



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología
Maestría en Ciencias en Biotecnología

**Búsqueda de un sistema de
adquisición y metabolismo del hierro
en *Giardia duodenalis*.**

TESIS

Que presenta

QFB. Leticia Cuetos Borboa

para obtener el grado de
**Maestra en Ciencias con Orientación en
Biotecnología de la Salud**

Directoras de Tesis
Dra. Claudia del Rosario León Sicaños
Dra. Nidia Maribel León Sicaños

Culiacán de Rosales, Sinaloa, México Junio 2017

PRESENTACIÓN

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Patología, Biología Celular y Molecular del Programa Regional del Noroeste para el posgrado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección de la Dra. Claudia del Rosario León Sicaños y Dra. Nidia Maribel León Sicaños. El trabajo experimental se desarrolló con fondos institucionales del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) de la Universidad Autónoma de Sinaloa, así como de la Secretaría de Educación Pública y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACYT, No. de proyecto 152772) cuyo responsable es la Dra. Claudia del Rosario León Sicaños.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Sinaloa, así como la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas por permitirme realizar esta tesis en sus instalaciones, así como al Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) de la Universidad Autónoma de Sinaloa y del fondo Secretaría de Educación Pública/Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP/CONACYT) por la beca otorgada.

A las Dras. Claudia del Rosario y Nidia Maribel León Sicairos por todo el tiempo y apoyo brindado. A mis asesores Dr. Jose Antonio Garzón Tiznado, Dr. Hector Samuel López Moreno y Dr. Adrian V. Canizales Roman.

A la MC. Laura Yuliana Plata Guzmán, por su apoyo en el análisis *in silico* para la búsqueda de IREs y proteínas de captación de hierro en *Giardia duodenalis* (laboratorios de patología, Biología celular y Molecular de la FCQB así como Unidad de investigación de la Facultad de Medicina de la UAS).

A mis compañeros del Laboratorio #19: Luz, Juan carlos, Yuliana, Liliana, Dulce, Yazmín, Marco, Francisco, Sneyder, Aurora; por todos los momentos que compartieron conmigo, así como por la información brindada.

A mis amigos de la maestría que en este viaje aprendimos mucho así como nos divertimos y estresamos al mismo tiempo, sobre todo a mis amigas Evelyn y Yuriana que siempre me apoyaron tanto en el estudio como en la vida personal.

A mi familia sobre todo a mi madre, padre, hermano, tia Martha, tio Filiberto y tio Francisco que siempre me apoyaron incondicionalmente durante toda mi vida, gracias, los amo.

A el amor de mi vida, mi esposo que siempre me apoya en todo con sus risas, regaños y amor, TE AMO con todo mi corazón.

A mi hija, el ser más hermoso y tierno de este mundo que, con su amor incondicional, siempre me alegra el día, eres mi vida, TE AMO.

ÍNDICE GENERAL

	Pág
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE CUADROS	XIII
I RESUMEN	1
ABSTRACT	3
II INTRODUCCIÓN	5
III REVISIÓN DE LITERATURA	9
A <i>GIARDIA DUODENALIS</i>	9
1. Aspectos generales	9
2. Morfología	12
3. Ciclo Biológico	15
4. Mecanismos de patogenicidad	18
a. Citoadherencia	18
b. Citotoxicidad	21
5. Evasión de la respuesta inmune del hospedero	23
6. Aspectos moleculares	24
7. Metabolismo	25
8. Control y prevención	27
9. Diagnostico	28
10. Tratamiento	30
B HIERRO	30
1. Hierro en humanos	32
2. Captación del hierro	33
3. Metabolismo del hierro	36
4. Regulación del hierro	39
5. Homeostasis del hierro en las células	42
a. Sistema tipo IRE/IRP	43
b. ARNm con estructuras IREs	46

6. Efectos del hierro en protozoarios	49
a. Hierro en <i>Giardia duodenalis</i>	50
IV JUSTIFICACIÓN	53
V HIPÓTESIS	54
VI OBJETIVOS	55
A OBJETIVO GENERAL	55
B OBJETIVOS PARTICULARES	55
VII MATERIALES Y MÉTODOS	56
A. Cultivos de <i>G. duodenalis</i>	56
B. Cinética para la medición del crecimiento de <i>G. duodenalis</i> en diferentes concentraciones de hierro	56
C. Análisis bioinformático del genoma del parásito <i>G. duodenalis</i> .	57
1. Búsqueda de proteínas que participan en la adquisición y metabolismo del hierro en el proteoma de <i>G. duodenalis</i> .	57
2. Búsqueda de estructuras tallo-burbuja en ARNm de <i>G. duodenalis</i> .	57
D. Extracción de ácidos nucleicos	58
E. Cuantificación e integridad de ácidos nucleicos	58
F. Remoción de ADN contaminante del ARN obtenido	59
G. Diseño de oligonucleotidos	59
H. Ensayos de RT-PCR	62
VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
A. Efecto del hierro sobre el crecimiento y tasa de reproducción en cultivos axénicos de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	63
B. Posibles ortólogos que participan en la adquisición y metabolismo del hierro en <i>G. duodenalis</i>	66
C. Estructuras tallo-burbuja en el ARNm de genes que codifican proteínas que participan en el metabolismo del parásito	118
D. Expresión diferencial por hierro de ARNm de <i>G. duodenalis</i>	125

con estructuras IRE-like en sus extremos UTR.

