central region of Mexico are a risk for zoonotic transmission of this parasite, emphasizing the importance of a much needed control of the disease in this species.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi universidad, la Universidad Autónoma de Querétaro, el haberme abierto nuevamente sus puertas, para completar mi formación profesional. Así como a los profesores y personal administrativo, sin los cuales mi desarrollo dentro del programa no hubiera sido el mismo.

Agradezco al Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica, especialmente al Dr. Carpio, quién me abrió las puertas de su laboratorio e hizo posible la trasmisión de conocimientos necesarios para los fines de esta investigación, así como al Mtro. Aarón Rodríguez del Instituto Nacional de Pediatría, su colaboración fue primordial en el desarrollo del proyecto.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por haberme beneficiado por medio de su programa de becas doctorales, para poder seguir con mi formación a este nivel.

De igual manera, extiendo mi agradecimiento a los doctores que fueron parte de mi comité tutoral, quienes me acompañaron y dirigieron a lo largo de estos cuatro años, agradezco el tiempo y dedicación que cada uno puso en este proyecto. En especial agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón, quien estuvo conmigo en este camino, no solo en lo académico, sino en todas las adversidades y alegrías que conllevan esta formación; gracias a la Dra. Andrea Olvera, por su gran apoyo y orientación.

Gracias a aquellas instituciones que nos abrieron sus puertas para la recolección de muestras, así como a los propietarios que nos hicieron favor de donar las muestras de sus mascotas, sin su colaboración este proyecto no hubiera tenido el alcance esperado.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico a mi familia, especialmente a mi madre Sara Galaz, que siempre ha estado a mi lado apoyándome en todo lo ha podido, y a mi esposo Erick Castañon quien ha sido parte de desvelos, estrés, trabajo.

Sin embargo este proyecto se lo dedico a mi hija Yaretzi, empezaste conmigo este difícil proyecto sin siquiera poder decidirlo, fuiste y seguirás siendo mi motor para no desistir, tú me has dado la fuerza para seguir adelante, por ti me levanté cuando ya no quería seguir haciéndolo.

Agradezco a mis amigas y compañeras de laboratorio, Nerina, Dulce, Claudia, Dioseline, con quienes compartí alegrías, bailes, decepciones y tristezas. A mis amigos dentro y fuera de la escuela. Gracias por compartir este proceso conmigo.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE


| | Página |
|---|---|
| Resumen | i |
| Abstract | ii |
| Agradecimientos | iii |
| Dedicatorias | iv |
| Índice | v |
| Índice de Cuadros | vii |
| Índice de Figuras | viii |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTEDECENTES | 3 |
| 2.1. *Giardia intestinalis* | 3 |
| 2.1.1. Historia | 3 |
| 2.1.2. Generalidades | 4 |
| 2.1.3. Diversidad Genética | 6 |
| 2.1.4. Ciclo de Vida | 9 |
| 2.1.5. Epidemiología | 13 |
| 2.1.5.1. Prevalencia en Humanos | 13 |
| 2.1.5.2. Prevalencia y Potencial Zoonótico en Perros | 14 |
| 2.1.5.3. Potencial Zoonótico en Diferentes Especies Domésticas | 16 |
| 2.1.6. Patogenia | 17 |
| 2.1.6.1. Diferencias Moleculares de los Ensamblajes zoonóticos Asociadas a la Patogenia | 19 |
| 2.1.7. Respuesta del Sistema Inmune | 20 |




Dirección General de Bibliotecas UAQ

2.1.8. Signos Clínicos 25

2.1.9. Diagnóstico 25

2.1.9.1. Técnicas Coproparasitoscópicas 26

2.1.9.2. Detección de Antígeno en Heces 27

2.1.9.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa y Diferenciación de Ensamblajes 27

2.1.10. Tratamiento 29

2.1.10.1. Tratamiento Alópata 29

2.1.10.2. Tratamientos Alternativos 30

III. HIPÓTESIS 32

IV. OBJETIVOS 33

4.1. Objetivo General 33

4.2. Objetivos Específicos 33

V. METODOLOGÍA 34

5.1. Lugar de Estudio 34

5.2. Diseño experimental y Toma de muestras 34

5.3. Diagnóstico Coproparasitoscópico 35

5.4. Extracción de DNA 35

5.5. Amplificación del Gen *β-Giardin* 36

5.6. Diferenciación de Ensamblajes 37

5.7. Secuenciación 38

5.8. Análisis Estadístico 38

Dirección General de Bibliotecas UAQ

VI. RESULTADOS 40

VII. DISCUSIÓN 44

VIII. CONCLUSIÓN 47

IX. REFERENCIAS 48

X. ANEXOS 66

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE CUADROS


| | | Página |
|---|---|---|
| 1 | Distribución de las muestras y análisis estadístico de determinación de factores de riesgo (edad, consistencia de heces y género). | 40 |
| 2 | Análisis estadístico de determinación de factores de riesgo con base en la población de procedencia de los animales muestreados. | 41 |


Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE FIGURAS


| | | Página |
|---|---|---|
| 1 | Microscopia electrónica de barrido de un trofozoito de *G. intestinalis*, donde se puede observar las siguientes estructuras: flagelos anteriores (A), flagelos ventrales (V), flagelos postero-laterales (PL), flagelos caudales (C) y disco ventral (VD). | 5 |
| 2 | Ciclo de vida de *Giardia intestinalis* | 6 |
| 3 | Miscroscopía electrónica de barrido de un quiste de *G. intestinalis.* | 8 |
| 4 | Relación filogenética de *Giardia* spp., huéspedes afectados y los posibles ciclos de infección. | 9 |
| 5 | Patrón de corte de ensamblaje A y subensamblaje AI. En A4 y A5 se muestra el patrón de corte correspondiente al ensamblaje A (200, 150 y 130pb. En A1, A2 y A3 se observa el patrón de corte correspondiente al subensamblaje AI (190, 100 y 70 pb). | 42 |
| 6 | Digestión enzimática de los segmentos de 384 pb amplificada en muestras provenientes de perros. En 1, 3-6, 9-18 se muestra el patrón de bandeo correspondiente al subensamblaje AI (190, 100 y 70 pb), mientras que 2, 7 y 8 se observa el patrón esperado correspondiente al subensamblaje AII (210 y 70 pb). | 43 |


Dirección General de Bibliotecas UAQ

# I. INTRODUCCIÓN

*Giardia intestinalis* (*Giardia duodenalis* o *Giardia lamblia*) es un protozoo flagelado distribuido en todo el mundo, causante de enfermedad gastrointestinal en diferentes especies, incluida el humano, animales de granja y domésticos (Scorza and Lappin, 2004; Abe et al., 2005; Thompson, 2008). Este parásito para poder sobrevivir e infectar otros huéspedes produce quistes, excretados en heces, iniciando la infección al ser ingeridos por otro hospedador. El medio ácido del estómago y las sales biliares del intestino delgado, inducen la liberación de los trofozoitos contenidos en los quistes, adhiriéndose a la mucosa del intestino delgado, colonizándolo y multiplicándose por fisión binaria asexual; a su paso por el intestino, debido a cambios en el pH y enzimas digestivas, se vuelven a enquistar, pasando a heces y siendo infectivos nuevamente. La transmisión es oro-fecal y los quistes son capaces de sobrevivir en el ambiente, de uno a dos meses en agua (OPS, 2003; Traub et al., 2005; Escobedo et al., 2007).

En humanos, los grupos con mayor susceptibilidad son los niños, mujeres embarazadas y personas con enfermedades inmunosupresoras; se calcula que en países en desarrollo alrededor de 200 millones de personas presentan giardiasis cada año, de los cuales 58 millones son niños (Thompson, 2008). Posee ocho grupos genéticos o ensamblajes (A-H), distribuidos en diferentes especies, morfológicamente iguales pero genéticamente diferentes, por lo que su diferenciación es por medios moleculares basados en reacción en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en conjunto con técnicas enzimáticas de digestión (RFLP) y secuenciación (Abe et al., 2005; Souza et al., 2007; Feng and Xiao, 2011).

En México, la frecuencia de esta parasitosis es del 19% en humanos, presentándose principalmente en niños en edad preescolar y escolar (Vázquez-Tsuji and Campos-Rivera, 2009). En perros, la prevalencia mundial estimada es del 15.2% (Bouzid et al., 2015), mientras que en México es mayor del 42% (Ponce-Macotela et al., 2005) y los principales ensamblajes reportados en humanos y en



Dirección General de Bibliotecas UAQ

perros son AI y AII (Cedillo-Rivera et al., 2003; Eligio-García et al., 2008). Lo que ocasiona que la transmisión zoonótica en México sea un problema real de salud pública, principalmente asociado a factores socio culturales y condiciones sanitarias (Eligio-García et al., 2005). Sin embargo, Feng y Xiao (2011) mencionan que los ensamblajes predominantes son los propios de la especie son C y D. No obstante, existen reportes en España y China de humanos infectados con el ensamblaje C, considerado específico de perros, lo que acentúa el rol de los perros en la transmisión de esta parasitosis a humanos (Liu et al., 2014; Štrkolcová et al., 2015). Por lo que, los perros representan un riesgo para la salud pública, debido a una alta prevalencia de ensamblajes zoonóticos (Ponce-Macotela et al., 2005; Eligio-García et al., 2008; Dado et al., 2012). No obstante, no existe información en el centro de México sobre las prevalencias de este parásito, así como en las diferentes poblaciones en las que podemos encontrar o convivir con caninos. Por lo tanto, se planteó este trabajo con el objetivo de conocer la prevalencia de la enfermedad y la frecuencia con que se presentan los ensamblajes zoonóticos y así determinar el riesgo para la población humana por la transmisión cruzada.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

# II. ANTECEDENTES

## *2.1. Giardia intestinalis*

### 2.1.1. Historia

Descrito por primera vez por Antony van Leeuwenhoek en 1681,quien lo descubrió al observar una muestra de sus heces diarreicas, relatando su descripción en una carta, donde mencionó la observación de “animalitos” que se movían, del tamaño de glóbulos rojos y provistos de pequeñas “patitas”. El siguiente investigador en describir este parásito fue Vilem Dusan Lambl en 1859, quien lo nombró *Cercomonas intestinalis*, en 1888 Raphael Anatole Émile Blanchard lo llamó *Lamblia intestinalis*. Fue hasta 1902 cuando el parasitólogo Charles Wardell empezó a sospechar que este parásito podía estar relacionado con enfermedades diarreicas (Cox, 2002). Posteriormente, durante la primer guerra mundial se observó que varios soldados presentaban diarreas, al analizar las heces encontraron *Giardia* como uno de los agentes causales y que al administrar heces de estos pacientes a animales de laboratorio, estos también presentaban diarrea (Fantham and Porter, 1916).

En 1915 Charles Wardell Stiles nombró a este parásito *Giardia lamblia,* como reconocimiento a los trabajos realizados por el profesor A. Giard en París y el Dr. Lambl en Praga, nombre con el que hasta la fecha es conocido. Por su parte, Dobell en 1921 sugirió que se trataba de un agente patógeno y en 1932 concluyó que la descripción realizada por Leeuwenhoek correspondía a la forma vegetativa del parásito, conocida como trofozoito (Cox, 2002; Ford, 2005). En 1926 en Londres el médico Reginald Miller demostró que de los niños infectados con este protozoario, algunos presentaban malabsorción mientras que otros eran portadores asintomáticos (Miller, 1926). En 1952 los aislados de *Giardia* provenientes de un gran número de mamíferos fueron agrupados por Filice como una misma especie, debido a que su morfología era muy similar, demominándola *Giardia duodenalis*.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

A finales de los 70's, varios investigadores asociaron la homosexualidad como un factor de riesgo alto para presentar la enfermedad (Meyers et al., 1977; Schmerin et al., 1978). Sin embargo, a pesar de ser descrito por primera vez en 1681, fue más de 300 años después que la patogenicidad en humanos se estableció formalmente al cumplirse los postulados de Koch en el estudio realizado por Nash et al., en 1987.

### 2.1.2. Generalidades.

*Giardia intestinalis* (*Giardia duodenalis* o *Giardia lamblia*) es un protozoo flagelado perteneciente a la clase Zoomastigophorea y al orden Diplomonadida, presenta una distribución mundial, siendo el protozoario mayormente involucrado con enfermedad gastrointestinal en un gran número de especies, incluida el humano, animales de granja y domésticos (Scorza and Lappin, 2004; Abe et al., 2005; Thompson, 2008).

Este parásito presenta dos estadios, el vegetativo conocido como trofozoito y la forma infectiva conocida como quiste. Los trofozoitos miden de 12 a 15 µm de largo y de 5 a 9 µm de ancho, poseen dos núcleos (cada uno con el genoma completo), cuatro pares de flagelos responsables de la movilidad, un cuerpo medio y un disco ventral importante en la fusión a la pared intestinal debido a la presencia de proteínas específicas (actinina, miocina, tropomicina y lectinas) (Farthing et al., 1986; Adam, 2001; Yu et al., 2002), el cual se puede observar en la figura 1.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

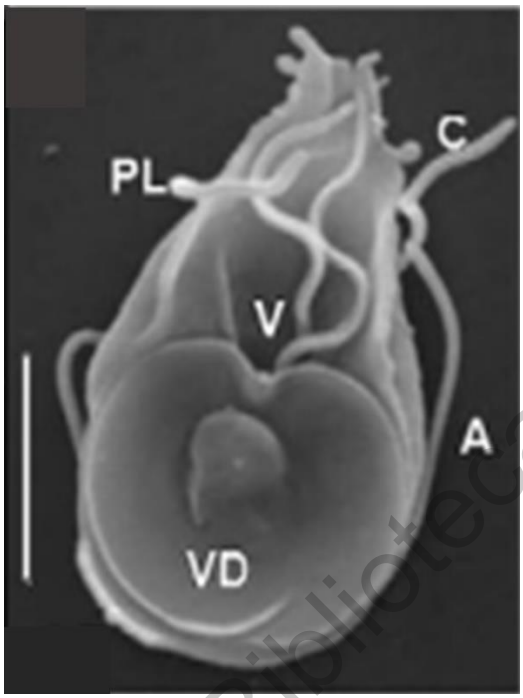


Figura 1. Microscopia electrónica de barrido de un trofozoito de *G. intestinalis*, donde se puede observar las siguientes estructuras: flagelos anteriores (A), flagelos ventrales (V), flagelos postero-laterales (PL), flagelos caudales (C) y disco ventral (VD) (Machado et al., 2011).

El quiste tiene un diámetro de 7 a 10 µm, contiene cuatro núcleos y está cubierto de una membrana de 0.3 a 0.5 µm de grosor, constituida en un 60% de carbohidratos y un 40% de proteínas, compuesta a su vez de una cubierta filamentosa (externa) y una membranosa (interna) (Adam, 2001; Ankarklev et al., 2010). Debido a esta cubierta, los quistes son resistentes a varios desinfectantes y pueden sobrevivir en el ambiente por largos periodos, principalmente en ambientes fríos y húmedos, son susceptibles a la desecación y a la luz solar directa. Los quistes pueden sobrevivir en agua de la llave de dos semanas a dos meses dependiendo de la temperatura, en lagos por un mes, en ríos hasta tres meses y en mares más de dos meses a 4°C. Mientras que en tierra, estiércol y heces humanas, son viables alrededor de 49 días a 4°C, disminuyendo su viabilidad a 7 días si la

Dirección General de Bibliotecas UAQ

temperatura aumenta (25°C) (Ali and Hill, 2003; CFSPH, 2012). En la figura 2 se puede observar una fotografía de dominio público tomada por microscopía electrónica.

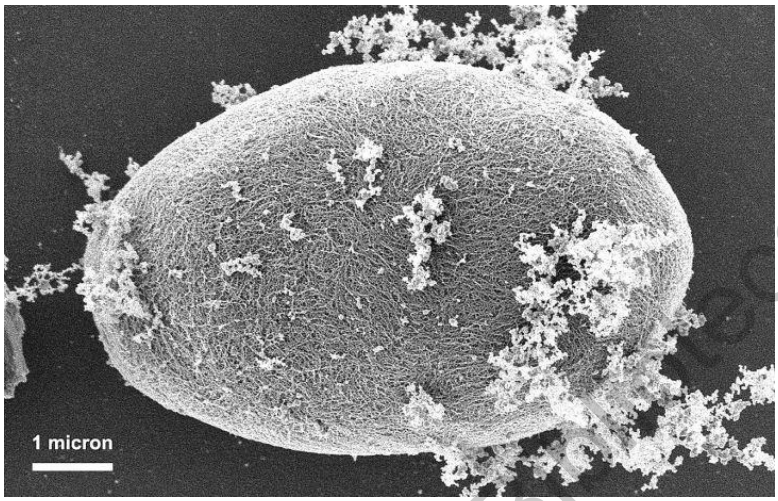


Figura 2. Miscroscopía electrónica de barrido de un quiste de *G. intestinalis.*

Este protozoario ha evolucionado de tal manera que cuenta con dos mecanismos de adaptación para sobrevivir dentro y fuera del intestino del huésped, uno de ellos, como se mencionó en el párrafo anterior, es el enquistamiento, cuya función es darle la capacidad al parásito de sobrevivir fuera del huésped y así garantizar la infección de huéspedes susceptibles. El otro mecanismo evolutivo con el que cuenta este protozoario es la variación antigénica, definida como el cambio continuo de antígenos presentados en la superficie, lo que le ayuda a evadir la respuesta inmune por parte del huésped (Luján et al., 1997; Nash, 2002).

### 2.1.3. Diversidad Genética

Los primeros estudios genéticos detallados de *Giardia* identifican un cierto número de genotipos, los cuales se demostraron mediante análisis de agrupamientos (Meloni et al., 1988; Andrews et al., 1989). El análisis detallado de las cepas en humanos demostró un alto grado de diversidad genética, de los cuales



Dirección General de Bibliotecas UAQ

se formaron dos grandes grupos o ensamblajes, definidos como A y B, cada uno constituido por grupos de genotipos relacionados, separados por distancias genéticas de la magnitud de las que separan a *G. duodenalis* y *G. muris* (Mayrhofer et al., 1995; Ey et al., 1997). Con base en esto es inapropiado referirse a los ensamblajes como genotipos, ya que da una falsa percepción de homogeneidad dentro de los grupos, a pesar de que existen diferencias entre ellos, las cuales pueden ser suficientes para reconocerlos como especies diferentes (Thompson and Monis, 2012).

Con base en análisis de aloenzimas y secuencias de DNA, se ha propuesto una nomenclatura para referirse a los diferentes ensamblajes que se han descrito de este parásito (Monis et al., 1999; Monis et al., 2003), los cuales se muestran en la figura 3.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

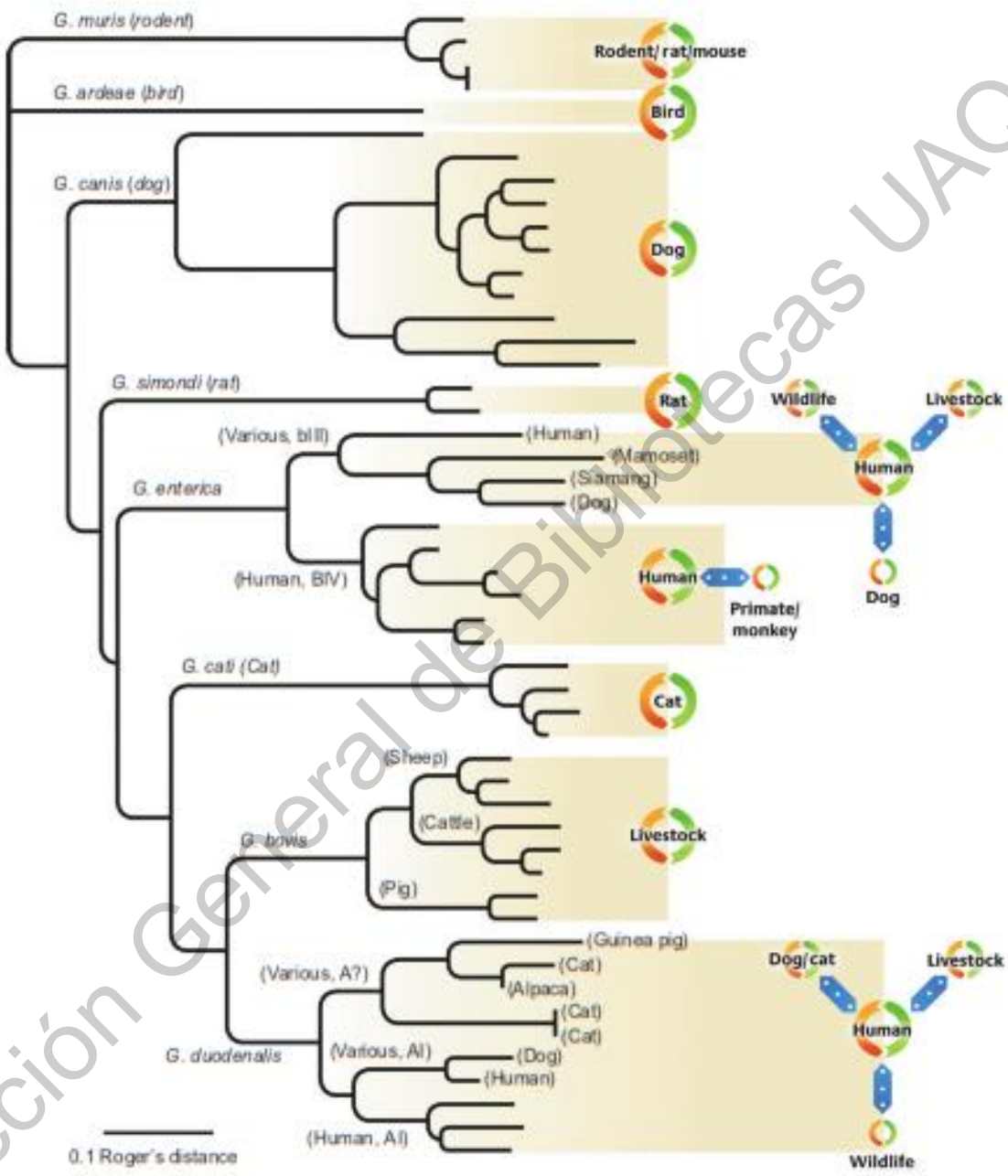


Figura 3. Relación filogenética de *Giardia spp*., huéspedes afectados y posibles ciclos de infección (Thompson and Monis, 2012).

La nomenclatura sugerida por Thompson and Monis en 2012 (figura 3), es nombrar a los ensamblajes zoonóticos como *G. duodenalis* (ensamblaje A) y *G.*



Dirección General de Bibliotecas UAQ

*entérica* (ensamblaje B), y nombrar a los ensamblajes propios de especie acorde a su huésped final (p.e. *G. bovis* al E y *G. cati* al F), sin embargo, no ha sido aceptada para ser utilizada, por lo que hasta el momento está establecido que *G. intestinalis* posee ocho grupos genéticos o ensamblajes (A-H), morfológicamente iguales pero genéticamente diferentes, distribuidos en diferentes especies y solo pueden ser diferenciados por medio de procedimientos basados en reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en conjunto con técnicas enzimáticas (RFLP) de diferentes genes (*gdh*, *tpi*, *β-Giardin*, etc.) y secuenciación (Abe et al., 2005; Souza et al., 2007; Feng and Xiao, 2011). Los diferentes ensamblajes se encuentran distribuidos dentro de las diferentes especies de la siguiente manera: el ensamblaje A puede infectar a humanos, primates no humanos, ganados, caballos, perros, gatos, cerdos, venados, alces y hurones; el B a humanos, primates no humanos, ganado, caballos, perros, coyotes, castores, ratas almizcleras, conejos y borregos; los ensamblajes C y D a perros, gatos, coyotes y lobos; el E a borregos, cabras, vacas, cabras, búfalos y cerdos; el F es propio de gatos, el G de ratas y el H de vertebrados marinos. Por lo tanto los ensamblajes A y B son considerados zoonóticos (Abe et al., 2005; Cacciò and Ryan, 2008; Cacciò and Sprong, 2010).

### 2.1.4. Ciclo de Vida

El parásito produce quistes, excretados en heces, iniciando la infección cuando son ingeridos por otro hospedador, tal como se puede observar en la figura 4. El medio ácido del estómago y sales biliares del intestino delgado, son los responsables de la liberación de los trofozoitos contenidos en los quistes, dichos trofozoitos se acoplan a la mucosa del intestino delgado, colonizándolo y empezando su multiplicación por fisión binaria asexual, durante el paso de los trofozoitos por el intestino, se vuelven a enquistar, probablemente debido a cambios bruscos de pH y la acción de enzimas digestivas, pasando a heces y siendo infectivos nuevamente (Traub et al., 2005; Escobedo et al., 2007).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

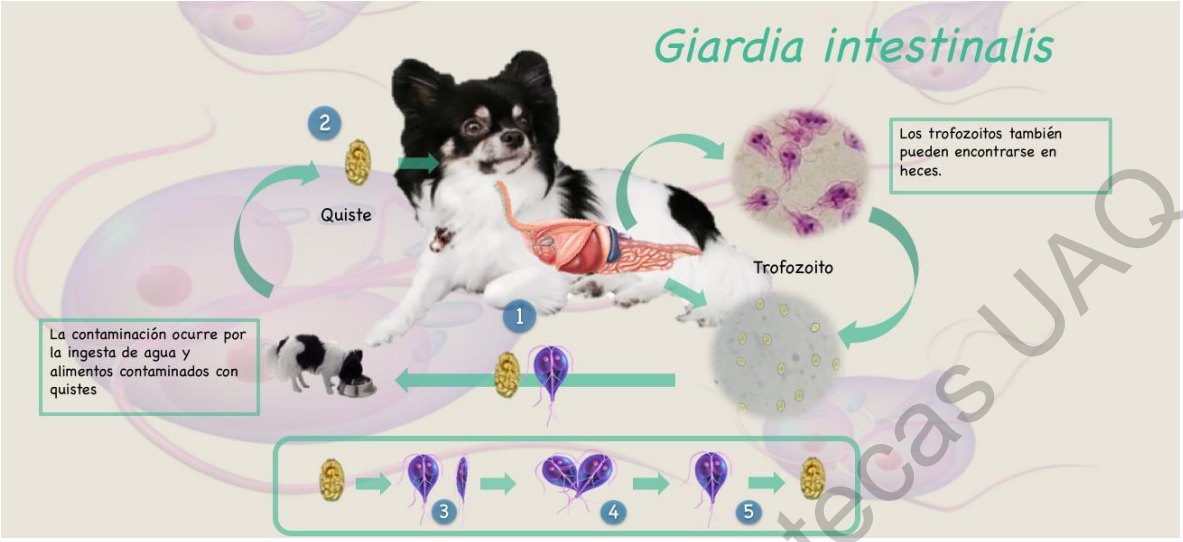


Figura 4. Ciclo de vida de *Giardia intestinalis* (Veyna, 2017).

El quiste maduro contiene cuatro núcleos con una ploidía total de 16N (4 X 4N), esto se debe a que durante la última fase del enquistamiento hay división del núcleo pero no citoquinesis. La citoquinesis ocurre cuando se lleva a cabo el desenquiste, generando dos trofozoitos, cada uno con una ploidía de 8N (2 x 4N), a esto le sigue una división celular completa generando cuatro trofozoitos con una plodía de 4N (2 x 2N) (Bernander et al., 2001). Estos trofozoitos poseen dos núcleos diploides (2 x 2N), los dos núcleos poseen la misma información genética, son transcripcionalmente activos, se dividen al mismo tiempo y son divididos equitativamente durante la citoquinesis (Ghosh et al., 2001; Yu et al., 2002).

A raíz de la investigación de varios autores, ha surgido un debate en relación a como se lleva a cabo la división en *Giardia,* existen propuestas de mecanismos no convencionales de segregación cromosómica, incluyendo el papel de organelos microtubulares no fusiformes en la división celular, tales como el disco ventral y los cuerpos basales (Solari et al., 2003; Benchimol, 2004a), o de la presencia de múltiples planos de división (Ghosh et al., 2001; Yu et al., 2002; Benchimol, 2004b). Sin embargo, Sagolla et al. 2006 con base a marcadores moleculares y análisis tridimensional, ha propuesto que la división es por una mitosis



Dirección General de Bibliotecas UAQ

semi-abierta, debido a la presencia de microtubulos y por tanto de huso. Los autores mencionan que la división inicia con la profase donde se condensa la cromatina, seguido del alineamiento de cromosomas en el centro del huso para posteriormente migrar a los polos, la separación de los polos del huso y la duplicación de otras estructuras celulares antes de que se lleve a cabo la citoquinesis. La mitosis semi-abierta es debido a que los microtúbulos de los dos husos extranucleares penetran el núcleo a través de aberturas en los polos de la envoltura nuclear, interactuando con la cromatina a través de la membrana nuclear. Otra de las observaciones hechas por estos autores fue la presencia de cinetocoro y su participación en la segregación de los cromosomas, también proponen que los cuerpos basales actúan como centrómeros ayudando en este proceso. Por otro lado, Sagolla et al. en 2006 propone que los núcleos migran durante la profase y después ocurre la división de izquierda a derecha a lo largo del eje, posterior a esto, los núcleos permanecen separados y no existe intercambio de información genética, y por último se lleva a cabo la citoquinesis en el eje longitudinal y por tanto perpendicular al eje donde se llevó a cabo la división nuclear, esto se contrapone a las múltiples teorías de división propuestas por Benchimol en 2004a.

Otra de las controversias que se han generado en cuanto a la división de este parásito, es si se da con trofozoitos “libres” o adheridos, Tůmová et al., en 2007 observó que el proceso de división se lleva a cabo en ambas fases, mientras los trofozoitos nada libremente y mientas están adheridos a la mucosa, por otro lado, Benchimol en 2004a en su investigación afirma que la mitosis inicia en células que no están adheridas. En los estudios realizados por Tůmová et al., en 2007 observaron que la mitosis finaliza antes de que termine la primera fase de adhesión del trofozoito, y que esta primera fase de adhesión es de suma importancia ya que es donde se lleva a cabo la reorganización de los flagelos y el desarrollo del disco adhesivo de las células hijas. Por otro lado, al final de la citoquinesis, los trofozoitos “hermanos” se encuentran unidos mientras nadan y cuando se adhieren se separan.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Al no presentar división sexual, se espera que no exista heterocigosidad, sin embargo se presenta en el 0.01% del genoma de *Giardia*, lo cual Poxleitner et al., en 2008 lo atribuye a cariogamia en los quistes y cambio de material genético entre el núcleo. Sin embargo, a pesar de que por mucho tiempo se ha establecido que la división de este parásito es de forma asexual, existen estudios donde se menciona que tiene la capacidad de reproducirse sexualmente y han sido identificados genes involucrados en meiosis, sin embargo, la recombinación es poco frecuente por lo que no provoca un impacto a nivel epidemiológico ni en las características genéticas que afecten en la infección a sus huéspedes (Ramesh et al., 2005; Cooper et al., 2007).

La última fase es el enquistamiento del trofozoito, el tiempo que pasa entre la infección y la eliminación de quistes, es conocida como periodo prepatente, el cual es muy variable, puede ser muy corto, eliminando quiste a los tres días, o de hasta tres semanas después de haberse infectado con el parásito (Thompson et al., 2008). Al disminuir el colesterol intestinal, altera la fluidez en las membranas de los trofozoitos, que pueden modificar la actividad de las enzimas ancladas a la membrana, desencadenando la transducción de señales que activan la transcripción de genes específicos para el enquistamiento (Carranza and Lujan, 2010). La eliminación de quistes es intermitente tanto en humanos como en animales, y los quistes son capaces de resistir hasta dos meses si las condiciones del ambiente lo permiten, por lo tanto, el enquistamiento es considerado el mayor factor de virulencia, ya que gracias a este proceso, el parásito puede sobrevivir fuera del huésped y este estadio es vital para poder infectar nuevos hospederos (Thompson and Smith, 2011; Thompson and Monis, 2012). La transmisión es oro-fecal, siendo necesarios de 10 a 100 quistes para genera una infección, la infección se puede dar por contacto persona-persona, animal-persona y animal-animal. Los quistes son capaces de sobrevivir en el ambiente, alrededor de dos meses en agua a 8°C y un mes a 21°C, siendo sensibles a la desecación, congelamiento y luz solar, pudiendo permanecer meses en el ambiente, contaminando agua potable y



Dirección General de Bibliotecas UAQ

alimentos (OPS, 2003; Traub et al., 2005; Escobedo et al., 2007; Karanis et al., 2007; Smith et al., 2007).

### 2.1.5. Epidemiología.

#### 2.1.5.1. Prevalencia en Humanos

La prevalencia mundial de *Giardia* en humanos es muy variable, en países industrializados varía entre 2 y 4%, y en países en desarrollo puede llegar a ser del 60%, mientras que en México, la frecuencia de esta parasitosis es del 19%. Según reporte de la Organización Mundial de Salud, alrededor de 200 millones de personas están infectadas con este parásito en países de Asia, África y América Latina, con una mortalidad estimada de 500,000 personas (Balderrama-Carmona et al.; Ali and Hill, 2003; Thompson, 2008; Vázquez-Tsuji and Campos-Rivera, 2009).

Los grupos con mayor susceptibilidad son los niños, mujeres embarazadas y personas con enfermedades inmunosupresoras; se calcula que al año se presentan alrededor de 300 millones de casos en todo el mundo, de los cuales alrededor de 200 millones se da en países en desarrollo, siendo más de 58 millones de casos reportados en niños (Lane and Lloyd, 2002; Thompson, 2008). En el caso de los de perros, los grupos más vulnerables son los perros jóvenes y animales que viven en poblaciones con alta densidad, tales como criaderos o refugios, así como perros que cursen con alguna otra enfermedad o que estén sometidos a estrés (Tysnes et al., 2014).

Es importante conocer la variedad de especies que puede afectar este parásito así como la distribución de sus diferentes grupos genéticos, gracias a esto podremos conocer su potencial zoonótico y el impacto que tienen las infecciones en animales domésticos en la trasmisión al humano (Thompson, 2008). Una de las fuentes de transmisión más importante es por consumo de agua potable contaminada con el parásito, dicha contaminación fue asociada en gran parte al ganado infectado, pero en la actualidad se sabe que la contaminación más probable



Dirección General de Bibliotecas UAQ

es debido a desechos humanos que contaminan aguas cloacales (Thompson et al., 2008).

Existen reportes de epidemias de giardiasis en Estados Unidos, los cuales fueron atribuidos a contaminación del abastecimiento de agua potable, una de ellas se reportó en Nueva York en 1974, donde el 10.4% de la población fue positiva a este parásito. Mientras que entre 1993 y 1994 se presentó en este mismo país una gran epidemia de enfermedades transmitidas por agua de bebida o de uso recreativo, en donde *Giardia* fue el patógeno más común, siendo responsable del 40% de los casos (OPS, 2003). Hunter en 1997, realiza un libro donde analiza los casos de epidemias diarreicas donde se vio involucrado este protozoario, encontrándose principalmente problemas que van desde la sanitización de fuentes de agua potable, acinamiento, falta de hábitos de higiene (no contar con letrinas), grado de escolaridad bajo (principalmente relacionado a pocos o escasos hábitos de higiene), viajes a países subdesarrollados, convivencia con gran número de animales, etc (Lujan, 2006).

Estudios que mencionan que en países donde la giardiasis humana es endémica, existe una alta prevalencia de pacientes excretando altas cantidades de cistos sin presentar signos clínicos, siendo más común encontrar al parásito en niños sin diarrea que en niños con diarrea, mientras que en otros estudios se menciona que el presentar cistos en heces está altamente ligado a la presencia de signos clínicos (OPS, 2003; Tysnes et al., 2014).