IX	CONCLUSIÓN	130
X	BIBLIOGRAFÍA	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Descripción	Pág.
Fig. 1	Morfología típica del trofozoito y quiste de <i>G. duodenalis</i>	14
Fig. 2	Ciclo biológico de <i>G. duodenalis</i>	17
Fig. 3	Interacción de <i>G. duodenalis</i> y hospedero	20
Fig. 4	Manifestación de la giardiasis	29
Fig. 5	Proteínas involucradas en la absorción del hierro	35
Fig. 6	Mecanismo de absorción intestinal de hierro	41
Fig. 7	Sistema de regulación IRE/IRP	45
Fig. 8	Elementos de respuesta al hierro (IREs)	48
Fig. 9	Efectos del hierro sobre el crecimiento de <i>G. duodenalis</i>	65
Fig. 10	Descripción de las secuencias obtenidas del proteoma de <i>G. duodenalis</i> , utilizando como sonda la secuencia de la proteína Ehhmbp45 de <i>E. histolytica</i> .	68
Fig. 11	Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp45 de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_16500 de <i>G. duodenalis</i> .	69
Fig. 12	Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp45 de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_15531 de <i>G. duodenalis</i> .	70
Fig. 13	Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp45 de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_15162 de <i>G. duodenalis</i> .	71
Fig. 14	Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp45 de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_11953 de <i>G. duodenalis</i> .	73
Fig. 15	Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp45	74

	de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_14171 de <i>G. duodenalis</i> .	
Fig. 16	Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp45 de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_10822 de <i>G. duodenalis</i> .	75
Fig. 17	Descripción de las secuencias obtenidas del proteoma de <i>G. duodenalis</i> , utilizando como sonda la secuencia de la proteína Ehhmbp26 de <i>E. histolytica</i> .	77
Fig. 18	Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp26 de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_137684 de <i>G. duodenalis</i> .	79
Fig. 19	Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp26 de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_14568 de <i>G. duodenalis</i> .	80
Fig. 20	Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp26 de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_16592 de <i>G. duodenalis</i> .	83
Fig. 21	Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp26 de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_16595 de <i>G. duodenalis</i> .	85
Fig. 22	Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp26 de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_24980 de <i>G. duodenalis</i> .	86
Fig. 23	Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp26 de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_16693 de <i>G. duodenalis</i> .	87
Fig. 24	Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp26 de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_16157 de <i>G. duodenalis</i> .	88

Fig. 25	Descripción de las secuencias obtenidas del proteoma de <i>G. duodenalis</i> utilizando como sonda la secuencia de la proteína de Rubrerythrin, putative (EHI_134810) de <i>E. histolytica</i> .	90
Fig. 26	Alineamiento en ClustalW entre la proteína Rubrerythrin, putative de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_11443 de <i>G. duodenalis</i> .	91
Fig. 27	Alineamiento en ClustalW entre la proteína Rubrerythrin, putative de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_113284 de <i>G. duodenalis</i> .	92
Fig. 28	Alineamiento en ClustalW entre la proteína Rubrerythrin, putative de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_10810 de <i>G. duodenalis</i> .	93
Fig. 29	Descripción de las secuencias obtenidas del proteoma de <i>G. duodenalis</i> , utilizando como sonda la secuencia de la proteína MTF (EHI_173950) de <i>E. histolytica</i> .	95
Fig. 30	Alineamiento en ClustalW entre la proteína MTF de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_112063 de <i>G. duodenalis</i> .	96
Fig. 31	Alineamiento en ClustalW entre la proteína MTF de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_114777 de <i>G. duodenalis</i> .	97
Fig. 32	Alineamiento en ClustalW entre la proteína MTF de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_16373 de <i>G. duodenalis</i> .	99
Fig. 33	Alineamiento en ClustalW entre la proteína MTF de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_18470 de <i>G. duodenalis</i> .	100

Fig. 34	Alineamiento en ClustalW entre la proteína “ABC transporters” de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_17132 de <i>G. duodenalis</i> .	105
Fig. 35	Alineamiento en ClustalW entre la proteína “ABC transporters” de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_115052 de <i>G. duodenalis</i> .	107
Fig. 36	Alineamiento en ClustalW entre la proteína “ABC transporters” de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_28379 de <i>G. duodenalis</i> .	109
Fig. 37	Alineamiento en ClustalW entre la proteína “ABC transporters” de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_221689 de <i>G. duodenalis</i> .	111
Fig. 38	Alineamiento en ClustalW entre la proteína “ABC transporters” de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_3470 de <i>G. duodenalis</i> .	113
Fig. 39	Alineamiento en ClustalW entre la proteína “ABC transporters” de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_16575 de <i>G. duodenalis</i> .	115
Fig. 40	Alineamiento en ClustalW entre la proteína “ABC transporters” de <i>E. histolytica</i> y la secuencia GL50803_8227 de <i>G. duodenalis</i> .	117
Fig. 41	Estructuras tallo-burbuja en ARNm’s que codifican posibles proteínas del metabolismo.	122
Fig. 42	Efecto del hierro en la expresión del gen <i>Glucosamina 6 fosfato desaminasa</i> de <i>G. duodenalis</i> .	127
Fig. 43	Efecto del hierro en la expresión del gen <i>Actina</i> de <i>G. duodenalis</i> .	128
Fig. 44	Posible mecanismo de regulación tipo IRE/IRP en <i>G. duodenalis</i> .	129