#### 2.1.5.2. Prevalencia y Potencial Zoonótico en Perros

En perros, la prevalencia mundial estimada es del 15.2% (Bouzid et al., 2015), mientras que en México es mayor del 42% (Ponce-Macotela et al., 2005) y los principales ensamblajes reportados en humanos y en perros son AI y AII (Cedillo-Rivera et al., 2003; Eligio-García et al., 2008). Lo que ocasiona que la transmisión zoonótica en México sea un problema real de salud pública,



Dirección General de Bibliotecas UAQ

principalmente asociado a factores socio culturales y condiciones sanitarias (Eligio-García et al., 2005).

En el caso de perros se encuentra mucha información a lo largo del mundo, por lo mismo, existe gran controversia sobre si son una fuente importante de infección, a pesar de que la mayor cantidad de casos de perros infectados son con ensamblajes propias de la especie (C y D) (Feng and Xiao, 2011), existen investigaciones que afirman que el riesgo es alto debido a altas prevalencias de ensamblajes zoonóticos en esta especie , tal es el caso de Dado et al., en 2012 quienes realizaron el estudio en España y reportan un 88% de presencia de ensamblajes zoonóticos, siendo el B el de mayor proporción (73%). Otros autores mencionan el riesgo aunque sus prevalencia reportadas sean bajas, como en el caso de Uehlinger et al., en 2013 quienes reportaron que el 16% de perros infectados con *G. intestinalis* corresponde a ensamblajes zoonóticos, mientras que en Canadá Mcdowall et al., en 2011 reportan que solo el 1% de los perros que analizaron corresponde al ensamblaje B.

Sin embargo, hay investigaciones donde se pone en duda el riesgo de infección a los humanos a través de los perros, ya que aunque el parásito estuvo presente en heces, no fueron detectados ensamblajes zoonóticos, como es el caso de Szénási et al., en 2007 en un estudio realizado en Hungría donde solo identificaron ensamblajes C y D, así como el estudio realizado en una zona endémica de Perú por Cooper et al., en 2010 donde de igual manera solo reportan ensamblajes C y D y solo una infección mixta con B/D.

No obstante, existen reportes en España y China de humanos infectados con el ensamblaje C, considerado específico de perros, lo que acentúa el rol de los perros en la transmisión de esta parasitosis a humanos (Liu et al., 2014; Štrkolcová et al., 2015). Por lo que, los perros representan un riesgo para la salud pública, debido a una alta prevalencia de ensamblajes zoonóticos (Ponce-Macotela et al., 2005; Eligio-García et al., 2008; Dado et al., 2012).



Dirección General de Bibliotecas UAQ

2.1.5.3. Potencial Zoonótico en Diferentes Especies Domésticas

Giangaspero et al. en 2007 realizaron una revisión donde compilaron varias investigaciones realizadas en Italia, donde mencionan que en varias especies animales se han reportado ensamblajes zoonóticos, en perros, gatos, conejos y animales silvestres estuvo presente el genotipo A, mientras que en becerros y borregos A y B.

Referente a animales de granja, estudios realizados en India y Canadá con ganado lechero, reportan la presencia del ensamblaje A, siendo el ensamblaje propio de la especie (E) el de mayor prevalencia (Appelbee et al., 2003; Khan et al., 2011), mientras que en Japón en un estudio realizado en becerros no reportan la presencia de ensamblajes zoonóticos (Matsubayashi et al., 2005). En México una investigación en becerros demostró la presencia de ensamblaje A y B, predominando el E (Cruz-Gómez, 2013), mientras que en otro estudio realizado con borregos y bovinos de traspatio, se reportó la presencia de los ensamblajes AI y B en ambas especies (Otero-Negrete et al., 2011).

En gatos la prevalencia de ensamblajes zoonóticos reportada en Canadá por Mcdowall et al., en 2011 fue del 100% los cuales corresponden a los genotipos A y B, en Italia el 100% de las muestras fueron zoonóticas pero pertenecientes al genotipo A (Papini et al., 2007), otros estudios realizados en Europa, Brasil y Estados Unidos reportan que es más frecuente encontrar el ensamblaje E propio de la especie, y que el ensamblaje zoonótico presente fue el A (Souza et al., 2007; Vasilopulos et al., 2007; Sprong et al., 2009a).

La transmisión entre animales y humanos de este parásito ha sido documentado en gran variedad de investigaciones, ya que muchas especies animales pueden verse afectadas por los genotipos considerados zoonóticos, el brote más extenso de *Giardia* en humanos atribuido a una fuente animal ocurrió en 1976 en Camas, Washington, donde se comprobaron 128 casos y al no lograr



Dirección General de Bibliotecas UAQ

establecer una contaminación debido a humanos, se investigó la procedencia de la infección, encontrándose varios castores infectados que vivían a las riberas de los arroyos que eran la fuente de agua para dicha población. Otro dato histórico importante, fue el registrado en 1978 en un zoológico de Estados Unidos, donde 6 primates y 3 mujeres del personal se infectaron a partir de un gibón infectado (OPS, 2003).

Existen investigaciones en Estados Unidos, Canadá y Reino Unido donde no reportan como factor de riesgo para presentar giardiasis el estar en contacto con animales, ya sean de granja o de compañía (Xiao and Fayer, 2008), mientras que hay alguna otras donde si lo atribuyen, uno de estos fue realizado en Nueva Zelanda, donde se menciona que existe un mayor riesgo de contraer el parásito si existe contacto con animales de granja, no así en el caso de tener mascotas como es el caso de perros y gatos (Hoque et al., 2002), mientras que en Inglaterra encontraron una asociación entre la presentación de giardiasis y el tener contacto con cerdos, perros y gatos (Xiao and Fayer, 2008), por último en un estudio realizado en Reino Unido reportan que el estar en contacto con especies como perros, gatos, caballos, vacas y borregos no significa un mayor riesgo de contagio (Stuart et al., 2003). Una de la especies que más ha sido asociada a la transmisión de este protozoario es el castor, el cual al vivir en lagos tiende a contaminar el abastecimiento de agua que los humanos utilizan (Feng and Xiao, 2011).

### 2.1.6. Patogenia.

Durante la primer división celular del excizoito poseen cuatro restos de discos, los cuales se reensamblan para formar dos nuevos discos, lo que permite a los trofozoitos atacar rápidamente (Palm et al., 2005). Sin embargo los excizoitos necesitan una alternativa para poder afectar al huésped, debido a que carece de un disco funcional, uno de estos mecanismos es la proteína giardina α-1, localizada en la superficie del excizoito, siendo una de las proteínas inmunodominantes del parásito (Palm et al., 2003; Weiland et al., 2005) . Dicha proteína pertenece a una



Dirección General de Bibliotecas UAQ

familia de genes específicos de *Giardia* relacionados a la anexinas, los cuales reaccionan a anticuerpos monoclonales elevados contra las lectinas del parásito. Las lectinas tienen importancia en el ataque por los trofozoitos y por provocar acortamiento de las microvellosidades, lo que genera una disminución en la actividad de las disacaridasas intestinales, pero un aumento en la cantidad lo que puede provocar diarrea osmótica (Buret et al., 1990; Palm et al., 2003; Weiland et al., 2005).

Una vez colonizado el intestino, los trofozoitos se dividen rápidamente, formando una barrera física entre los enterocitos y el lumen intestinal, interfiriendo con la absorción de nutrientes. Este proceso produce un daño en el enterocito, atrofia en las vellosidades, hiperplasia de las criptas e hiperpermeabilidad intestinal (Buret et al., 1992; Chin et al., 2002; Dagci et al., 2002).

Experimentos *in vitro* indican que *Giardia intestinalis* causa un reordenamientos de las actinas F y α en las células del duodeno en humanos, provocando una reducción de la resistencia eléctrica transepitelial (Teoh et al., 2000). De igual manera, se ha comprobado en experimentos *in vitro* e *in vivo* que dicho protozoario induce la apoptosis en células intestinales y la ruptura de las uniones estrechas de las monocapas intestinales, lo que provoca un incremento de permeabilidad intestinal, este aumento en la permeabilidad permite el paso de macromoléculas y electrolitos hacia la submucosa, este flujo paracelular de nutrientes y electrolitos contribuye a una malabsorción (Chin et al., 2002; Solaymani-Mohammadi and Singer, 2010). Este parásito también es capaz de interrumpir la actinina α en el enterocito, que es un componente del anillo de actomiosina encargado de regular el flujo paracelular a través del epitelio intestinal (Teoh et al., 2000). Otro de los factores involucrado en la desorganización de la función en la barrera intestinal, es la afectación de las claudinas epiteliales, que son proteínas encargadas de “sellar” las uniones estrechas del intestino (Troeger et al., 2007).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

#### 2.1.6.1. Diferencias Moleculares de los Ensamblajes Zoonóticos Asociadas a la Patogenia

Una de las diferencias entre el ensamblaje B y ensamblaje A, es el contenido de G+C, siendo menor en el B, esto fue atribuido a secuencias imperfectas obtenidas de las muestras analizadas, por lo que se necesitan más estudios para aclarar esta información (Jerlström-Hultqvist et al., 2010b). Entre estas dos especies existe una gran cantidad de genes conservados, con una similitud del 91% en su genoma (4, 557 genes iguales), las diferencias que se encontraron fueron en familias de genes específicos de *Giardia*, así como un gran número de reordenamientos de sus cromosomas, incluso entre cromosomas diferentes (Jerlström-Hultqvist et al., 2010a).

Franzén et al., en 2009 comparó las secuencias de los genomas de estas dos especies encontrando que tienen una similitud nucleotídica del 77% y el 78% de igualdad en aminoácidos, siendo el repertorio de genes que codifican para proteínas variables de superficie (VSP) en donde más diferencias se obtuvieron, así como en enzimas involucradas en la síntesis de las paredes de los quistes. Estas diferencias encontradas en su genoma comprueban que se trata de dos especies diferentes y ayuda para explica las diferencias clínicas que se presentan en la infección por estas dos especies, así como los huéspedes que infectan.

Una de las diferencias entre las dos especies zoonóticas es que el ensamblaje A a diferencia del B, presenta una secuencia promotora que regula el enquistamiento, lo cual puede explicar la razón por la que B muestra un enquistamiento menor en cultivos *in vitro* (Franzén et al., 2009). Como se mencionó, otra de las grandes diferencias entre estas especies, es el repertorio de genes de VSP que contienen, por un lado se obtuvo que el ensamblaje B contiene alrededor de 150 genes, mientras que el A cuenta aproximadamente con 270-303 genes, estas diferencias pueden explicar las distintas presentaciones clínicas que producen estas especies, así como a los huéspedes susceptibles de infectarse con ellas,



Dirección General de Bibliotecas UAQ

siendo el A el más asociado a infecciones de curso agudo, así como en el ensamblaje más localizado en diferentes mamíferos, mientras que B es más asociado a infecciones crónicas (Nash and Mowatt, 1992; Franzén et al., 2009; Jerlström-Hultqvist et al., 2010b).

Otra de las diferencias entre los ensamblajes zoonóticos, es que A cuenta con una proteína alfa 2 giardin, ausente en el ensamblaje B, esta proteína es una proteína prominente del citoesqueleto del disco ventral con el que se adhiere a las células intestinales, por lo tanto, es otro de los factores que ayuda a entender el mecanismo de acción diferente de estas dos especies (Steuart et al., 2008).

### 2.1.7. Respuesta del Sistema Inmune

La mucosa intestinal es una de las protecciones con las que cuenta el huésped contra microorganismos y está constituida principalmente de agua, inmunoglobulinas y mucinas. El intestino delgado se encuentra cubierto por una capa mucosa tipo gel, localizada entre el lumen y la membrana apical del epitelio, esta mucina es formada por diferentes estructuras de carbohidratos, los cuales sirven de sitio de unión para microorganismos comensales y patógenos, gracias a esta unión el parásito no puede interactuar con el epitelio, por lo que no se desencadena una respuesta inflamatoria severa por parte del huésped, y debido a la peristalsis los parásitos unidos a la mucina puede ser eliminados (Hetcht, 1999).

Por su parte, el epitelio intestinal secreta productos antimicrobianos que contribuyen para mantener la barrera mucosa, entre ellos se encuentran las defensinas y lactoferrinas, las cuales han demostrado en estudios *in vitro*, tener actividad contra *Giardia* (Eckmann, 2003). Las células encargadas de producir estas sustancias son las de Paneth (α-defensinas) y los enterocitos (β-defensinas), y su función es la de insertarse en las membranas creando poros, lo que produce salida de material intracelular provocando la lisis del parásito, por otro lado, las ayudan a regular la microbiota intestinal, lo que contribuye a la regulación de la



Dirección General de Bibliotecas UAQ

infección, siendo importante mencionar que cambios en la microbiota influye también en la producción de defensinas (Hetcht, 1999; Ayabe et al., 2004; El-Shewy and Eid, 2005; Salzman et al., 2007).

Sustancias como las especies reactivas de oxigeno (ERO) y el óxido nítrico (NO) tienen actividad citotóxica e inmumoduladora durante las infecciones gastrointestinales (Roxström-Lindquist et al., 2006). Las células epiteliales intestinales producen ERO, sustancias que se ha hipotetizado pueden jugar un rol importante en la inmunidad innata, debido a que *Giardia* es un parásito microaerofílico facultativo con una capacidad limitada para destoxificar y neutralizar las ERO (Brown et al., 1998; Krause, 2004).

En estudios *in vitro* el NO inhibe el crecimiento, enquiste y desenquiste de *Giardia intestinalis* pero no tiene efecto sobre su viabilidad, en el caso de infecciones por *Giardia*, la producción de NO se inhibe en las células epiteliales, debido a que dichas células necesitan arginina para producirlo y el parásito consume este sustrato (Eckmann et al., 2000; Langford et al., 2002). Otro factor importante para la disminución de NO, es la producción y liberación de proteínas por parte de este protozoario, dentro de las cuales se encuentrara la flavoproteína A, la cual es una reductasa de NO; estas proteínas también provocan cambios histológicos de moderados a profundos (Eckmann et al., 2000; Jiménez et al., 2004; Sarti et al., 2004; Solaymani-Mohammadi and Singer, 2010).

Otro de los efectos de la falta de arginina debido a su consumo por parte del parásito, es la apoptosis de los enterocitos, debido a que la falta de este sustrato es causa de muerte celular programada (Potoka et al., 2003). La apoptosis de las células epiteliales involucra la activación de la caspasa 3, una regulación a la baja del antiapoptótico Bcl-12 y un incremento en la expresión del proapoptótico Bax (Panaro et al., 2007).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

En relación a las respuestas celulares, los leucocitos son una línea celular importante durante las infecciones intestinales, varios tipos tienen la capacidad de migrar a través del epitelio hacia el lumen intestinal y matar a los microbios causantes de dichas infecciones, experimentos *in vitro* han demostrado la presencia de macrófagos y monocitos ingiriendo trofozoitos, destruyéndolos posteriormente por un mecanismo oxidativo (Hill and Pearson, 1987). Existen linfocitos intraepiteliales, cuya presencia es importante para controlar la infección de varios parásitos intestinales, en el caso de *Giardia*, su incremento debido a infecciones crónicas, ha sido relacionado a síndrome de malabsorción de sodio y glucosa (Troeger et al., 2007; Solaymani-Mohammadi and Singer, 2010). Otros leucocitos importantes durante la giardiasis por su capacidad de presentar antígenos, son las células dendríticas, mastocitos y células M (Roxström-Lindquist et al., 2006).

En cuanto a la respuesta humoral, las inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA son las más importantes para controlar la infección. En humanos y ratones, la infección con *Giardia* provoca una producción de anticuerpos anti-*Giardia* en las secreciones mucosas y en suero (Faubert, 2000; Palm et al., 2003; Téllez et al., 2005). Los linfocitos B son importantes para controlar la infección en las etapas tempranas, debido a la producción de IgA, que es el principal mecanismo de defensa, esta inmunoglulina anti-*Giardia* puede ser detectada en saliva y leche materna en humanos, por lo que la madre puede conferir inmunidad (Faubert, 2000; Langford et al., 2002; Tellez et al., 2003). Se han realizados varios estudios analizando la IgA de pacientes infectados y se ha observado que los antígenos más dominantes contra los que responden estos anticuerpos son las proteínas variantes de superficie (VSP por su siglas en inglés), así como antígenos asociados al citoesquelo (α y β tubulina y α y β giardina) o a su metabolismo (Palm et al., 2003; Téllez et al., 2005). La capacidad que tiene *Giardia* de poder expresar diferentes variantes antigénicas gracias a los VSP, provoca que la respuesta efectiva por parte de los anticuerpos sea lenta (Nash, 1997), a las dos semanas posteriores a la infección se puede observar una elevación de IgA, pero esta inmunoglobulina reacciona solo a



Dirección General de Bibliotecas UAQ

pequeñas unidades de las VSP del parásito; mientras que ocho semanas post-infección la IgA es capaz de reconocer y actuar contra todas las VSP, sus epítopes comunes y sus variantes antigénicas, por lo que a pesar de ser lenta la respuesta es efectiva por parte de los anticuerpos (Zhou et al., 2007).

Jiménez et al., (2004) demostró que la administración oral de antígenos de secreción y excreción provenientes de *Giardia* provoca una respuesta importante de los linfocitos Th2, principalmente por el aumento en la producción de anticuerpos (IgG1, IgG2 e IgE). En estudios en ratones, se observó que en infecciones provocadas por *Giardia intestinalis* genotipo B, existió una respuesta inmune mediada por linfocitos Th2, apoptosis epitelial con presencia de eosinófilos intraepiteliales, acortamiento de vellosidades, alteraciones en la profundidad de las criptas y celularidad (Bartelt et al., 2013).