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1.	Casos por entidad federativa de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Aparato Digestivo hasta la semana epidemiológica 21 del 2017	11
2.	Hemo proteínas de <i>Giardia duodenalis</i>	38
3.	Valores hematológicos antes y después del tratamiento de 102 niños con giardiasis	52
4.	Oligonucleótidos específicos de genes de <i>G. duodenalis</i> para los ensayos de RT-PCR	61
5	Secuencias aminoácidas de <i>G. duodenalis</i> obtenidas con la sonda EHI_178050 de <i>E. histolytica</i> .	103
6	Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas del metabolismo en <i>G. duodenalis</i>	120

I. RESUMEN

Las enfermedades infecciosas han representado un gran problema económico para la humanidad, a pesar de los grandes avances de la ciencia, hasta la fecha dichas patologías continúan siendo un grave problema de salud pública a nivel mundial, tal es el caso de la parasitosis causada por *Giardia duodenalis*. Reportes recientes indican que individuos con giardiasis presentan niveles bajos de hierro sérico que se ha atribuido al proceso de malabsorción que además puede sugerir que el parásito compite por el hierro en las células del hospedero de forma similar a lo que ocurre con otros protozoarios como *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica*, en donde se ha reportado que el hierro afecta el crecimiento, los mecanismos de patogenicidad y regula la expresión de genes de virulencia, lo que sugiere la presencia de un mecanismo de regulación postranscripcional por hierro de tipo IRE/IRP (“Iron Responsive Element/Iron Regulatory Protein”). Los IREs son estructuras de tallo-burbuja conservadas que se encuentran en las regiones no traducidas (UTR); y las IRPs son proteínas citoplasmáticas que interactúan con estas estructuras en condiciones de bajo hierro promoviendo o reprimiendo la traducción dependiendo de la localización del IRE. Recientemente, mediante un análisis *in silico*, nuestro equipo de trabajo mostró la presencia de elementos de respuesta al hierro (IRE) en diferentes ARNm lo que podría sugerir la presencia del mecanismo IRE/IRP en *G. duodenalis*. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue estudiar el efecto del hierro en el crecimiento y modulación de diferentes ARNm que codifican para proteínas de captación y metabólicas del hierro en el parásito *G. duodenalis*. Para ello, se realizaron cinéticas de crecimiento del parásito en diferentes concentraciones de hierro y se determinó la viabilidad celular. Los resultados sugieren que las condiciones de bajo hierro afectan el crecimiento del parásito lo que indica que el hierro es un elemento esencial para el crecimiento y viabilidad de *G. duodenalis*. Por otra parte, mediante un análisis *in silico* se realizó la búsqueda del o los ortólogos de proteínas que capturen y

metabolizan este catión en el proteoma de *G. duodenalis* utilizando como sondas las secuencias aminoacídicas de proteínas ya reportadas en *E. histolytica*, encontrándose varias secuencias que posiblemente funcionen como proteínas de unión a hemoglobina, así como a iones metálicos como el hierro; además son proteínas citoplásmicas que participan en el transporte transmembranal así como en los procesos de óxido-reducción. Posteriormente se realizó un análisis bioinformático en búsqueda de elementos de respuesta al hierro de diferentes grupos de ARNm que codifican para proteínas del metabolismo, donde se encontraron IRE-like en diferentes ARNm. Finalmente, mediante ensayos de RT-PCR se determinó la regulación por hierro de *Glucosamina 6 fosfato desaminasa* la cual posee una estructura tipo IRE en su extremo 5' UTR mostrando una regulación positiva por hierro, mientras que el ARNm de *Actina* posee un IRE en su extremo 3' UTR, observándose una mayor expresión en trofozoitos cultivados en bajas condiciones del metal; mostrando una regulación negativa por hierro. Por lo tanto, la presencia del IRE en el 5'UTR, así como su regulación positiva, además la presencia del IRE en el extremo 3'UTR y la regulación negativa por hierro, concuerda con lo reportado para el mecanismo de regulación postranscripcional por hierro en el ser humano. Probablemente, el hecho de que *G. duodenalis* regule varios genes de acuerdo a las condiciones de hierro represente un mecanismo de regulación tipo IRE/IRP primitivo. Con lo anterior podemos sugerir que el hierro afecta el crecimiento del parásito y posiblemente su virulencia, además se muestran evidencias de un mecanismo de regulación por hierro en *Giardia duodenalis* similar al típico IRE/IRP reportado en el ser humano. El conocimiento obtenido puede ayudar a entender la patogenia del parásito para apoyar en la generación de nuevos métodos de diagnóstico y blancos farmacológicos.