Se han realizado estudios para conocer la función de las células dendríticas durante la infección por *Giardia*, las cuales al estar en contacto con parásitos vivos o extractos del mismo, se activan y actúan como presentadoras de antígenos, inhibiendo la secreción de IL-12 y potencializando la producción de IL-10 (Kamda and Singer, 2009). Esta inhibición en la producción de IL-12 sirve para explicar por qué en la infección con este parásito no se desarrolla una inflamación severa, contribuyendo a la ausencia de signos o a presentar una infección asintomática (Solaymani-Mohammadi and Singer, 2010).

Los linfocitos T son sumamente importantes para el control de la infección durante todas las etapas de la misma, esto debido a su colaboración para la producción de anticuerpos y la producción de citocinas (IFN-γ, IL-4, IL-5 e IL-6), siendo una de sus funciones regular la producción y liberación de defensinas anti-giardia hacia el lumen intestinal. Todo el linaje de las células T son útiles para controlar la infección, siendo los Th3 o linfocito T de mucosas el más importante, mientras que Th1 y Th2 son importantes pero no indispensables para controlar la infección, ya que la presencia de cualquiera de ellos es suficiente para eliminar la



Dirección General de Bibliotecas UAQ

infección y la ausencia de una de estas líneas celulares puede ser suplida por la otra (Singer and Nash, 2000; Matowicka-Karna et al., 2009).

En modelos murinos, se han observado la presencia de linfocitos T asociados a trofozoitos en el lumen intestinal, así como, que una deficiencia de linfocitos T, específicamente CD4 provoca una giardiasis crónica, debido a la incapacidad de eliminar la infección (Singer and Nash, 2000). Los linfocitos (CD4 y CD8) regulan el aumento de linfocitos intraepiteliales, también están involucrados en la alteración de la membrana apical de los enterocitos, pero no en la ruptura de la función de la barrera intestinal (Scott et al., 2002; Scott et al., 2004). Por otro lado, la función de las células CD8 durante la infección por *Giardia* no es del todo clara, Singer and Nash (2000) demostraron que no son necesarias para el control de la infección, por lo que Solaymani-Mohammadi and Singer (2010) proponen que es posible que ejerzan una función inmunoprotectora pero sin inducir una malabsorción de nutrientes, mientras que otros autores indican que contribuyen en el acortamiento de las vellosidades del intestino (Bartelt et al., 2013).

La infección por patógenos entéricos induce la expresión de quimiocinas (CCL2, CCL20, CXCL1, CXCL2 y CXCL3) y citocinas en el epitelio intestinal del huésped (Roxström-Lindquist et al., 2005). La interleucina 8 (IL-8) responsable de inducir inflamación, no se ve elevada en casos de *Giardia intestinalis* en comparación con otras infecciones gastrointestinales, lo que concuerda con la baja inflamación intestinal que provoca este parásito (Jung et al., 1995).

La IL-6 es necesaria para un control temprano de la infección aguda y su deficiencia genera infecciones crónicas, las células que la producen son los mastocitos y las células dendríticas y por tanto necesarios para controlar la infección, se ha observado acumulaciones de mastocitos en intestino delgado de ratones y jerbos posterior a la infección (Hardin et al., 1997; Bienz et al., 2003; Li et al., 2004). Estudios recientes, han demostrado que los mastocitos están relacionados con la permeabilidad epitelial y pueden influir en el desarrollo,



Dirección General de Bibliotecas UAQ

magnitud y cinética de la respuesta inmune por su efecto sobre las células dendríticas, linfocitos B y T (Hardin et al., 1997; Galli et al., 2005). Otra de las funciones de estas células es la regulación de las contracciones del musculo liso, aumentando las contracciones cuando sus gránulos son liberados, por lo que contribuyen en los cambios en la motilidad intestinal observados después de la infección. Por lo tanto estas células ayudan tanto en la protección como en la patología de la enfermedad (Li et al., 2007; Solaymani-Mohammadi and Singer, 2010).

### 2.1.8. Signos Clínicos.

Tanto la patogénesis como los signos clínicos en la giardiasis, dependerán de la combinación de factores propios del parásito y del huésped, principalmente presencia de otros parásitos o bacterias, así como el estado nutricional e inmunológico del huésped (Cacciò and Ryan, 2008; Thompson and Monis, 2011).

Los individuos afectados pueden ser asintomáticos o presentar una enfermedad severa, de curso crónico o agudo, con signos que incluyen: heces pastosas o diarrea fétida con presencia de moco, que no responde a antibióticos o coccidiostatos, así como nauseas, vómito, anorexia, cefalea, fiebre, dolor, urticaria y distensión abdominal (Geurden and Olson, 2011; Einarsson et al., 2016).

La presentación de la enfermedad dependerá del tipo de ensamblaje presente, el A esta asociado a infecciones agudas y el B a crónicas, pero a diferencia del A, el ensamblaje B se ha reportado en una mayor cantidad de pacientes sintomáticos (Thompson and Smith, 2011; Hussein et al., 2017; Jerez-Puebla et al., 2017).

### 2.1.9. Diagnóstico.

Debido a que los signos clínicos que se presentan en esta parasitosis, el diagnóstico basado solo en la historia clínica del paciente, es complicado, debido a



Dirección General de Bibliotecas UAQ

que los signos pueden coincidir con la presencia de diferentes patógenos, por lo tanto es necesario tomar en cuenta el ambiente en el que vive el paciente y complementar o confirmar el diagnóstico por medio de la detección del parásito en muestras de heces con ayuda de pruebas coproparasitoscópicas, detección de antígeno o PCR (Geurden and Olson, 2011).

La excreción de quistes puede no ser constante, principalmente en infeccione de curso crónico, por lo que es recomendable examinar muestras de diferentes días, lo ideal es analizar tres muestras de días consecutivos (O'Handley et al., 1999).

Las pruebas moleculares basadas en la PCR, digestión enzimática y secuenciación de diferentes genes, son de gran ayuda para la diferenciación de ensamblajes, ya que se ha demostrado que los individuos afectados pueden estar infectados con diferentes ensamblajes de Giardia (Geurden and Olson, 2011).

2.1.9.1. Técnicas Coproparasitoscópicas.

Las técnicas más utilizadas para detectar este protozoario son: examen directo de heces y técnicas de concentración con sucrosa, sulfato de zinc o nitrato de sodio; con estas técnicas es posible detectar ambos estadios del parásito (trofozoitos y quistes), sin embargo, la detección de quistes es más usado como método diagnóstico, debido a que los trofozoitos son fáciles de observar en frotis directo de muestras frescas pero en pacientes que cursen con diarrea, mientras que en individuos con infecciones de curso crónico o asintomáticos es más probable la identificación de quistes por técnicas de sedimentación o flotación (Geurden and Olson, 2011, Hooshyar et al., 2019).

Como se mencionó, el examen por frotis directo de heces, es más probable la observación de trofozoitos, sin embargo tiene una sensibilidad menor (34.7-55%) debido a la poca cantidad de muestra analizada para el diagnóstico en comparación



Dirección General de Bibliotecas UAQ

con las técnicas de concentración (65.2-83%) ( Geurden and Olson, 2011, Hooshyar et al., 2019), siendo la técnica de flotación por sulfato de zinc la más recomendada, detectando quistes no observados con otras técnicas (Smith and Mank, 2011).

Las técnicas coproparasitoscópicas son accesibles para pacientes y médicos, sin embargo, se necesita experiencia para dar un diagnóstico confiable, para no confundir los quistes de *Giardia* con los de otros parásitos, levaduras o artefactos (Dryden et al., 2006; Geurden and Olson, 2001).

2.1.9.2. Detección de Antígeno en Heces

Las pruebas utilizadas para la detección de antígenos en heces y que están disponibles en el mercado, son: inmunocromatografía rápida, ELISA e inmunofluorescencia, las cuales usan anticuerpos monoclonales contra proteínas localizadas en la pared de los quistes y la inmunocromatografia detecta además proteínas localizadas en los trofozoitos (Geurden and Olson, 2011). De las tres pruebas, la inmunofluorescencia ha demostrado tener la técnica más sensible para el diagnóstico del parásito, sin embargo, al igual que ELISA, se necesita equipo y personal especializado, por lo que su costo es mayor. Mientras que la prueba de inmunocromatografía rápida ha demostrado ser de gran utilidad para el diagnóstico de esta parasitosis, teniendo como ventaja el poder usarse en cualquier momento, es producida y distribuida de manera comercial para humanos y perros, obteniendo resultados en 15 minutos (Geurden et al., 2008; Geurden and Olson, 2011).

2.1.9.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Diferenciación de Ensamblajes

*G. intestinalis* al poseer ocho ensamblajes morfológicamente iguales pero genéticamente diferentes, su diferenciación tiene que ser realizada por medios moleculares basados en la amplificación de genes como *gdh*, *β-Giardin*, *18S rRNA*



Dirección General de Bibliotecas UAQ

y *tpi* por PCR, en conjunto con técnicas enzimáticas de digestión (RFLP) y secuenciación (Abe et al., 2005; Souza et al., 2007; Feng and Xiao, 2011).

Además de ser una prueba utilizada para hacer una diferenciación genética, es utilizada también como prueba diagnóstica, pudiendo ser una de las más sensibles, con capacidad de detectar desde un quiste (Amar et al., 2002). Sin embargo, existen diferentes factores que pueden intervenir en la sensibilidad de esta técnica, como es el caso de los inhibidores de la polimerasa presentes en muestras fecales (lípidos, hemoglobina, sales biliares, polisacáridos, bacterias, etc.), así como la poca cantidad de quistes que pueden estar presentes en la muestra y lo difícil que puede ser romper las paredes de los quistes para poder obtener DNA del parásito (Abbaszadegan et al., 2007; Babaei et al., 2011).

Debido a estos factores, se han desarrollado distintas metodologías para lograr una eficiente extracción de DNA, en las cuales se han utilizado muestras de heces sin ningún tratamiento previo y tratadas por diferentes métodos basados en el uso de sacarosa con el fin de purificar o concentrar los quistes, en las cuales se han usado la combinación de tratamientos físicos y químicos o enzimáticos para lograr la ruptura de los quistes, como choque térmico (congelación-ebullición), lisis con perlas de vidrio, buffer de lisis, enzimas (lisozima, proteinasa K, etc.), fenol-cloroformo, CTAB, etc (Abbaszadegan et al., 2007; Adamska et al., 2010; Babaei et al., 2011; Asgarian et al., 2018)(Abbaszadegan et al., 2007; Babaei et al., 2011).

El gen *β-Giardin* es de los más utilizados, debido a que es uno de los más eficientes al amplificar por PCR y su diferenciación molecular, por lo que presenta una sensibilidad alta para detectar infecciones por uno o múltiples ensamblajes, en comparación con los genes *18S rRNA* y *gdh* (Covacin et al., 2011). Por otro lado, el gen *gdh* tiene una sensibilidad menor al amplificar por PCR en comparación con el gen *β-Giardin* (Thompson and Ash, 2016; Lee et al., 2017) y con base a estudios donde realizaron la diferenciación de ensamblajes con estos dos genes (*β-Giardin y gdh*), no se observó diferencias en los resultados (Cacciò et al., 2008; Rodríguez



Dirección General de Bibliotecas UAQ

et al., 2014; Fantinatti et al., 2018), la única ventaja que mostró el gen *gdh* fue el diferenciar los subensambajes de B (Cacciò et al., 2008; Rodríguez et al., 2014).

Acorde a lo reportado por otros autores, quienes a pesar de haber realizado la amplificación y secuenciación de diferentes genes, los resultados fueron iguales (Trout et al., 2004; Fayer et al., 2006; Lalle et al., 2007) o con variaciones menores en uno de los cuatro genes utilizados (*SSU rRNA*) (Lee et al., 2017), sin embargo, el gen *SSU rRNA*, a pesar de tener una alta eficiencia para el diagnóstico de *Giardia*, no es la mejor elección para la genotipificación, a diferencia del *β-Giardin*, *tpi* y *gdh* (Thompson and Ash, 2016).

Mientras que el gen *tpi* debido a su variabilidad es un buen marcador filogenético para estudios de evolución molecular, epidemiológicos, y detección de infecciones mixtas intragenotípicas (Sulaiman et al., 2003; Goñi et al., 2018).

### 2.1.10. Tratamiento

#### 2.1.10.1. Tratamiento Alópata

Los medicamentos comúnmente utilizados como tratamiento para la giardiasis en humanos, son los nitroimidazoles (metronidazol y tinidazol), quinacrina y furazolidona (Geurden and Olson, 2011).

El metronidazol, penetra a los trofozoitos y su mecanismo de acción involucra la reducción del grupo nitro por medio de una enzima metabólica anaeróbica conocida como piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) o piruvato oxidoreductasa (POR) una vez descarboxilado el piruvato, esta reacción genera un radical nitro con tóxico. Una vez reducido el metronidazol, se une covalentemente al DNA, provocando daños que provocando la muerte del parásito (Horner et al., 1999; Upcroft and Upcroft, 2001). Sin embargo, este medicamento ha reportado efectos adversos (nauseas, vómito, ataxia), existen reportes de que es carcinogénico, además de presentar resistencia, asociada con una regulación



Dirección General de Bibliotecas UAQ

negativa de la actividad de POR (Villeneuve et al., 2000; Harris et al., 2001; Upcroft and Upcroft, 2001).

Por otro lado, la nitazoxanida a diferencia del metronidazol, carece de grupo nitro, inhibe la actividad de la POR ya que interfiere con el cofactor pirofosfato de tiamina, también inhibe la actividad enzimática de las proteínas disulfuro isomerasas, provocando la formación de proteínas mal plegadas que genera un deterioro en el proceso metabólico y regulador (Buchanan and Balmer, 2005; Hoffman et al., 2007; Müller et al., 2007). Por lo que es uno de los medicamentos que se perfilan como una promesa como tratamiento contra esta parasitosis (Cedillo-Rivera et al., 2002).

Otro grupo de fármacos utilizados con los bezimidazoles, con una eficacia del 90%, con baja toxicidad y buena respuesta en los pacientes incluso con dosis altas (Xiao et al., 1996; Villeneuve et al., 2000). Los benzimidazoles interfieren en la polimerización de la tubulina, componente principal del citoesqueleto de los trofozoitos, por lo que todas las actividades dependientes de esta proteína, son inhibidas, como el disco ventral, por lo que la adición de los trofozoitos al epitelio intestinal se disminuye, previniendo la colonización (Geurden and Olson, 2011).

#### 2.1.10.2. Tratamientos Alternativos

Se recomienda el uso de probióticos, ya que entre sus funciones están el de competir por sitios de adhesión y por nutrientes, producción de sustancias que inhiben el crecimiento, replicación y enquistamiento del parásito, estimular la respuesta inmune potencializando la producción de mucina y la producción de IgA a nivel intestinal (Malin et al., 1996; Fuller and Gibson, 1997; Pérez et al., 2001; Hawrelak, 2003).

Otra de las alternativas o sugerencias para el control de esta parasitosis es una dieta alta en fibra, ya que la presencia de fibra insoluble en la dieta incrementa

Dirección General de Bibliotecas UAQ

el número de células caliciformes intestinales, provocando mayor secreción de moco y en conjunto con el movimiento de las masas de fibra se reduce la adhesión de los trofozoitos y por lo tanto que se colonice el intestino. Tanto la fibra soluble como la lignina (insoluble) tienen la capacidad de unirse a las sales biliares, limitando el desarrollo y supervivencia de los trofozoitos (Schneeman, 1999; Hawrelak, 2003).

Las dietas debe ser baja en grasa, debido a que dietas altas en grasa estimulan la producción y liberación de sales biliares al lumen intestinal, el cual es un sustrato esencial para supervivencia del parásito (Vesy and Peterson, 1999; Marz, 1997).

Además, existen diferentes componentes o sustancias que han demostrado en estudios *in vitro* afectar el crecimiento del parásito, su capacidad de adhesión y su morfología, tal es el caso de la cúrcuma, menta, extracto de yuca y extractos de plantas medicinales de uso tradicional en México (damiana y zarzamora) (McAllister et al., 2001; Barbosa et al., 2006; Pérez-Arriaga et al., 2006; Vidal et al., 2007).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

# III. HIPÓTESIS

La prevalencia de Giardia intestinalis en perros del centro de México es mayor al 30% y más del 50% de los perros infectados con esta parasitosis presentará algún ensamblaje zoonótico.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

# IV. OBJETIVOS

## 4.1. Objetivo General.

Conocer la prevalencia de *Giardia intestinalis* en perros y determinar su potencial zoonótico.

## 4.2. Objetivos Específicos

- Diagnosticar la presencia de *Giardia intestinalis* en perros.
- Diferenciar los ensamblajes de *G. intestinalis* con potencial zoonótico en perros domésticos.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

# V. METODOLOGÍA

## 5.1. Lugar de Estudio.

El presente estudio se realizó en la ciudad de Santiago de Querétaro, Querétaro, México, con coordenadas entre 20°30’ a 20°56’ de latitud norte y de los 100°17’ a 100°36’ de longitud oeste. Colinda al este con el municipio de El Marqués, al sur con Huimilpan y Corregidora, al oeste con los municipios del estado de Guanajuato, Apaseo el Grande y San Miguel de Allende, y al norte con el de San José Iturbide. El municipio cuenta con un clima templado semiseco, con una temperatura media anual de 18°C, mayo y junio son los meses más calurosos, con temperaturas de hasta 36°C, mientras que diciembre y enero son los más fríos con temperaturas de -3°C. La precipitación pluvial anual promedio es de 555mm (INAFED, 2015).

## 5.2. Diseño experimental y toma de muestras.

Se realizó un estudio transversal donde se obtuvieron muestras fecales de 402 perros de diferentes poblaciones. De cada muestra se obtuvieron los siguientes datos: edad, género, consistencia de las heces y población de procedencia. Las diferentes poblaciones de procedencia fueron seleccionadas con base a los siguientes criterios; criadero, animales de una raza específica confinados con la finalidad de reproducirlos; refugio, animales sin hogar o abandonados confinados en instalaciones, en estrecho contacto con otros perros; sin propietario, animales en condición de calle; y domésticos, animales que viven con personas con el objetivo de ofrecer compañía.

Las muestras de perros de criadero, refugio y sin propietarios fueron tomadas por personal capacitado, recolectando heces del piso y conservadas en bolsas herméticas; en el caso de los perros domésticos, fueron colectadas por los propietarios en bolsas herméticas, inmediatamente después de defecar. Las muestras se trasladaron y almacenaron en refrigeración a 4°C para su posterior



Dirección General de Bibliotecas UAQ

análisis en el laboratorio de Microbiología Animal de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Este proyecto fue aprobado el día 29 de Julio del 2016 por parte del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, con número de registro 42FCN2016.

## 5.3. Diagnóstico Coproparasitoscópico.

Se realizó un diagnóstico coproparasitoscópico de flotación siguiendo la metodología descrita por Faust et al. en 1938. Se colocaron 2 gr de heces y 10 ml de agua destilada, se homogeneizó y filtró, colocando el filtrado en tubos cónicos de 15 ml, se centrifugaron a 350 *g* por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se repitió el proceso tres veces. Al precipitado se añadió 10 ml de sulfato de zinc (densidad 1.18) y se centrifugó a 200 *g* durante un minuto, con una pipeta Pasteur se recolectó material de la superficie y se colocó una gota en un portaobjetos, se añadió una gota de lugol parasitoscópico y se observó al microscopio para la identificación de quistes.

De las muestras positivas al estudio coproparasitoscópico, se tomaron 28 muestras que fueron las que presentaron mayor contenido de quistes, para realizar la concentración y purificación de quistes por medio de un colchón de sacarosa (Minvielle et al., 2008) y posteriormente realizar la extracción de DNA.

## 5.4. Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó a la lisis de los quistes de acuerdo a la metodología descrita por Babaei et al. en 2011, con algunas modificaciones, 200 µl de la muestra concentrada se colocaron en crioviales de 2 ml con 200 µg de perlas de vidrio (0.1 mm de diámetro) y 500 µl de buffer de lisis (100 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, 100 mM EDTA, 1% SDS, pH 7.4); se homogeneizaron en PowerLyzer 24 (Mo

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Bio Laboratories, Inc.) por 5 ciclos de 2 minutos a 2500 rpm con un descanso de 30 segundos entre ciclos.

Posteriormente, se realizó choque térmico, de cinco ciclos de congelación en nitrógeno líquido y agua en ebullición hasta su descongelación. Adicionalmente, se agregaron 40 µl de proteinasa K (10 mg/ml) (Ref. 25530-049 Invitrogen) y 10 µl de SDS (1M), incubándose por 4 horas a 55ºC. Al terminar, la separación y purificación del DNA de cada muestra lisada se llevó a cabo mediante la técnica de fenol cloroformo CTAB descrita por De Almeida et al. (2013) con algunas modificaciones, donde a cada muestra se le añadió 400 µl de buffer TE 1X (100 mM tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA) y 50 µl de lisozima (10 mg/ml) (Ref. L3790, Sigma Aldrich), se homogeneizó e incubó por 1 hora a 37ºC, se añadió 100 µl de SDS (10%) y 10 µl de proteinasa K (10 mg/ml) (Ref. 25530-049 Invitrogen), se mezcló e incubó por 30 minutos a 65ºC. Posteriormente, se agregaron 100 µl de NaCl (5M) más 40 µl de CTAB (10%) preincubado y se agitó en vortex hasta que la solución se tornó lechosa, incubándose por 30 minutos a 65ºC, se adicionó 400 µl de fenol cloroformo isoamílico (24:24:1) agitándose por 10 segundos en vortex y centrifugándose a 13,200 g durante 10 minutos, se tomó y transfirió 500 µl de sobrenadante a un tubo nuevo, al que se añadió 500 µl de cloroformo isoamílico (24:1), se homogeneizó y centrifugó a 13,200 g por 10 minutos, se tomó y transfirió 500 µl de sobrenadante a un tubo nuevo, agregando 600 µl de alcohol isopropílico absoluto, se precipitó el DNA por 2 horas a -20ºC y se centrifugó a 13,200 g por 15 minutos, se tiró el sobrenadante y se lavó la pastilla de DNA con 500 µl de etanol (70%), se centrifugó por 20 segundos a 13,200 g, se retiró el sobrenadante y se secó la pastilla durante 1 hora a temperatura ambiente, finalmente se resuspendió la pastilla con 50 µl de agua ultrapura y se mantuvo a -20ºC.

### 5.5. Amplificación del gen *β-Giardin*.

Para la amplificación del gen *β-Giardin* se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Cacciò et al. (2002), realizando dos amplificaciones, la primera de 753



Dirección General de Bibliotecas UAQ

pb utilizando los oligonucleótidos G7 y G759, en la segunda se amplificó un segmento de 384 pb utilizando los oligonucleótidos G759 y G376. Los oligonucleótidos utilizados, fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT). La reacción para la primera amplificación se hizo a un volumen final de 12 µl, la cual contenía 6 µl de GoTaq Green Master Mix 2X (ref. M7122, Promega), 0.5 µl de cada oligonucleótido (10 µM), 4 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de DNA (100 ng/ µl); mientras que la reacción de la segunda amplificación se realizó a un volumen final de 20 µl, el cual contenía 10 µl de GoTaq Green Master Mix 2X (ref. M7122, Promega), 0.85 µl de cada oligonucleótido (10 µM), 6.3 µl de agua libre de nucleasas y 2 µl de DNA (100 ng/ µl).

Las condiciones de ciclado para ambas reacciones fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95ºC durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95ºC por 30 segundos, alineamiento a 65ºC por 30 segundos y extensión a 72ºC por 60 segundos, con una extensión final a 72ºC durante 7 minutos. En todas las corridas se añadió control positivo y negativo, el cual contenía los mismos componentes de la reacción, pero sin agregar DNA, que fue sustituido por agua libre de nucleasas. Los resultados se observaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X (50 minutos, 80 volts), utilizando marcador de peso molecular de 100 pb (ref. G2101, Promega) y buffer de carga Blue/Orange 6X (ref. G190A, Promega).

5.6. Diferenciación de Ensamblajes.

Para la obtención de ensamblajes, se realizó mediante dos enzimas *Hae III* y *Hha I* (Cacciò et al., 2002), la primera nos da el patrón de bandas para todos los ensamblajes que pueden estar presentes en perros (A, B, C y D) y la segunda diferencia los subtipos del ensamblaje A (AI y AII). Por lo que para la digestión del segmento de 753 pb se digirió con *Hae III* (ref. 0108S, New England, BioLabs), utilizando un volumen final de 10 µl, que contenía 0.25 µl de enzima, 1 µl de buffer Cutsmart (ref. B7204S, New England, BioLabs), 4.75 µl de agua libre de nucleasas



Dirección General de Bibliotecas UAQ

y 4 µl del producto del primer PCR, se incubó durante 1 hora a 37ºC. El perfil de las bandas (pb) observables para la diferenciación de ensamblajes fue el siguiente: para A se observan tres bandas: 200, 150 y 130; con B cinco: 200, 180, 150, 120 y 80; para C igual cinco bandas: 290, 150, 130, 100 y 70; y en el caso de D se observan tres: 350, 290 y 120 (Rodríguez et al., 2014).

Para diferencia los subtipos del ensamblaje A, se digirió el segmento de 384 pb se digirió con la enzima *Hha I* (ref. R644A, Promega), donde a 10 µl del producto de la segunda reacción de PCR se le agregó 0.25m µl de enzima y se incubó por dos horas a 37ºC. El patrón de bandas (pb) esperado es el siguiente: el subtipo A1 será de tres bandas: 190, 100 y 70; mientras que para AII se observaran dos bandas: 210 y 70 (Rodríguez et al., 2014).

El resultado de ambas digestiones se visualizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 3% en buffer TAE 1X (120 minutos, 70 volts), utilizando marcador de peso molecular de 100 pb (ref. G2101, Promega) y buffer de carga Blue/Orange 6X (ref. G190A, Promega).

5.7. Secuenciación.

Una vez estandarizada la PCR, con la finalidad de confirmar que la amplificación correspondía al segmento esperado del gen *β-Giardin*, se mandó secuenciar el producto de PCR de una de las muestras obtenidas, la amplificación secuenciada fue la correspondiente al segmento de 384 pb, para lo cual se añadió ambos oligonucleótidos utilizados (G376 y G759). La secuenciación fue realizada en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO, CINVESTAB, Irapuato, Guanajuato).

5.8. Análisis Estadístico.

El análisis estadístico fue mediante tablas de contingencia (2x2) utilizando el programa EPIDAT 3.1 (Sergas, 2006), para conocer si existe asociación de algún



Dirección General de Bibliotecas UAQ

factor con la presentación de la enfermedad, los factores analizados fueron: edad, población de procedencia, género y consistencia de las heces.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

# VI. RESULTADOS

La distribución de los 402 animales muestreados, con base en los datos recolectados fue la siguiente: la mayor cantidad de muestras obtenidas fue de animales adultos y fueron de consistencia firme, mientras que para el género las proporciones fueron similares. En relación a la población de procedencia, se obtuvieron cantidades similares de perros de criadero, domésticos y sin propietario, siendo los procedentes de refugio, de los que se obtuvo menor cantidad.

Por medio del análisis coproparasitoscópico se diagnosticó un total de 103 positivos, obteniendo una prevalencia del 25%. Las frecuencias obtenidas con base en los diferentes datos obtenidos de las muestras, así como el valor estadístico (P) para conocer si existe asociación entre factores y la presentación de la enfermedad, se pueden observar en el cuadro 1. En el cual se observa que el género no es un factor de riesgo para la presentación de la enfermedad, sin embargo, los factores que representan un riesgo de observar quistes de *Giardia* son: edad menor a 6 meses, presencia de heces pastosas y población de procedencia, siendo los perros sin propietario los de mayor riesgo, población en la cual fue observada la mayor cantidad de quistes excretados.

Cuadro 1. Distribución de las muestras y análisis estadístico de determinación de factores de riesgo (edad, consistencia de heces y género).

| | | **Total** | **Positivos** | **Negativos** | **Frecuencia** | ***p*** | **OR** | **IC 95%** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Edad** | <6 meses | 41 | 16 | 25 | 39.02 | 0.038* | 2.01 | 1.029-3.947 |
| | >6 meses | 361 | 87 | 274 | 24.1 | | | |
| **Consistencia de Heces** | Pastosa | 126 | 42 | 84 | 33.3 | 0.0036* | 2.009 | 1.251-3.226 |
| | Firme | 276 | 55 | 221 | 19.9 | | | |
| **Género** | Macho | 180 | 50 | 130 | 27.8 | 0.37 | 1.22 | 0.782-1.921 |
| | Hembra | 222 | 53 | 169 | 23.9 | | | |

Dirección General de Bibliotecas UAQ

* Datos estadísticamente significativos ($p$<0.05)

En relación al tipo de población de donde proceden los perros analizados, se observó que la mayor frecuencia del parásito se presentó en los perros sin propietario (40.77%), seguido de criadero (26.21%), refugio (19.4%) y domésticos (13.59%), debido a esto, en las tablas de contingencia se tomó como grupo no expuesto a los perros domésticos. Los perros domésticos son los menos asociados a la presentación de la enfermedad (Cuadro 2, P<0.05). Sin embargo, el grupo que mostró más asociación, así como un mayor factor de riesgo (OR=4.95) con la presentación de la enfermedad son los perros sin propietario, seguido de los de criadero (OR=2.57) y refugio (OR=2.24).

Cuadro 2. Análisis estadístico de determinación de factores de riesgo con base en la población de procedencia de los animales muestreados.

| | **Doméstico** | | |
|---|---|---|---|
| | **P** | **OR** | **IC 95%** |
| **Sin Propietario** | 0* | 4.95 | 2.496-9.815 |
| **Refugio** | 0.0128* | 2.571 | 1.204-5.489 |
| **Criadero** | 0.028* | 2.246 | 1.107-4.557 |

* Datos estadísticamente significativos (P<0.05)
Nota: Se consideró a los perros domésticos como población no expuesta al haber presentado la frecuencia más baja.

De las 28 muestras utilizadas, procedentes de perros sin propietario, solamente en el 85.7% (24) se logró amplificar ambos segmentos esperados (753 y 398 pb) y el 14.3% (4) no amplificó. De las cuales, se observó que el 100% de las muestras amplificadas pertenece al ensamblaje A, de las cuales el 83.3% (20) pertenecen al subtipo A1 y 16.7 % (4) al subtipo A2.

En la figura 5 se observa el patrón de corte resultado de la digestión enzimática, en A4 y A5 se observan las bandas características del ensamblaje A (200, 150 y 130 pb), A4 pertenece al control positivo y A5 a la muestra 1. Mientras



Dirección General de Bibliotecas UAQ

que en AI, A2 y A3 se observa el bandeo esperado para el subensamblaje AI (190, 100 y 70 pb), A1 pertenece al control positivo, mientras que A2 y A3 a las muestras 1 y 2 respectivamente.

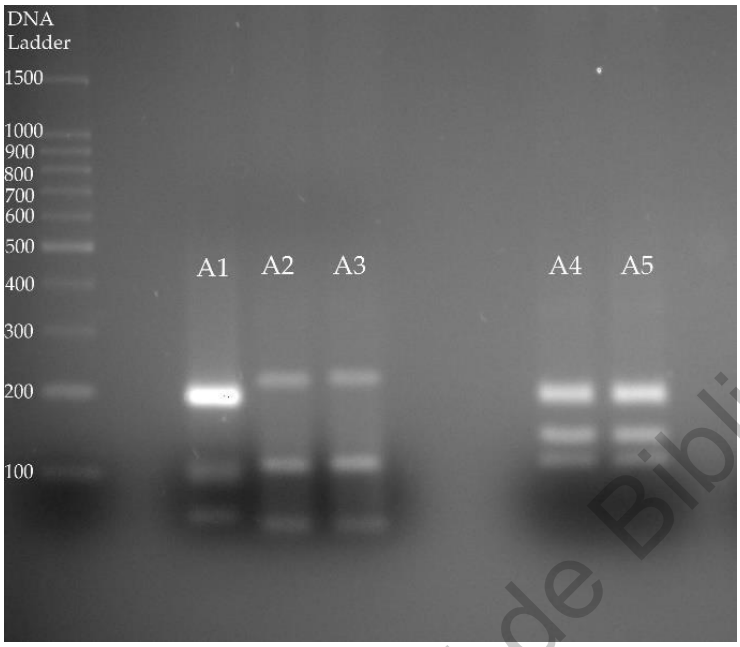


Figura 5. Patrón de corte de ensamblaje A y subensamblaje AI. En A4 y A5 se muestra el patrón de corte correspondiente al ensamblaje A (200, 150 y 130pb. En A1, A2 y A3 se observa el patrón de corte correspondiente al subensamblaje AI (190, 100 y 70 pb).

En la figura 6 se observa el resultado obtenido de la digestión del segmento de 384 pb de 18 de las muestras amplificadas, donde 15 de las muestras se catalogaron como subensamblaje AI, con bandas obtenidas de 190, 100 y 70 pb. Mientras que 3 de las muestras (2, 7 y 8) pertenecen al subensamblaje AII, con bandas de 210 y 70 pb.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

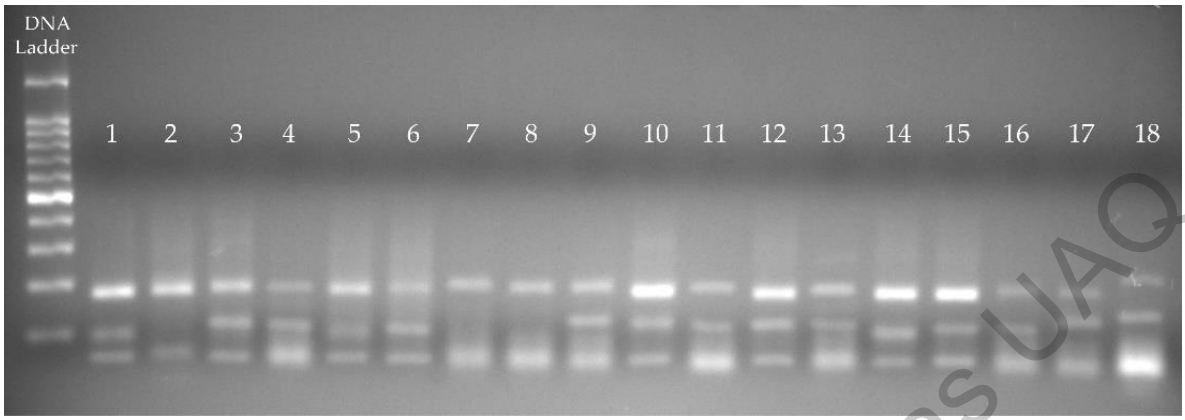


Figura 6. Digestión enzimática de los segmentos de 384 pb amplificada en muestras provenientes de perros. En 1, 3-6, 9-18 se muestra el patrón de bandeo correspondiente al subensamblaje AI (190, 100 y 70 pb), mientras que 2, 7 y 8 se observa el patrón esperado correspondiente al subensamblaje AII (210 y 70 pb).