ABSTRACT

The infection diseases have been a major economic problem for the humanity, despite the great advance in sciences, until now the pathologies continue to be a serious public health problem worldwide, such as the parasitic disease caused by *Giardia duodenalis*. Recent reports indicate that individuals with giardiasis have low levels of serum iron that has been attributed to the malabsorption process which may also suggest that the parasite competes for iron in host cells similar to other protozoans such as *Trichomonas vaginalis* and *Entamoeba histolytica*, where iron has been reported to affect growth, pathogenicity mechanisms and regulates the expression of virulence genes, suggesting the presence of a post-transcriptional regulation mechanism by iron IRE / IRP ("Iron Responsive Element / Iron Regulatory Protein "). IREs are conserved stem-bubble structures found in untranslated regions (UTRs); and IRPs are cytoplasmic proteins that interact with these structures under low iron conditions by promoting or repressing the translation depending on the location of the IRE. Recently, through *in silico* analysis, our research group reported the presence of iron response elements (IRE) in different mRNAs, which could suggest the presence of IRE / IRP mechanism in *G. duodenalis*. Therefore, the objective of this project was to study the effect of iron on the growth and modulation of different mRNAs coding for iron uptake and metabolic proteins in the *G. duodenalis* parasite. Thus, growth kinetics of the parasite was performed in different concentrations of iron and cell viability was determined. The results suggest that low iron conditions affect the growth of the parasite indicating that iron is an essential element for the growth and viability of *G. duodenalis*. On the other hand, by an *in silico* analysis we searched the orthologues of proteins that capture and metabolize this cation in the proteome of *G. duodenalis* using the aminoacid sequences of reported proteins in *E. histolytica*, finding several sequences with possibly acting as hemoglobin binding proteins, as well as metal ions such as iron. In addition, they are cytoplasmic proteins that participate in the transmembranal transport as well as the processes of oxide-reduction. Subsequently a bioinformatic analysis was carried out in search of elements of iron response of different groups of mRNAs coding for metabolic proteins, where IRE-like were found in different mRNAs. Finally, by RT-PCR assays the iron regulation of *Glucosamine 6 phosphate deaminase* was determined which has an IRE-like structure

at its 5' UTR showing a positive regulation by iron, whereas *Actin* mRNA has an IRE in its 3' UTR, with overexpression in trophozoites grown under low metal conditions; showing a negative regulation by iron. Therefore, the presence of the IRE in the 5' UTR, as well as its positive regulation, in addition the presence of the IRE in the 3' UTR and the negative regulation by iron, as occur in the human IRE/IRP system. Probably, the fact that *G. duodenalis* regulates several genes according to iron conditions represents a primitive IRE/IRP regulation mechanism. Thus, we can suggest that iron affects the growth of the parasite and possibly its virulence; in addition, this work shows evidence of an iron regulation mechanism in *G. duodenalis* similar to the typical IRE/IRP system. The knowledge obtained can help to understand the pathogenesis of the parasite to support the generation of new diagnostic methods and pharmacological targets.

II INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias constituyen un problema de salud pública a nivel mundial, por su alta frecuencia en países en vías de desarrollo como Asia, África y Latinoamérica, principalmente la migración de individuos provenientes de países del tercer mundo y por su alta movilidad (Maya, 2014). Las patologías gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en México y en el mundo. Las enfermedades gastrointestinales infecciosas son causadas por bacterias (principalmente *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*), parásitos (*Giardia duodenalis* y *Entamoeba histolytica*), y virus (*Rotavirus* y *virus Norwalk*) al consumir alimentos y agua contaminados con materia fecal (Cecilia y col, 2011).

Según la OMS, más de la quinta parte de la población mundial está infectada con algún protozooario o helminto y en muchos países de América Central y Sudamérica el promedio de infecciones parasitarias es de 45% de la población general. Se estima en 200 millones las personas infectadas con *Giardia duodenalis*. *Giardia duodenalis* es el agente etiológico causante de la giardiasis, esta infección presenta una distribución muy amplia con 10-15% de la población mundial infectada en promedio, siendo una de las causas más frecuentes de brotes diarreicos a nivel mundial. En México, durante la semana 21 del presente año, la Secretaria de Salud ha reportado un total de 5, 773 casos de giardiasis de los cuales 897 casos corresponden al estado de Sinaloa (Cuadro1), colocándonos en primer lugar a nivel nacional (SSA, 2017).

G. duodenalis es de gran interés biológico, ya que ocupa un punto de transición evolutiva entre los procariontes y eucariontes. Tiene dos estadios en su ciclo de vida; que constan de un trofozoíto flagelado y una forma quística. La infección es iniciada por la ingestión de quistes en alimentos o agua contaminada, seguido por la exquistación y colonización del intestino por trofozoítos causando la enfermedad. Algunos trofozoítos después se diferencian en quistes, los cuales son expulsados por las heces, completando el ciclo de vida (Carpenter y col, 2012; Que y col, 1996).