Una vez obtenido el resultado de la secuenciación del segmento de 384 pb, así como de los oligonucleótidos utilizados para dicha amplificación, se realizó un BLASTn utilizando el servicio en línea del GenBank, el cual mostró un porcentaje de identidad del 100% para la secuenciación de la muestra con el oligonucleótido G376 y del 94% con el G759. Los resultados del análisis de la secuenciación se pueden observar en los apéndices.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

# VII. DISCUSIÓN

La prevalencia general obtenida fue del 25%, alta en comparación con la estimada a nivel mundial de 15.2% (Bouzid et al., 2015) y a lo reportado en el norte de México en perros domésticos de áreas urbanas y rurales (García-Cervantes et al., 2017). Sin embargo, la prevalencia es menor a lo reportado en España (36.5%) en perros de diferentes poblaciones (Adell-Aledón et al., 2018); así como con lo reportado en la Ciudad de México en perros sin propietario, que oscila entre 42 y 51% (Ponce-Macotela et al., 2005). No obstante la prevalencia obtenida en esta investigación en perros sin propietario fue de 40.77%, lo cual es más cercana a lo obtenido en la Ciudad de México. La diferencia de la prevalencia puede estar relacionada con la toma de muestra, ya que en el experimento de Ponce-Macotela et al. (2005) las muestras fueron tomadas directamente del intestino y en esta investigación fue por observación de quistes en heces, y dicha excreción puede ser intermitente (Burke, 1977).

Respecto a la asociación de variables con la presentación de la enfermedad, se observa que la edad es uno de los más importantes, siendo los cachorros los que presentan una fuerte asociación con la enfermedad, que coincide con lo reportado en otros estudios (Capelli et al., 2003; Batchelor et al., 2008; Katagiri and Oliveira-Sequeira, 2008; Bouzid et al., 2015).

Los perros sin propietario presentaron mayor asociación y riesgo a la enfermedad, en comparación a las otras poblaciones (criadero, refugio, domésticos), datos que coindicen con lo reportado en Brasil (Katagiri and Oliveira-Sequeira, 2008) y con lo reportado por Bouzid et al. (2015). Por otro lado, no se asemeja a lo reportado en Italia donde los perros con mayor riesgo fueron los de refugio (Capelli et al., 2003). Mientras que en España, las prevalencias fueron mayores, 45.8%, 40.4% y 37.7% para perros de criadero, refugio y domésticos respectivamente (Adell-Aledón et al., 2018).

Respecto a la lisis de los quistes, la extracción de DNA fue adecuada, al lograr amplificar el gen *β-Giardin* en el 85.7% de las muestras, que representa una



Dirección General de Bibliotecas UAQ

proporción mayor a lo reportado por Babaei et al. (2011), quienes al usar un método similar amplificaron el 36% de las muestras. El aumento de muestras amplificadas podría deberse a que utilizaron el método tradicional de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y en la presente investigación se usó un método similar pero se añadió CTAB, que elimina inhibidores de polimerasa en heces y reduce impurezas, con el inconveniente de reducir las concentraciones obtenidas (Abbaszadegan et al., 2007), lo cual podría explicar el 14% de las muestras que no amplificaron.

La diferenciación de ensamblajes mostró que el 100% de las muestras amplificadas y digeridas pertenecen al ensamblaje A, lo que confirma que es el ensamblaje más asociado a transmisión zoonótica (Ryan and Cacciò, 2013). Estos resultados difieren de estudios que reportan el 100% ensamblajes propios de la especie y ponen en duda el riesgo de infección a humanos (de Lucio et al., 2017; Simonato et al., 2017). Y coincide con lo observado en perros callejeros de Río de Janeiro (Fantinatti et al., 2018) y en el norte de México (Eligio-García et al., 2008; García-Cervantes et al., 2017).

En relación a los subensamblajes de A, el 83.3% fueron AI y 16.7% AII, la mayor proporción de AI confirma que a diferencia de A2, tiene mayor preferencia de infectar animales domésticos (Sprong et al., 2009b; Feng and Xiao, 2011). Jerez-Puebla et al. (2017) informan que en Cuba en perros domésticos, se observaron prevalencias del 80% AI, 20% AII; mientras en México, García-Cervantes et al. (2017) informó 100% de AI y Eligio-García et al. (2008) 52.6% para AI y 47.4% de AII. En los estudios mencionados la cantidad de animales analizados fue menor en comparación a los incluidos en este estudio (24), siendo el realizado por Eligio-García et al. en 2008 en el que más muestras fueron analizadas (19), todas procedentes de cachorros; mientras que García-Cervantes et al. (2017) incluyó cinco muestras.

Las diferentes condiciones ambientales, sociales y culturales contribuyen en la distribución de los ensamblajes en perros, siendo posibles dos ciclos de transmisión: donde están involucrados ensamblajes propios de la especie (entre

Dirección General de Bibliotecas UAQ

perros) y otro donde existe transmisión cruzada de ensamblajes zoonóticos (A, B) (Ponce-Macotela et al., 2005; Covacin et al., 2011; Feng and Xiao, 2011).

Los perros sin propietario o callejeros, al tener más contacto con otros perros, están más expuestos a los ensamblajes propios en comparación con los domésticos, que conviven estrechamente con humanos (Thompson, 2004), lo que difiere con los resultados obtenidos, sin embargo, esto puede deberse a que la presente investigación fue realizada en una zona urbana, lo que puede explicar la alta prevalencia de ensamblajes zoonóticos en los perros analizados, debido a la cercanía y convivencia con humanos y sus desechos, principalmente heces, que contaminan el ambiente infectando a otras especies, por lo que el riesgo de infección cruzada es mayor (Thompson, 2004; van der Giessen et al., 2006; Feng and Xiao, 2011; Heyworth, 2016).

Si se considera que los individuos parasitados excretan gran cantidad de quistes, así como la baja dosis que se necesita para provocar esta enfermedad (Horton et al., 2019) y la alta frecuencia observada en animales sin propietario (40.77%), podría indicar un alto riesgo en la salud pública, por contaminación del ambiente, considerando que los quistes tienen la capacidad de sobrevivir en él y contaminar agua potable y alimentos, así como parques públicos y jardines abiertos (Balderrama-Carmona et al., 2017), creando un riesgo de infección para perros con dueño y humanos, especialmente niños, ya que el 100% de los quistes excretados en los perros analizados, pertenecen al ensamblaje A. Lo anterior pone de manifiesto la importancia de controlar estas enfermedades en perros de la calle y establecer programas estatales para el control de esta y otras parasitosis zoonóticas. En conjunto, se deben tomar acciones para eficientizar el tratamiento de fuentes de agua, que ha demostrado ser una fuente importante de diseminación (Barbeau et al., 2000; Xiao et al., 2013; Horton et al., 2019), así como establecer programas para difundir correctas prácticas de higiene en la población, debido a que el consumo de alimentos contaminados y su preparación, son otros factores importantes en la propagación de este parásito (Bondi et al., 2014; Horton et al., 2019).



Dirección General de Bibliotecas UAQ

# VIII. CONCLUSIÓN

La prevalencia general obtenida por análisis coproparasitoscópico fue del 25%, siendo el grupo de perros sin propietario los de prevalencia más alta (41%). De 24 muestras amplificadas por PCR, el 100% se diferenciaron como ensamblaje A, de las cuales, el 83.3% pertenecen al subensamblaje AI y el 16.7% al subensamblaje AII.

Debido a la alta frecuencia de quistes de *G. intestinalis* particularmente en los animales sin propietario (41%), podría sugerir una alta contaminación en el ambiente, considerando que los quistes tienen la capacidad de sobrevivir en él y contaminar agua potable y alimentos, así como parques públicos y jardines abiertos, creando un gran riesgo de infección para perros con dueño y humanos, especialmente niños, ya que el 100% de los quistes excretados pertenecen al ensamblaje A, lo que pone de manifiesto la importancia de controlar estas enfermedades en perros de la calle y establecer programas estatales para el control de esta y otras parasitosis zoonóticas.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

# IX. REFERENCIAS


- Abbaszadegan, M. R., A. Velayati, A. Tavasoli, and E. Dadkhah. 2007. Rapid DNA extraction protocol from stool, suitable for molecular genetic diagnosis of colon cancer. Iran. Biomed. J. 11:203–208.
- Abe, N., I. Kimata, and M. Tokoro. 2005. Genotyping of Giardia Isolates from Humans in Japan Using the Small Subunit Ribosomal RNA and Glutamate Dehydrogenase Gene Sequences. Jpn. J. Infect. Dis. 58:57–58.
- Adam, R. D. 2001. Biology of Giardia lamblia. Clin. Microbiol. Rev. 14:447–475.
- Adamska, M., A. Leónska-Duniec, A. Maciejewska, M. Sawczuk, and B. Skotarczak. 2010. Comparison of efficiency of various DNA extraction methods from cysts of Giardia intestinalis measured by PCR and TaqMan Real Time PCR. Parasite. 17:299–305.
- Adell-Aledón, M., P. C. Köster, A. de Lucio, P. Puente, M. Hernández-de-Mingo, P. Sánchez-Thevenet, M. A. Dea-Ayuela, and D. Carmena. 2018. Occurrence and molecular epidemiology of Giardia duodenalis infection in dog populations in eastern Spain. BMC Vet. Res. 1–11.
- Ali, S. a, and D. R. Hill. 2003. Giardia intestinalis. Curr Opin Infect Dis. 16:453–60.
- De Almeida, I. N., W. Da Silva Carvalho, M. L. Rossetti, E. R. D. Costa, and S. S. De Miranda. 2013. Evaluation of six different DNA extraction methods for detection of Mycobacterium tuberculosis by means of PCR-IS6110: Preliminary study. BMC Res. Notes. 6:2–7.
- Amar, C. F. L., P. H. Dear, S. Pedraza-Díaz, N. Looker, E. Linnane, and J. McLauchlin. 2002. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of Giardia duodenalis in human feces. J. Clin. Microbiol. 40:446–452.
- Andrews, R. H., M. Adams, P. F. L. Boreham, G. Mayrhofer, and B. P. Meloni. 1989. Giardia intestinalis: Electrophoretic evidence fora species complex. Int. J. Parasitol. 19:183–190.
- Ankarklev, J., J. Jerlström-Hultqvist, E. Ringqvist, K. Troell, and S. G. Svärd.




Dirección General de Bibliotecas UAQ

2010. Behind the smile: Cell biology and disease mechanisms of Giardia species. Nat. Rev. Microbiol. 8:413–422.

- Appelbee, A. J., L. M. Frederick, T. L. Heitman, and M. E. Olson. 2003. Prevalence and genotyping of Giardia duodenalis from beef calves in Alberta, Canada. Vet. Parasitol. 112:289–294.

- Asgarian, F., M. Tavalla, A. Teimoori, N. Zebardast, and B. Cheraghian. 2018. Evaluation of three protocols of DNA extraction for detection of giardia duodenalis in human fecal specimens. Jundishapur J. Microbiol. 11.

- Ayabe, T., T. Ashida, Y. Kohgo, and T. Kono. 2004. The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense. Trends Microbiol. 12:394–398.

- Babaei, Z., H. Oormazdi, S. Rezaie, M. Rezaeian, and E. Razmjou. 2011. Giardia intestinalis : DNA extraction approaches to improve PCR results. Exp. Parasitol. 128:159–162.

- Balderrama-Carmona, A. P., P. Gortáres-Moroyoqui, E. F. Morán-Palacio, R. G. Ulloa-Mercado, L. M. Díaz- Tenorio, and L. A. Leyva-Soto. Risk Assessment for Giardia in Environmental Samples. In: Current Topics in Giardiasis. 1st ed. Intechopen. p. 147–164.

- Barbeau, B., P. Payment, J. Coallier, B. Cle´ment, and M. Pre´vost. 2000. Evaluating the risk of infection from the presence of Giardia and Cryptosporidium in drinking water. Quant. Microbiol. 2:37–54.

- Barbosa, E., F. Calzada, and R. Campos. 2006. Antigiardial activity of methanolic extracts from Helianthemum glomeratum Lag. and Rubus coriifolius Focke in suckling mice CD-1. J. Ethnopharmacol. 108:395–397.

- Bartelt, L. A., J. Roche, G. Kolling, D. Bolick, F. Noronha, C. Naylor, P. Hoffman, C. Warren, S. Singer, and R. Guerrant. 2013. Persistent G. lamblia impairs growth in a murine malnutrition model. J. Clin. Invest. 123:2672–2684.

- Batchelor, D. J., S. Tzannes, P. A. Graham, J. M. Wastling, G. L. Pinchbeck, and A. J. German. 2008. Detection of Endoparasites with Zoonotic Potential in Dogs with Gastrointestinal Disease in the UK. Transbound. Emerg. Dis. 55:99–104.

- Benchimol, M. 2004a. Participation of the adhesive disc during karyokinesis in



Dirección General de Bibliotecas UAQ

Giardia lamblia. Biol. Cell. 96:291–301.

- Benchimol, M. 2004b. Mitosis in Giardia lamblia: multiple modes of cytokinesis. Protist. 155:33–44.

- Bernander, R., J. E. D. Palm, and S. G. Svärd. 2001. Genome ploidy in different stages of the Giardia lamblia life cycle. Cell. Microbiol. 3:55–62.

- Bienz, M., W. Dai, M. Welle, B. Gottstein, and N. Müller. 2003. Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to Giardia lamblia infection but exhibit normal intestinal immunoglobulin A responses against the parasite. Infect. Immun. 71:1569–1573.

- Bondi, M., P. Messi, P. M. Halami, C. Papadopoulou, and S. De Niederhausern. 2014. Emerging microbial concerns in food safety and new control measures. Biomed Res. Int. 2014.

- Bouzid, M., K. Halai, D. Jeffreys, and P. R. Hunter. 2015. The prevalence of Giardia infection in dogs and cats , a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. Vet. J. 207:181–202.

- Brown, D. M., J. A. Upcroft, M. R. Edwards, and P. Upcroft. 1998. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote Giardia duodenalis. Int. J. Parasitol. 28:149–164.

- Buchanan, B. B., and Y. Balmer. 2005. Redox Regulation: A Broadening Horizon. Annu. Rev. Plant Biol. 56:187–220.

- Buret, A., D. G. Gall, and M. E. Olson. 1990. Effects of Murine Giardiasis on Growth, Intestinal Morphology, and Disacchardase Activity. J. Parasitol. 76:403–409.

- Buret, A., J. A. Hardin, M. E. Olson, and D. G. Gall. 1992. Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with Giardia lamblia. Gastroenterology. 103:506–13.

- Burke, J. A. 1977. The clinical and laboratory diagnosis of giardiasis. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 7:373–391.

- Cacciò, S. M., R. Beck, M. Lalle, A. Marinculic, and E. Pozio. 2008. Multilocus genotyping of Giardia duodenalis reveals striking differences between assemblages



Dirección General de Bibliotecas UAQ

A and B. Int. J. Parasitol. 38:1523–1531.

– Cacciò, S. M., M. De Giacomo, and E. Pozio. 2002. Sequence analysis of the β-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype Giardia duodenalis cysts from human faecal samples. Int. J. Parasitol. 32:1023–1030.

– Cacciò, S. M., and U. Ryan. 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. Mol. Biochem. Parasitol. 160:75–80.

– Cacciò, S. M., and H. Sprong. 2010. Giardia duodenalis: Genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. Exp. Parasitol. 124:107–112.

– Capelli, G., B. Paoletti, and M. Pietrobelli. 2003. Prevalence of Giardia spp. in dogs and humans in Northern and Central Italy. Parasitol Res. 90:S153–S154.

– Carranza, P. G., and H. D. Lujan. 2010. New insights regarding the biology of Giardia lamblia. Microbes Infect. 12:71–80.

– Cedillo-Rivera, R., B. Chayez, A. González-Robles, A. Tapia, and L. Yépez-Mulia. 2002. In Vitro Effect of Nitazoxanide Against. 49:201–208.

– Cedillo-Rivera, R., J. M. Darby, J. A. Enciso-Moreno, G. Ortega-Pierres, and P. L. Ey. 2003. Genetic homogeneity of axenic isolates of Giardia intestinalis derived from acute and chronically infected individuals in Mexico. Parasitol. Res. 90:119–23.

– CFSPH. 2012. Giardiasis. Cent. Food Secur. Public Heal. 1–13. Available from: www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/giardiasis.pdf

– Chin, A. C., D. A. Teoh, K. G. E. Scott, J. B. Meddings, W. K. Macnaughton, and A. G. Buret. 2002. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by Giardia lamblia disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. Infect. Immun. 70:3673–3680.

– Cooper, M. A., R. D. Adam, M. Worobey, and C. R. Sterling. 2007. Population Genetics Provides Evidence for Recombination in Giardia. Curr. Biol. 17:1984–1988.

– Cooper, M. A., C. R. Sterling, R. H. Gilman, V. Cama, Y. Ortega, and R. D. Adam. 2010. Molecular Analysis of Household Transmission of Giardia lamblia in a Region of High Endemicity in Peru. J. Infect. Dis. 202:1713–1721.



Dirección General de Bibliotecas UAQ

- Covacin, C., D. P. Aucoin, A. Elliot, and R. C. A. Thompson. 2011. Genotypic characterisation of Giardia from domestic dogs in the USA. Vet. Parasitol. 177:28–32.
- Cox, F. E. G. 2002. History of Human Parasitology History of Human Parasitology. Clin. Microbiol. Rev. 15:595–612.
- Cruz-Gómez, E. 2013. Prevalencia y genotipificación de Giardia intestinlais en becerros menores de tres medes de edad de la cuenca lechera de Tizayuca. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Dado, D., A. Montoya, M. A. Blanco, G. Miró, J. M. Saugar, B. Bailo, and I. Fuentes. 2012. Prevalence and genotypes of Giardia duodenalis from dogs in Spain: Possible zoonotic transmission and public health importance. Parasitol. Res. 111:2419–2422.
- Dagci, H., S. Ustun, M. S. Taner, G. Ersoz, F. Karacasu, and S. Budak. 2002. Protozoon infections and intestinal permeability. Acta Trop. 81:1–5.
- Dryden, M. W., P. A. Payne, and V. Smith. 2006. Accurate diagnosis of Giardia spp and proper fecal examination procedures. Vet. Ther. 7:4–14.
- Eckmann, L. 2003. Mucosal defences against Giardia. Parasite Immunol. 25:259–270.
- Eckmann, L., F. Laurent, T. D. Langford, M. L. Hetsko, J. R. Smith, M. F. Kagnoff, and F. D. Gillin. 2000. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen Giardia lamblia. J. Immunol. 164:1478–1487.
- Einarsson, E., S. Ma'ayeh, and S. G. Svärd. 2016. An up-date on Giardia and giardiasis. Curr. Opin. Microbiol. 34:47–52.
- El-Shewy, K., and R. Eid. 2005. In vivo killing of Giardia trophozoites harbouring bacterial endosymbionts by intestinal Paneth cells: an ultrastructural study. Parasitology. 130:269–274.
- Eligio-García, L., A. Cortes-Campos, S. Cota-Guajardo, S. Gaxiola, and E. Jiménez-Cardoso. 2008. Frequency of Giardia intestinalis assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan , Sinaloa , Mexico using B-



Dirección General de Bibliotecas UAQ

giardin restriction gene. Vet. Parasitol. 156:205–209.
- Eligio-García, L., A. Cortes-Campos, and E. Jiménez-Cardoso. 2005. Genotype of Giardia intestinalis isolates from children and dogs and its relationship to host origin. Parasitol Res. 97:1–6.
- Escobedo, A., P. ALmirall, and S. Cimerman. 2007. Actualidades en la terapéutica en giardiosis. Rev Panam Infectol. 9:41–46.
- Ey, P. L., M. Mansouri, J. Kulda, E. Nohýnková, P. T. Monis, R. H. Andrews, and G. Mayrhofer. 1997. Genetic Analysis of Giardia from Hoofed Farm Animals Reveals Artiodactyl-Specific and Potentially Zoonotic Genotypes. J. Euk. Microbiol. 44:626–635.
- Fantham, H. B., and A. Porter. 1916. The pathogenicity of Giardia (lamblia) intestinalis to men and to experimental animals. Br. Med. J. 2:139–141.
- Fantinatti, M., A. Cardoso-Caseca, A. Ribeiro-Bello, O. Fernandes, and A. M. Da-Cruz. 2018. The presence of Giardia lamblia assemblage A in dogs suggests an anthropozoonotic cycle of the parasite in Rio de Janeiro , Brazil. Infect. Genet. Evol. 65:265–269.
- Farthing, M. J. G., M. E. A. Pereira, and G. T. Keusch. 1986. Description and characterization of a surface lectin from Giardia lamblia. Infect. Immun. 51:661–667.
- Faubert, G. 2000. Immune response to Giardia duodenalis. Clin. Microbiol. Rev. 13:35–54, table of contents.
- Faust, E. C., J. S. D'Antoni, V. Odom, M. J. Miller, C. Peres, W. Sawits, L. F. Thomen, J. Tobie, and H. Walker. 1938. A Critical Study of Clinical Laboratory Technics for the Diagnosis of Protozoan Cysts and Helminth Eggs in Feces 1. Preliminary Communication. Am. J. Trop. Med. Hyg. s1-18:169–183.
- Fayer, R., M. Santín, J. M. Trout, S. DeStefano, K. Koenen, and T. Kaur. 2006. Prevalence of Microsporidia, Cryptosporidium Spp., and Giardia Spp. in Beavers (Castor Canadensis) in Massachusetts. J. Zoo Wildl. Med. 37:492–497.
- Feng, Y., and L. Xiao. 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of Giardia species and giardiasis. Clin. Microbiol. Rev. 24:110–140.
- Ford, B. 2005. The Discovery of Giardia. Microscope. 53:147–153.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

- Franzén, O., J. Jerlström-Hultqvist, E. Castro, E. Sherwood, J. Ankarklev, D. S. Reiner, D. Palm, J. O. Andersson, B. Andersson, and S. G. Svärd. 2009. Draft genome sequencing of Giardia intestinalis assemblage B isolate GS: Is human giardiasis caused by two different species? PLoS Pathog. 5:1–14.
- Fuller, R., and G. R. Gibson. 1997. Modification of the Intestinal Microflora Using Probiotics and Prebiotics. Scand. J. Gastroenterol. 32:28–31.
- Galli, S. J., S. Nakae, and M. Tsai. 2005. Mast cells in the development of adaptive immune responses. Nat. Immunol. 6:135–142.
- García-Cervantes, P. C., M. E. Báez-Flores, F. Delgado-Vargas, M. Ponce-Macotela, Y. Nawa, M. D. C. De-La-Cruz-Otero, M. N. Martínez-Gordillo, and S. P. Díaz-Camacho. 2017. Giardia duodenalis genotypes among schoolchildren and their families and pets in urban and rural areas of Sinaloa, Mexico. J. Infect. Dev. Ctries. 11:180–187.
- Geurden, T., D. Berkvens, S. Casaert, J. Vercruysse, and E. Claerebout. 2008. A Bayesian evaluation of three diagnostic assays for the detection of Giardia duodenalis in symptomatic and asymptomatic dogs. Vet. Parasitol. 157:14–20.
- Ghosh, S., M. Frisardi, R. Rogers, and J. Samuelson. 2001. How giardia swim and divide. Infect. Immun. 69:7866–7872.
- Giangaspero, A., F. Berrilli, and O. Brandonisio. 2007. Giardia and Cryptosporidium and public health: The epidemiological scenario from the Italian perspective. Parasitol. Res. 101:1169–1182.
- van der Giessen, J. W. B., A. de Vries, M. Roos, P. Wielinga, L. M. Kortbeek, and T. G. Mank. 2006. Genotyping of Giardia in Dutch patients and animals : A phylogenetic analysis of human and animal isolates. Int. J. Parasitol. 36:849–858.
- Goñi, M. P., M. Benito, J. Cieloszyk, E. Arango, D. LaPlante, M. A. Remacha, C. Seral, M. T. Fernández, L. Lafarga, and E. Rubio. 2018. The tpi Gene as a Tool for Epidemiological Studies of Giardiasis. Rev. Salud Ambient. 1:78–84.
- Hardin, J. A., A. G. Buret, M. E. Olson, M. H. Kimm, and D. G. Gall. 1997. Mast cell hyperplasia and increased macromolecular uptake in an animal model of giardiasis. J. Parasitol. 83:908–912.



Dirección General de Bibliotecas UAQ

- Harris, J., S. Plummer, and D. Lloyd. 2001. Antigiardial drugs. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57:614–619.
- Hawrelak, J. 2003. Giardiasis : Pathophysiology and Management. Altern. Med. Rev. 8:129–142.
- Hetcht, G. 1999. Innate mechanisms of epithelial host deense: spotligth on intestine. Am. J. Physiol. 277:C351–C358.
- Heyworth, M. F. 2016. Giardia duodenalis genetic assemblages and hosts. Parasite. 23:1–13.
- Hill, D. R., and R. D. Pearson. 1987. Ingestion of Giardia lamblia trophozoites by human mononuclear phagocytes. Infect. Immun. 55:3155–3161.
- Hoffman, P. S., G. Sisson, M. A. Croxen, K. Welch, W. D. Harman, N. Cremades, and M. G. Morash. 2007. Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of Helicobacter pylori, selected anaerobic bacteria and parasites, and Campylobacter jejuni. Antimicrob. Agents Chemother. 51:868–876.
- Hooshyar, H., P. Rostamkhani, M. Arbabi, and M. Delavari. 2019. Giardia lamblia infection: Review of current diagnostic strategies. Gastroenterol. Hepatol. from Bed to Bench. 12:3–12.
- Hoque, M. E., V. T. Hope, T. Kjellström, R. Scragg, and R. Lay-Yee. 2002. Risk of giardiasis in Aucklanders: A case-control study. Int. J. Infect. Dis. 6:191–197.
- Horner, D. S., R. P. Hirt, and T. M. Embley. 1999. A single eubacterial origin of eukaryotic pyruvate: ferredoxin oxidoreductase genes: implications for the evolution of anaerobic eukaryotes. Mol. Biol. Evol. 16:1280–1291.
- Horton, B., H. Bridle, C. L. Alexander, and F. Katzer. 2019. Giardia duodenalis in the UK : current knowledge of risk factors and public health implications. Parasitology. 146:413–424.
- Hussein, E. M., O. A. Ismail, A. B. Mokhtar, S. E. Mohamed, and R. M. Saad. 2017. Nested PCR targeting intergenic spacer ( IGS ) in genotyping of Giardia duodenalis isolated from symptomatic and asymptomatic infected Egyptian school children. Parasitol. Res. 116:763–771.
- Jerez-Puebla, L. E., F. A. Núñez, L. Rojas-Rivero, Y. Robau-Hernández, I.



Dirección General de Bibliotecas UAQ

Atencio-Millán, and N. Müller. 2017. Prevalence of intestinal parasites and molecular characterization of Giardia duodenalis from dogs in La Habana , Cuba. Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports. 8:107–112.

– Jerlström-Hultqvist, J., J. Ankarklev, and S. G. Svärd. 2010a. Is human giardiasis caused by two different Giardia species? Gut Microbies. 1:379–382.

– Jerlström-Hultqvist, J., O. Franzén, J. Ankarklev, F. Xu, E. Nohýnková, J. O. Andersson, S. G. Svärd, and B. Andersson. 2010b. Genome analysis and comparative genomics of a Giardia intestinalis assemblage E isolate. BMC Genomics. 11:543.

– Jiménez, J. C., J. Fontaine, J.-M. Grzych, E. Dei-Cas, and M. Capron. 2004. Systemic and Mucosal Responses to Oral Administration of Excretory and Secretory Antigens from Giardia intestinalis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11:152–160.

– Jung, H. C., L. Eckmann, S. K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska, and M. F. Kagnoff. 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. J. Clin. Invest. 95:55–65.

– Kamda, J. D., and S. M. Singer. 2009. Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent inhibition of dendritic cell interleukin-12 production by giardia lamblia. Infect. Immun. 77:685–693.

– Karanis, P., C. Kourenti, and H. Smith. 2007. Waterborne trasmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. J. Water Health. 5:1–18.

– Katagiri, S., and T. C. G. Oliveira-Sequeira. 2008. Prevalence of Dog Intestinal Parasites and Risk Perception of Zoonotic Infection by Dog Owners in Sâo Paulo State, Brazil. Zoonoses Public Health. 55:406–413.

– Khan, S. M., C. Debnath, A. K. Pramanik, L. Xiao, T. Nozaki, and S. Ganguly. 2011. Molecular evidence for zoonotic transmission of Giardia duodenalis among dairy farm workers in West Bengal, India. Vet. Parasitol. 178:342–345.

– Krause, K. H. 2004. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. In: Japanese Journal of Infectious Diseases. Vol. 57. p.



Dirección General de Bibliotecas UAQ

155–156.
- Lalle, M., A. F. di Regalbono, L. Poppi, G. Nobili, D. Tonanzi, E. Pozio, and S. M. Cacciò. 2007. A Novel Giardia duodenalis Assemblage A Subtype in Fallow Deer. J. Parasitol. 93:426–428.
- Lane, S., and D. Lloyd. 2002. Current Trends in Research into the Waterborne Parasite Giardia Current Trends in Research into the Waterborne Parasite Giardia. Crit. Rev. Microbiol. 28:123–147.
- Langford, D., M. P. Housley, M. Boes, J. Chen, M. F. Kagnoff, F. D. Gillin, and L. Eckmann. 2002. Central importance of Immunglobulin A in host defense against Giardia spp.571. Infect. Immun. 70:11–18.
- Lee, M. F., P. Cadogan, S. Eytle, S. Copeland, J. Walochnik, and J. F. Lindo. 2017. Molecular epidemiology and multilocus sequence analysis of potentially zoonotic Giardia spp . from humans and dogs in Jamaica. Parasitol Res. 116:409–414.
- Li, E., A. Zhao, T. Shea-Donohue, and S. M. Singer. 2007. Mast cell-mediated changes in smooth muscle contractility during mouse giardiasis. Infect. Immun. 75:4514–4518.
- Li, E., P. Zhou, Z. Petrin, and S. M. Singer. 2004. Mast Cell-Dependent Control of Giardia lamblia Infections in Mice Mast Cell-Dependent Control of Giardia lamblia Infections in Mice. Infect. Immun. 72:6642–6649.
- Liu, H., Y. Shen, J. Yin, Z. Yuan, Y. Jiang, Y. Xu, W. Pan, Y. Hu, and J. Cao. 2014. Prevalence and genetic characterization of Cryptosporidium, Enterocytozoon, Giardia and Cyclospora in diarrheal outpatients in china. BMC Infect. Dis. 14:1–6.
- de Lucio, A., B. Bailo, M. Aguilera, G. A. Cardona, J. C. Fernández-Crespo, and D. Carmena. 2017. No molecular epidemiological evidence supporting household transmission of zoonotic Giardia duodenalis and Cryptosporidium spp . from pet dogs and cats in the province of Álava , Northern Spain. Acta Parasitol. 170:48–56.
- Lujan, H. D. 2006. GIARDIA Y GIARDIASIS. Med. (Buenos Aires). 66:70–74.
- Luján, H. D., M. R. Mowatt, and T. E. Nash. 1997. Mechanisms of Giardia lamblia differentiation into cysts. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61:294–304.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

– Machado, M., A. M. Dinis, L. Salgueiro, J. B. A. Custódio, C. Cavaleiro, and M. C. Sousa. 2011. Anti-Giardia activity of Syzygium aromaticum essential oil and eugenol: Effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. Exp. Parasitol. 127:732–739.

– Malin, M., H. Suomalainen, M. Saxelin, and E. Isolauri. 1996. Promotion of IgA Immune Response in Patients with Crohn's Disease by Oral Bacteriotherapy with Lactobacillus GG. Ann. Nutr. Metab. 40:137–145.

– Matowicka-Karna, J., V. Dymicka-Piekarska, and H. Kemona. 2009. IFN-gamma, IL-5, IL-6 and IgE in patients infected with Giardia intestinalis. Folia Histochem. Cytobiol. 47:93–97.

– Matsubayashi, M., I. Kimata, and N. Abe. 2005. Identification of genotypes of Giardia intestinalis isolates from a human and calf in Japan. J. Vet. Med. Sci. 67:337–340.

– Mayrhofer, G., R. H. Andrews, P. L. Ey, and N. B. Chilton. 1995. Division of Giardia isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with Giardia muris. Parasitology. 111:11–17.

– McAllister, T. A., C. B. Annett, C. L. Cockwill, M. E. Olson, Y. Wang, and P. R. Cheeke. 2001. Studies on the use of Yucca schidigera to control giardiosis. Vet. Parasitol. 97:85–99.

– Mcdowall, R. M., A. S. Peregrine, E. K. Leonard, C. Lacombe, M. Lake, A. R. Rebelo, and H. Y. Cai. 2011. Evaluation of the zoonotic potential of Giardia duodenalis in fecal samples from dogs and cats in Ontario. Can. Vet. JOURNAL-REVUE Vet. Can. 52:1329–1333.

– Meloni, B. P., A. J. Lymbery, and R. C. Thompson. 1988. Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of Giardia from humans and felines. Am. J. Trop. Med. Hyg. 38:65–73.

– Meyers, J. D., H. A. Kuharic, and K. K. Holmes. 1977. Giardia lamblia infection in homosexual men. Br. J. Vener. Dis. 53:54–55.

– Miller, R. 1926. Lambliasis as a cause of chronic enteritis in children. Arch. Dis.



Dirección General de Bibliotecas UAQ

chiildhood. 93–98.

– Minvielle, M. C., N. B. Molina, D. Polverino, and J. A. Basualdo. 2008. First genotyping of Giardia lamblia from human and animal feces in Argentina, South America. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 103:98–103.

– Monis, P. T., R. H. Andrews, G. Mayrhofer, and P. L. Ey. 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan Giardia intestinalis. Mol. Biol. Evol. 16:1135–1144.

– Monis, P. T., R. H. Andrews, G. Mayrhofer, and P. L. Ey. 2003. Genetic diversity within the morphological species Giardia intestinalis and its relationship to host origin. Infect. Genet. Evol. 3:29–38.

– Müller, J., M. Sterk, A. Hemphill, and N. Müller. 2007. Characterization of Giardia lamblia WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. J. Antimicrob. Chemother. 60:280–287.

– Nash, T. E. 1997. Antigenic variation in Giardia lamblia and the host's immune response. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 352:1369–75.

– Nash, T. E. 2002. Surface Antigenic Variation in Giardia Lamblia. Mol. Microbiol. 45:357–374.

– Nash, T. E., D. A. Herrington, G. A. Losonsky, and M. M. Levine. 1987. Experimental Human Infections with Giardia lamblia. J. Infect. Dis. 156:974–984.

– Nash, T. E., and M. R. Mowatt. 1992. Characterization of a Giardia lamblia variant-specific surface protein (VSP) gene from isolate GS/M and estimation of the VSP gene repertoire size. Mol. Biochem. Parasitol. 51:219–227.

– OPS. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Tercera. Organización Panamericana de la Salud, Washington, D. C. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/165519/2/9275119936.pdf?ua=1. Consultado el 09 de mayo del 2016.

– Otero-Negrete, J. J., F. Ibarra-Velarde, M. N. Martínez-Gordillo, and M. Ponce-Macotela. 2011. Prevalencia de Giardia intestinalis y predominio de genotipos zoonóticos en ovinos y bovinos de traspatio de cinco estados de la República



Dirección General de Bibliotecas UAQ

Mexicana. Vet. Mex. 42:219–226.

– Palm, D., M. Weiland, A. G. McArthur, J. Winiecka-Krusnell, M. J. Cipriano, S. R. Birkeland, S. E. Pacocha, B. Davids, F. Gillin, E. Linder, and S. Svärd. 2005. Developmental changes in the adhesive disk during Giardia differentiation. Mol. Biochem. Parasitol. 141:199–207.

– Palm, J. E. D., M. E.-L. Weiland, W. J. Griffiths, I. Ljungström, and S. G. Svärd. 2003. Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. J. Infect. Dis. 187:1849–1859.

– Panaro, M. A., A. Cianciulli, V. Mitolo, C. I. Mitolo, A. Acquafredda, O. Brandonisio, and P. Cavallo. 2007. Caspase-dependent apoptosis of the HCT-8 epithelial cell line induced by the parasite Giardia intestinalis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 51:302–309.