La patogénesis es un proceso multifactorial que implica la adherencia de los trofozoítos

a las células epiteliales por el disco de succión ventral, utilizando fuerzas mecánicas no específicas y/o interacciones específicas con lectinas (Lev y col, 1986) y anexinas (Weilan y col, 2003). La interacción entre el disco de succión de *G. duodenalis* y los enterocitos genera una lesión en el borde de las microvellosidades del epitelio (Erlandsen y col, 1988), que alteran el equilibrio celular iónico y produce diarrea. Así, durante este proceso ocurren una serie de eventos que permiten la interacción entre el parásito y las células epiteliales, pero se conoce poco sobre las moléculas que se expresan durante esta interacción. Algunas proteasas de tipo cisteína son liberadas por el trofozoíto (Rascón y McKerrow, 2013; Rodríguez y col, 2006), la principal función de las cisteín proteasas es en los procesos de enquistamiento y desenquistamiento (Rascón y McKerrow, 2013) pero se necesitan más estudios para entender la patogenia de este parásito. También hay un aumento de la permeabilidad intestinal causada por modificaciones en las uniones estrechas (Troeger y col, 2007; Buret y col, 2002). Los trofozoítos de *G. duodenalis* han evolucionado para colonizar un entorno adverso, por lo tanto, el parásito es capaz de modificar y manipular su entorno de ciertas maneras, tales como: la competencia por arginina para reducir la producción de óxido nítrico en las células epiteliales (Eckman y col, 2000), el contacto de *G. duodenalis* con las proteínas de superficie variables (VSP) para modular las interacciones proteínas-proteínas (Singer y col, 2001), así como la disminución zinc/hierro (Luján, 2006) y la variación antigénica para evitar el ataque inmune (Nash, 2002). Se ha demostrado que las uniones estrechas entre *G. duodenalis* y las células Caco2 inicia la modulación de expresión de genes de la respuesta inmune (Roxström-Lindquist y col, 2005)

Se ha reportado que *G. duodenalis* causa un fenómeno de malabsorción de glucosa, sodio y agua. Los trofozoítos son capaces de inducir daño citotóxico liberando proteinasas, lectinas y una posible enterotoxina de 58 kDa (Humen y col, 2011; Shant y col, 2004; Kaur y col, 2001). *G. duodenalis* necesita para su crecimiento de un gran número de nutrientes y metabolitos preformados, carece de citocromos y rutas metabólicas como las de los ácidos tricarbóxicos y de la fosforilación oxidativa por la falta de mitocondrias, sin embargo posee mitosomas que pudieran llevar a cabo una función ancestral de las mitocondrias ya que se han encontrado proteínas que realizan

el transporte de electrones a través de grupos hierro-azufre y una enzima piruvato oxidorreductasa (PFO) que junto con la ferredoxina se encargan de activar a los derivados del nitroimidazol, uno de los antiparasitarios utilizados contra este parásito (Dolezal y col, 2005; Tovar y col, 2003; Townson y col, 1996). Por otro lado, se ha reportado gran necesidad del parásito por el hierro por lo que este catión podría formar parte importante en la virulencia (Monajemzadeh y Monajemzadeh, 2008; Al-Mekhlafi y col, 2005; Olivares y col, 2004; Suchan y col, 2003) sin embargo, existen pocos estudios sobre el efecto del hierro en su crecimiento y en la modulación de genes o mecanismos de regulación.

El hierro es un catión esencial para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, incluyendo a los protozoarios. Algunos han desarrollado proteínas de unión a hemoglobina, reductasas, transportadores e incluso obtención directa del hierro a partir de lisis de células hospederas. Esta obtención del hierro es regulada para evitar toxicidad por la formación de radicales libres; como ejemplo de organismos con esta regulación en la adquisición del hierro están los protozoarios *E. histolytica* y *T. vaginalis*; donde además, el catión regula muchas de las moléculas involucradas en su adhesión hacia la célula blanco, expresión de factores de virulencia, moléculas involucradas en su crecimiento y metabolismo basal (Lee y col, 2008; Hernández-Gutiérrez y col, 2004; Hernández-Gutiérrez y col, 2003; Park y col, 2001; Álvarez-Sánchez y col, 2000). En *T. vaginalis*, nuestro grupo reportó varias proteínas reguladas por este metal y la presencia de un mecanismo regulado por hierro a nivel postranscripcional tipo IRE/IRP (Iron Responsive Element/ Iron Regulatory Proteins) similar al de eucariontes superiores (Calla-Choque y col, 2014; Torres-Romero y Arroyo, 2009; Solano-González y col, 2007). En el mecanismo IRE/IRP, las proteínas citoplásmicas reguladoras de hierro (IRP), interactúan con los IREs, los cuales son estructuras de tallo-burbuja conservadas que se encuentran en las regiones no traducidas (UTR) de los ARN mensajeros que codifican para proteínas relacionadas a la homeostasis del hierro. La unión de estos elementos puede estabilizar el ARNm o bien, reprimir la traducción de acuerdo a los niveles de hierro presente en la célula. En el parásito protozoario *G. duodenalis* existen pocos reportes sobre si el hierro puede ser metabolizado y si puede

tener un efecto en su crecimiento y patogenicidad, sin embargo, existen evidencias para hipotetizar que el hierro es esencial para estos aspectos tales como la presencia de mitosomas que contienen proteínas con grupos hierro-azufre, la presencia de deshidrogenasas dependientes de hierro, PFO, superóxido reductasa y otros ortólogos. Además, en un estudio realizado por nuestro equipo de trabajo, mediante un análisis *in silico* encontramos estructuras tallo-burbuja en ARNm de diferentes genes y estas se unen a la proteína IRP de humano lo que sugiere una regulación tipo IRE/IRP (Plata-Guzmán, 2015). Por lo tanto, pudiera ser que el hierro también juegue un papel importante en la virulencia del parásito.

III REVISIÓN DE LITERATURA

A *Giardia duodenalis*

1. Aspectos generales

G. duodenalis fue el primer protozoo humano visto en 1681 por el científico holandés Antonie Van Leeuwenhoek, quien lo observó precisamente en sus propias heces diarreicas (Bartelt y Sartor, 2015). Sin embargo, las ilustraciones de Leeuwenhoek no fueron tan claras como las del profesor Vilém Lambl. Este flagelado fue denominado inicialmente como *Cercomonas intestinalis* por Lambl en 1859; sin embargo, el parásito recibió poca atención hasta 1902, cuando el parasitólogo norteamericano Charles Wardell Stiles comenzó a sospechar una relación causal entre la infección por este flagelado y las diarreas (Cox, 2002) y propuso en 1915 una denominación nueva *G. lamblia* en honor del profesor A. Giard de Paris, y del Dr. F. Lambl de Praga (Adam, 2001; Beaver y col, 1984), perteneciendo así al Phylum Metamonada, Clase Trepomonadea, Orden Giardiida y Familia Giardiidae. Los estudios más recientes han demostrado que este parásito afecta al hombre desde tiempos prehistóricos (Ortega y Bonavia, 2003). Aunque durante mucho tiempo se pensó que era un comensal humano, no es hasta los años 60 que se comienza a conocer claramente que puede producir diarreas y malabsorción en el hombre (Cox, 2002).

El protozooario *Giardia duodenalis*, también conocido como *Giardia lamblia* o *Giardia intestinalis*, es un parásito del intestino delgado que puede causar importante morbilidad tanto en países desarrollados como en los subdesarrollados, y que afecta principalmente a niños, sobre todo en las edades de 1 a 5 años (Ali y Hill, 2003). *G. duodenalis* es la única especie que infecta a humanos, así como a otros mamíferos domésticos (Gutiérrez y col, 2015). La giardiasis presenta una distribución muy amplia con 10-15% de la población mundial infectada en promedio. Su mayor prevalencia se encuentra en zonas tropicales y subtropicales, donde afecta hasta el 30% de los adultos (Goyal y col, 2013; Said y col, 2012). El creciente interés en el estudio de la giardiasis se explica, entre otras razones, por ser una de las causas más frecuentes de brotes diarreicos a nivel mundial predominante en los niños e inmunosuprimidos y caracterizada por la producción de cuadros diarreicos agudos y crónicos, de intensidad

variable; puede complicarse originando un síndrome de malabsorción intestinal (Maya, 2014). Se ha estimado que hay cerca de 1 millón de casos de giardiasis, lo cual da como resultado 2.5 millones de muertes anualmente por enfermedad diarreica (Mark-Carew y col, 2013). En México, durante la semana 21 del presente año, la Secretaria de Salud ha reportado un total de 5, 773 casos de giardiasis de los cuales 897 casos corresponden al estado de Sinaloa (Cuadro1), colocándonos en primer lugar a nivel nacional (SSA, 2017).

Cuadro 1. Casos por entidad federativa de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Aparato Digestivo hasta la semana epidemiológica 21 del 2017

Entidad Federativa	Semana 21	Hombres	Mujeres
Aguascalientes	5	15	23
Baja california	1	11	22
Baja california Sur	-	34	29
Campeche	7	27	46
Coahuila	2	6	8
Colima	7	49	46
Chiapas	25	143	170
Chihuahua	1	42	40
Ciudad de México	12	105	138
Durango	-	10	8
Guanajuato	2	19	26
Guerrero	18	124	136
Hidalgo	7	35	53
Jalisco	9	85	63
México	24	221	279
Michoacán	1	25	34
Morelos	1	28	33
Nayarit	6	73	54
Nuevo León	11	99	115
Oaxaca	20	151	158
Puebla	9	63	74
Querétaro	4	14	15
Quintana Roo	3	39	81
San Luis Potosí	8	101	117
Sinaloa	70	423	474
Sonora	16	104	109
Tabasco	12	108	144
Tamaulipas	9	172	215
Tlaxcala	1	11	7
Veracruz	16	153	189
Yucatán	11	144	126
Zacatecas	6	55	52
TOTAL	324	2 689	3 084

FUENTE: SINAVE/DGE/Salud 2017 (SSA, 2017).

2. Morfología

El parásito *G. duodenalis* se reproduce por fisión binaria en la superficie de intestino delgado y en su ciclo biológico presenta dos estadios: trofozoíto y quiste (Figura 1).