– Papini, R., G. Cardini, B. Paoletti, and A. Giangaspero. 2007. Detection of Giardia assemblage a in cats in Florence, Italy. Parasitol. Res. 100:653–656.

– Pérez-Arriaga, L., M. L. Mendoza-Magaña, R. Cortés-Zárate, A. Corona-Rivera, L. Bobadilla-Morales, R. Troyo-Sanromán, and M. A. Ramírez-Herrera. 2006. Cytotoxic effect of curcumin on Giardia lamblia trophozoites. Acta Trop. 98:152–161.

– Pérez, P. F., J. Minnaard, M. Rouvet, C. Knabenhans, D. Brassart, G. L. De Antoni, and E. J. Schiffrin. 2001. Inhibition of Giardia intestinalis by Extracellular Factors from Lactobacilli: An in Vitro Study. Appl. Environ. Microbiol. 67:5037–5042.

– Ponce-Macotela, M., G. E. Peralta-Abarca, and M. N. Martínez-Gordillo. 2005. Giardia intestinalis and other zoonotic parasites: Prevalence in adult dogs from the southern part of Mexico City. Vet. Parasitol. 131:1–4.

– Potoka, D. a, J. S. Upperman, X.-R. Zhang, J. R. Kaplan, S. J. Corey, A. Grishin, R. Zamora, and H. R. Ford. 2003. Peroxynitrite inhibits enterocyte proliferation and modulates Src kinase activity in vitro. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 285:G861–G869.

– Poxleitner, M. K., M. L. Carpenter, J. J. Mancuso, C.-J. R. Wang, S. C. Dawson, and W. Z. Cande. 2008. Evidence for Karyogamy and Exchange of Genetic Material in the Binucleate Intestinal Parasite Giardia intestinalis. Science (80-. ). 319:1530–



Dirección General de Bibliotecas UAQ

1533.

– Ramesh, M. A., S.-B. Malik, and J. M. J. Logsdon. 2005. A Phylogenomic Inventory of Meiotic Genes: Evidence for Sex in Giardia and an Early Eukaryotic Origin of Meiosis. Curr. Biol. 15:185–191.

– Rodríguez, V., O. Espinosa, J. C. Carranza, S. Duque, A. Arévalo, J. A. Clavijo, D. A. Urrea, and G. A. Vallejo. 2014. Genotipos de Giardia duodenalis en muestras de niños de las guarderías del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar y de perros en Ibagué, Colombia. Biomedica. 34:271–281.

– Roxström-Lindquist, K., D. Palm, D. Reiner, E. Ringqvist, and S. G. Svärd. 2006. Giardia immunity - An update. Trends Parasitol. 22:26–31.

– Roxström-Lindquist, K., E. Ringqvist, D. Palm, and S. Svärd. 2005. Giardia lamblia-Induced Changes in Gene Expression in Differentiated Caco-2 Human Intestinal Epithelial Cells. Infect. Immun. 73:8204–8208.

– Ryan, U., and S. M. Cacciò. 2013. Zoonotic potential of Giardia. Int. J. Parasitol. 43:943–956.

– Sagolla, M. S., S. C. Dawson, J. J. Mancuso, and W. Z. Cande. 2006. Three-dimensional analysis of mitosis and cytokinesis in the binucleate parasite Giardia intestinalis. J. Cell Sci. 119:4889–4900.

– Salzman, N. H., M. A. Underwood, and C. L. Bevins. 2007. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. Semin. Immunol. 19:70–83.

– Sarti, P., P. L. Fiori, E. Forte, P. Rappelli, M. Teixeira, D. Mastronicola, G. Sanciu, A. Giuffrè, and M. Brunori. 2004. Trichomonas vaginalis degrades nitric oxide and expresses a flavorubredoxin-like protein: a new pathogenic mechanism? C. Cell. Mol. Life Sci. 61:618–623.

– Schneeman, B. O. 1999. Fiber, Inulin and Oligofructose: Similarities and Differences. J. Nutr. 129:1424–1427.

– Scorza, A. V, and M. R. Lappin. 2004. Metronidazole for the treatment of feline giardiasis. J. Feline Med. Surg. 6:157–160.

– Scott, K. G. E., J. B. Meddings, D. R. Kirk, S. P. LeesMiller, and A. G. Buret. 2002.



Dirección General de Bibliotecas UAQ

Intestinal infection with Giardia spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. Gastroenterology. 123:1179–1190.

- Scott, K. G. E., L. C. H. Yu, and A. G. Buret. 2004. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. Infect. Immun. 72:3536–3542.

- Simonato, G., A. Frangipane di Regalbono, R. Cassini, D. Traversa, C. Tessarin, A. Di Cesare, and M. Pietrobelli. 2017. Molecular detection of Giardia duodenalis and Cryptosporidium spp . in canine faecal samples contaminating public areas in Northern Italy. Parasitol Res. 116:3411–3418.

- Singer, S. M., and T. E. Nash. 2000. T-cell-dependent control of acute Giardia lamblia infections in mice. Infect. Immun. 68:170–175.

- Smith, H. V, S. M. Cacciò, N. Cook, R. A. B. Nichols, and A. Tait. 2007. Cryptosporidium and Giardia as foodborne zoonoses. Vet. Parasitol. 149:29–40.

- Solari, A. J., M. I. Rahn, A. Saura, and H. D. Lujan. 2003. A unique mechanism of nuclear division in Giardia lamblia involves components of the ventral disk and the nuclear envelope. Biocell. 27:329–346.

- Solaymani-Mohammadi, S., and S. M. Singer. 2010. Giardia duodenalis: The double-edged sword of immune responses in giardiasis. Exp. Parasitol. 126:292–297.

- Souza, S. L. P., S. M. Gennari, L. J. Richtzenhain, H. F. J. Pena, M. R. Funada, A. Cortez, F. Gregori, and R. M. Soares. 2007. Molecular identification of Giardia duodenalis isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of São Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. Vet. Parasitol. 149:258–264.

- Sprong, H., S. M. Cacciò, and J. W. B. Van Der Giessen. 2009a. Identification of zoonotic genotypes of Giardia duodenalis. PLoS Negl. Trop. Dis. 3:1–12.

- Sprong, H., S. M. Cacciò, J. W. B. Van Der Giessen, and on behalf of the Z. network and Partners. 2009b. Identification of Zoonotic Genotypes of Giardia duodenalis. PLoS Negl. Trop. Dis. 3:e558.

- Steuart, R. F. L., R. O'Handley, R. J. Lipscombe, R. A. Lock, and R. C. A.



Dirección General de Bibliotecas UAQ

Thompson. 2008. Alpha 2 giardin is an assemblage A-specific protein of human infective Giardia duodenalis. Parasitology. 135:1621–1627.

- Štrkolcová, G., M. Mad'ar, B. Hinney, M. Goldová, J. Mojžišová, and M. Halánová. 2015. Dog ' s genotype of Giardia duodenalis in human: first evidence in Europe. Acta Parasitol. 60:796–799.

- Stuart, J. M., H. J. Orr, F. G. Warburton, S. Jeyakanth, C. Pugh, I. Morris, J. Sarangi, and G. Nichols. 2003. Risk factors for sporadic giardiasis: A case-control study in Southwestern England. Emerg. Infect. Dis. 9:229–233.

- Sulaiman, I. M., R. Fayer, C. Bern, R. H. Gilman, J. M. Trout, P. M. Schantz, P. Das, A. A. Lal, and L. Xiao. 2003. Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of Giardia duodenalis. Emerg. Infect. Dis. 9:1444–1452.

- Szénási, Z., S. Marton, I. Kucsera, B. Tánczos, K. Horváth, E. Orosz, Z. Lukács, and Z. Szeidemann. 2007. Preliminary investigation of the prevalence and genotype distribution of Giardia intestinalis in dogs in Hungary. Parasitol. Res. 101:145–152.

- Téllez, A., D. Palm, M. Weiland, J. Alemán, J. Winiecka-Krusnell, E. Linder, and S. Svärd. 2005. Secretory antibodies against Giardia intestinalis in lactating Nicaraguan women. Parasite Immunol. 27:163–169.

- Tellez, A., J. Winiecka-Krusnell, M. Paniagua, and E. Linder. 2003. Antibodies in mother's milk protect children against giardiasis. Scand. J. Infect. Dis. 35:322–325.

- Teoh, D. A., D. Kamieniecki, G. Pang, and A. G. Buret. 2000. Giardia lamblia rearranges F-actin and alpha-actinin in human colonic and duodenal monolayers and reduces transepithelial electrical resistance. J. Parasitol. 86:800–806.

- Thompson, A., and P. Monis. 2012. Giardia—From Genome to Proteome. Adv. Parasitol. 78:57–95.

- Thompson, R. C. A. 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia and giardiasis. Vet. Parasitol. 126:15–35.

- Thompson, R. C. A. 2008. Giardiasis: Conceptos modernos sobre su control y tratamiento. Ann. Nestlé (Ed. española). 66:23–29.

- Thompson, R. C. A., and A. Ash. 2016. Molecular epidemiology of Giardia and



Dirección General de Bibliotecas UAQ

Cryptosporidium infections. Infect. Genet. Evol. 40:315–323.
- Thompson, R. C. A., and P. T. Monis. 2011. Taxonomy of Giardia Species. In: H. D. Lujan and S. Svard, editors. Giardia A Model of Organism. Springer Wien, New York. p. 3–15.
- Thompson, R. C. A., C. S. Palmer, and R. O'Handley. 2008. The public health and clinical significance of Giardia and Cryptosporidium in domestic animals. Vet. J. 177:18–25.
- Thompson, R. C. A., and A. Smith. 2011. Zoonotic enteric protozoa. Vet. Parasitol. 182:70–78.
- Traub, R. J., P. T. Monis, and I. D. Robertson. 2005. Molecular epidemiology: A multidisciplinary approach to understanding parasitic zoonoses. Int. J. Parasitol. 35:1295–1307.
- Troeger, H., H.-J. J. Epple, T. Schneider, U. Wahnschaffe, R. Ullrich, G.-D. Burchard, T. Jelinek, M. Zeitz, M. Fromm, and J.-D. Schulzke. 2007. Effect of chronic Giardia lamblia infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. Gut. 56:328–335.
- Trout, J. M., M. Santín, E. Greiner, and R. Fayer. 2004. Prevalence of Giardia duodenalis genotypes in pre-weaned dairy calves. Vet. Parasitol. 124:179–186.
- Tůmová, P., J. Kulda, and E. Nohýnková. 2007. Cell division of Giardia intestinalis: Assembly and disassembly of the adhesive disc, and the cytokinesis. Cell Motil. Cytoskeleton. 64:288–298.
- Tysnes, K. R., E. Skancke, and L. J. Robertson. 2014. Subclinical Giardia in dogs: A veterinary conundrum relevant to human infection. Trends Parasitol. 30:520–527.
- Uehlinger, F. D., S. J. Greenwood, J. T. McClure, G. Conboy, R. O'Handley, and H. W. Barkema. 2013. Zoonotic potential of Giardia duodenalis and Cryptosporidium spp. and prevalence of intestinal parasites in young dogs from different populations on Prince Edward Island, Canada. Vet. Parasitol. 196:509–514.
- Upcroft, P., and J. a Upcroft. 2001. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. Clin Microbiol Rev. 14:150–164.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

– Vasilopulos, R. J., L. G. Rickard, A. J. Mackin, G. T. Pharr, and C. L. Huston. 2007. Genotypic analysis of Giardia duodenalis in domestic cats. J. Vet. Intern. Med. 21:352–355.

– Vázquez-Tsuji, O., and T. Campos-Rivera. 2009. Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. Revusta del Cent. Investig. Univ. La Salle. 8:75–90.

– Vesy, C. J., and W. L. Peterson. 1999. The management of Giardiasis. Aliment. Pharmacol. Ther. 13:843–850.

– Vidal, F., J. C. Vidal, A. P. R. Gadelha, C. S. Lopes, M. G. P. Coelho, and L. H. Monteiro-Leal. 2007. Giardia lamblia: The effects of extracts and fractions from Mentha x piperita Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. Exp. Parasitol. 115:25–31.

– Villeneuve, V., F. Beugnet, and G. Bourdoiseau. 2000. Efficacy of oxfendazole for the treatment of Giardiosis in dogs. Experiments in dog breeding kennels. Parasite. 7:221–226.

– Weiland, M. E. L., A. G. McArthur, H. G. Morrison, M. L. Sogin, and S. G. Svärd. 2005. Annexin-like alpha giardins: A new cytoskeletal gene family in Giardia lamblia. Int. J. Parasitol. 35:617–626.

– Xiao, G., Z. Qiu, J. Qi, J. Chen, F. Liu, W. Liu, J. Luo, and W. Shu. 2013. Occurrence and potential health risk of Cryptosporidium and Giardia in the Three Gorges Reservoir, China. Water Res. 47:2431–2445.

– Xiao, L., and R. Fayer. 2008. Molecular characterisation of species and genotypes of Cryptosporidium and Giardia and assessment of zoonotic transmission. Int. J. Parasitol. 38:1239–1255.

– Xiao, L., K. Saeed, and R. P. Herd. 1996. Efficacy of albendazole and fenbendazole against Giardia infection in cattle. Vet. Parasitol. 61:165–170.

– Yu, L. Z., C. W. Birky, and R. D. Adam. 2002. The two nuclei of Giardia each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis. Eukaryot. Cell. 1:191–199.

– Zhou, P., E. Li, T. Shea-Donohue, and S. M. Singer. 2007. Tumour necrosis factor alpha contributes to protection against Giardia lamblia infection in mice. Parasite Immunol. 29:367–74.



Dirección General de Bibliotecas UAQ

# X. ANEXOS

Análisis de la secuenciación con el primer G376.

>B_giardin_G376_partial sequence

CGTAAGGCGCACAGATGCATGGTGACCTCCTACGAGGACGTCGTCACGAAGA
TCCAGGGCGGCCTCACAGTGTATCGCAGCAGCGTGCCTCAGAAAGTCGCAG
AGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCCGCCATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGCG
AGAGGGCCGTCAGCGCTGCCACGACAGAGGCCCTCACAAACACGAAGCTCG
TTGAGAAGTGTGTCAACGAGCAGCTCGAGAACGTCGCCTCGGAGATCCGCG
CCATCCAGGAGGAGATCGACCGCGAGAAGGCAGAGCGCAAGGAGGCAGAG
GACAAGATTGTTAACACACTCGAGGACGTCGTCTCGAAGATCCAGGGCGGCC
TCACTGTTTCAGCTGAACAGGGTATGGGCGGGGTGGCAAAGGCGTGCTTCCC
AAACAGCCAAAGAAAGTGAGAGATCCTCTCCTTAAGAATACATTTTATATGCTT
CTACTGCCGTCAATTATACCCCGATGTTTTCAAAAAGACACCACAATGCCTCT
ATTGCTAACAGCGCAACCCTAGAACCTAAAGAAGTCGCTCTTCG

**BLASTn results for the sequences obtained by PCR amplification of the *G. intestinalis β-giardin* gene (Primer G376)**

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Giardia intestinalis assemblage B isolate INI 49_53_57 beta giardin (bg) gene, partial cds | 497 | 497 | 47% | 1e-136 | 100 % | KX085488.1 |
| Giardia intestinalis assemblage B isolate INI 21_68 beta giardin (bg) gene, partial cds | 497 | 497 | 47% | 1e-136 | 100 % | KX085486.1 |
| Giardia intestinalis partial bg gene for beta giardin, isolate edr6 | 481 | 481 | 47% | 1e-131 | 98.8 % | HG425171.1 |

Análisis de la secuenciación con el primer G759.

>B_giardin_G759_partial sequence

Dirección General de Bibliotecas UAQ

TGAAGTGCGGCGCTGAGGATCTAGTCCGCTGCCTCCTTCCTGAGAGCCGCG
ATGGCGTCTTATGAGCGGGATGGCCTCAATCTGAAAGGCTTAGATCCCCAGC
TGCTCCGTGACGCACTTCTCAACGAGCTTCGTGTTTGTGAGGGCCTCCGTCG
TGGCAGCGCTGACGGCCCTCTCGCGGGCGATCGTCTCCTTCTCGATCGCGG
CGGATATGCGGGCGAAGCCCTCTGCCACTTTCTCGTTGAGCTGGGCATACAT
CTTCTTCCTCTCGGCGGTCTCCGGGGCAATGCCTGTCTCGAGGTCGTTCAGG
CTCTTGAGGGCCTCCTTCCTGAGAACCACTATGGCGCATTTATGTATTTCAGC
CAAACACGTTGTGTGCGGCAGGGCGACAGCCTCTGTCCATAACAGCCATTTA
GTGGGAAAGTTCGTGTGCTGAGACACACACTTTTTTTGCTTCTGGAGCATGTA
CTATACCGTCGTTATTTTAAAGACATAAAACCCTTCACCCCTATCGCTGAAATG
GGTACCTTAGAAAATTAATCTTTCATCCTTCGAGCTATGGAGCCTAAAACAAGA
TAGCATAAGCCGTATCAGCATCAGCGACCGAACCGAGGAAGGGGACCCCCG
CT

**BLASTn results for the sequences obtained by PCR amplification of the *G. intestinalis β-giardin* gene (Primer G759)**

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Giardia intestinalis assemblage B isolate INI 49_53_57 beta giardin (bg) gene, partial cds | 377 | 436 | 44% | 2e-100 | 94.3% | KX085488.1 |
| Giardia intestinalis assemblage B isolate INI 21_68 beta giardin (bg) gene, partial cds | 377 | 436 | 44% | 2e-100 | 94.3% | KX085486.1 |
| Giardia intestinalis clone 10 beta giardin gene, partial cds | 372 | 426 | 43% | 1e-98 | 93.9% | KR046097.1 |

Dirección General de Bibliotecas UAQ