El trofozoíto es el causante de la enfermedad y tienen la forma de “una gota lagrimal” cuando son vistos en sentido dorsal o ventral. Mide alrededor de 10 a 20 μm de largo por 5 a 15 μm de ancho. Son convexos en sentido dorsal y presentan un disco adhesivo cóncavo en su porción ventral formado por microtúbulos colocados en espiral, estos están constituidos por tubulina y giardina que se disponen siguiendo las manecillas del reloj (Díaz, 2006). Poseen cuatro pares de flagelos simétricamente, se orienta en el complejo kinetosomal. De ellos, dos son anterolaterales, que se cruzan intracitoplasmáticamente originando el quiasma y que posteriormente gira hacia atrás, dos posterolaterales, dos ventrales y un par caudal, los que tienen su origen en ocho cuerpos parabasales colocados simétricamente en la línea media, a la altura del borde superior de los núcleos. Además presentan dos axonemas, los cuales se encuentran en el interior del citoplasma dirigidos hacia atrás, y dos cuerpos medianos, estructuras centrales de microtúbulos curvados, que se encuentran situados detrás del disco adhesivo. Los trofozoítos tienen dos núcleos que son idénticos con 4 u 8 copias del genoma por núcleo, ambos ovoides y con el endosoma central bien diferenciado, este protozoo contiene cinco cromosomas y es poliploide (Adam, 2001; Beaver y col, 1984).

Los trofozoítos de *G. duodenalis* producen energía por vías anaeróbicas descendientes de la mitocondria como los mitosomas. La exposición de estas características procariotas ha llevado muchos a creer que *G. duodenalis* representa la forma de transicional entre medio de procariotas y eucariotas, de las cuales desarrollaron características eucariotas antes de la simbiosis mitocondrial (Choy y col, 2015). Loftus y col en el 2005, demostraron que puede existir una posible transferencia lateral de genes sobre todo de genes metabólicos, glicosidasas y kinasas, tomadas primordialmente de la línea bacteriana. Así mismo cuenta con un sistema organelar único que consiste en vesículas periféricas (PVs) que se coloca justo debajo de la membrana plasmática, las cuales parece proporcionar una solución en la absorción de

nutrientes por pinocitosis, la digestión y el transporte al interior de la célula (Lanfredi y col, 1998).

Los quistes de *G. duodenalis* tienen una morfología elipsoidal de 8-12 μm de largo y de 7-10 μm de ancho (Ankarklev y col, 2010). Poseen un citoplasma granular, fino, claramente separado de una pared quística de 0.3 μm de espesor adosada a la membrana plasmática del parásito. La pared del quiste es retráctil y su porción externa presenta una estructura fibrilar compuesta por proteínas (30%) y carbohidratos. El mayor componente de carbohidratos (86%) es N-acetilgalactosamina (GalNAc), aunque también están presentes pequeñas cantidades de otros azúcares (Knodler y col, 1999).

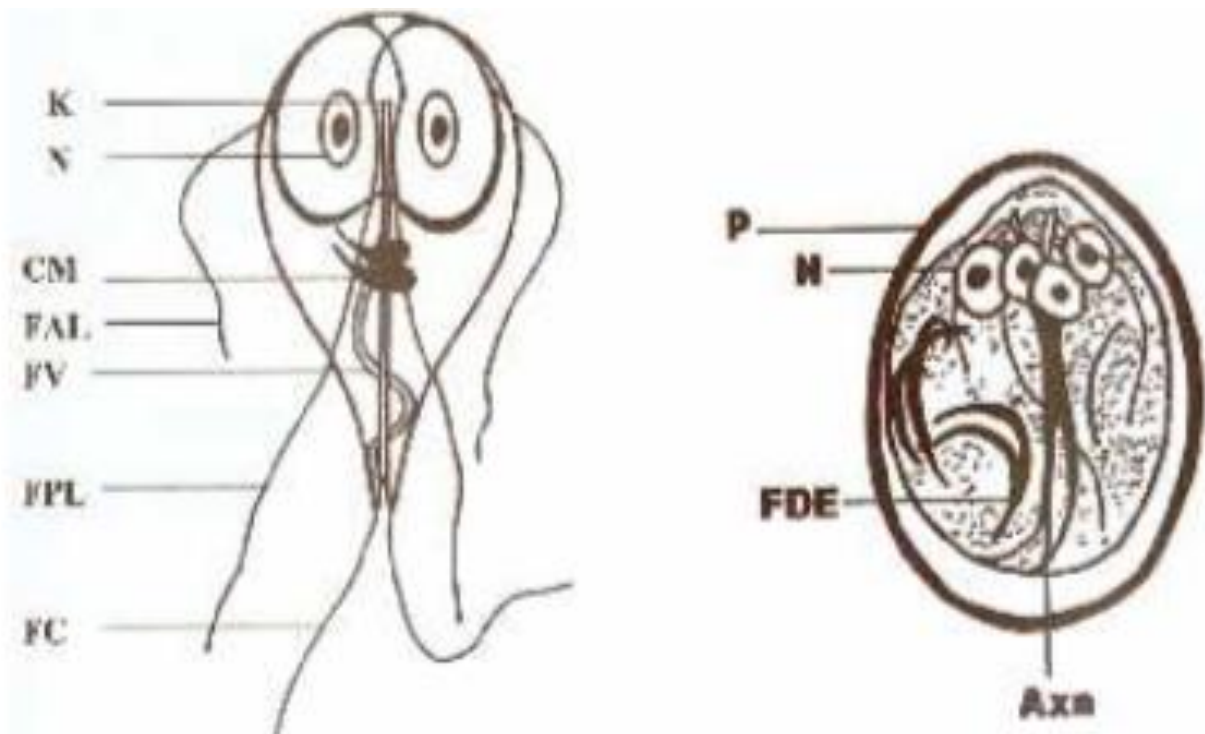


Fig 1. Morfología típica del trofozoito y quiste de *G. duodenalis*. Donde se puede observar las siguientes estructuras: trofozoito de *G. duodenalis* los kinetosomas (K), cuerpos medios (CM), fajelos antero-laterales (FAL), flagelos ventrales (FV), flagelos postero-laterales (FPL) y flagelos caudales (FC). Quiste de *G. duodenalis*, donde se puede observar la pared (P), el núcleo (N), los fragmentos del disco estriado (FDE) y los axonemas (Axn) (Díaz, 2006).

3. Ciclo Biológico

Este parásito tiene un ciclo de vida simple con dos estadios que permiten su sobrevivencia: el quiste y el trofozoíto. La entidad patogénica o vegetativa conocida como trofozoíto, se adhiere a las células del intestino ocasionando los síntomas de la giardiasis, en tanto que el quiste constituye la entidad infectiva relativamente inerte y resistente a los cambios ambientales, aunque puede ser destruido por la desecación y el calor, sin embargo, es viable en agua fría hasta por 16 días y es resistente a las concentraciones de cloro utilizadas habitualmente en los sistemas de acueductos (Beaver y col, 1984).

La infección se inicia mediante transmisión directa persona-persona y oro-fecal por la ingestión de quistes que se encuentran en agua o alimentos contaminados, cabe destacar que estudios practicados recientemente han demostrado que el hombre no es el único hospedero, al parecer, una gran variedad de mamíferos menores entre los que destacan el castor, el gato y el perro han sido infectados con quistes de *G. duodenalis* de origen humano (Maya, 2014; Rascón y McKerrow, 2013) (Figura 2). En Estados Unidos, por ejemplo, la infección es caracterizada por transmisión por el agua de temporada y brotes de guardería agrupadas. La transmisión a través de las fuentes de alimentos, como las verduras de hoja verde y bivalvos culinarios que albergan *G. duodenalis* a la vida marina y costera, también es posible (Bartelt y Sartor, 2015).

Una vez que ingresa del ambiente el parásito en estado quístico, se inicia el desenquistamiento desencadenado por la actividad de las enzimas hidrolíticas pancreáticas, quimiotripsina y tripsina, así como por el medio ácido de este órgano. Este proceso culmina en el intestino delgado del duodeno, las sales biliares a bajas concentraciones, la baja tensión de oxígeno y el bajo potencial ReDox generan las condiciones necesarias para el desenquistamiento donde se rompe la pared quística y emerge del quiste una masa tetranucleada de protoplasma denominada excizoito; a partir de un quiste se generan cuatro trofozoitos que se adhieren a las microvellosidades intestinales del duodeno y se dividen por fisión binaria, colonizando profusamente la mucosa intestinal (Humen y col, 2011).

La formación de los quistes se lleva a cabo cuando el parásito se desplaza al colon

principalmente en el yeyuno, probablemente por la acción de la bilis y lípidos disminuidos (Rascón y McKerrow, 2013). Los trofozoitos retraen los flagelos en los axonemas, el citoplasma se condensa, y se excretan las proteínas que van a constituir el exoquiste. El proceso de enquistamiento suele durar unas 16 horas y contiene dos fases morfológicas. La primera se inicia con la aparición de una serie de protusiones en la superficie, donde los antígenos del quiste empiezan a hacerse presentes y donde una especie de cubiertas glicoproteica, de unos 100nm de diámetro, comienzan a cubrir toda la superficie del parásito, incluyendo el disco succionario. Esta especie de “capuchones” parecen estar conectados con los microfilamentos del citoesqueleto (Díaz, 2006). Se ha caracterizado y clonado una proteína de *G. duodenalis* que parece estar relacionada en numerosos procesos celulares, entre los que destaca su implicación sobre el enquistamiento de los trofozoítos, esta enzima es una proteinquinasa C, y posee varias isoformas (beta, delta, epsilon, theta y zeta) (Díaz, 2006).

Los quistes son expulsados por el huésped y permanecen en estado de latencia en el medio ambiente. Debido a las características, particularmente de la pared del quiste, puede sobrevivir en el medio externo aún y cuando se presentan variaciones drásticas de pH (Bartelt y Sartor, 2015). Asimismo, la eficiencia de la transmisión de *G. duodenalis* depende en forma decisiva de la formación adecuada de esta estructura.

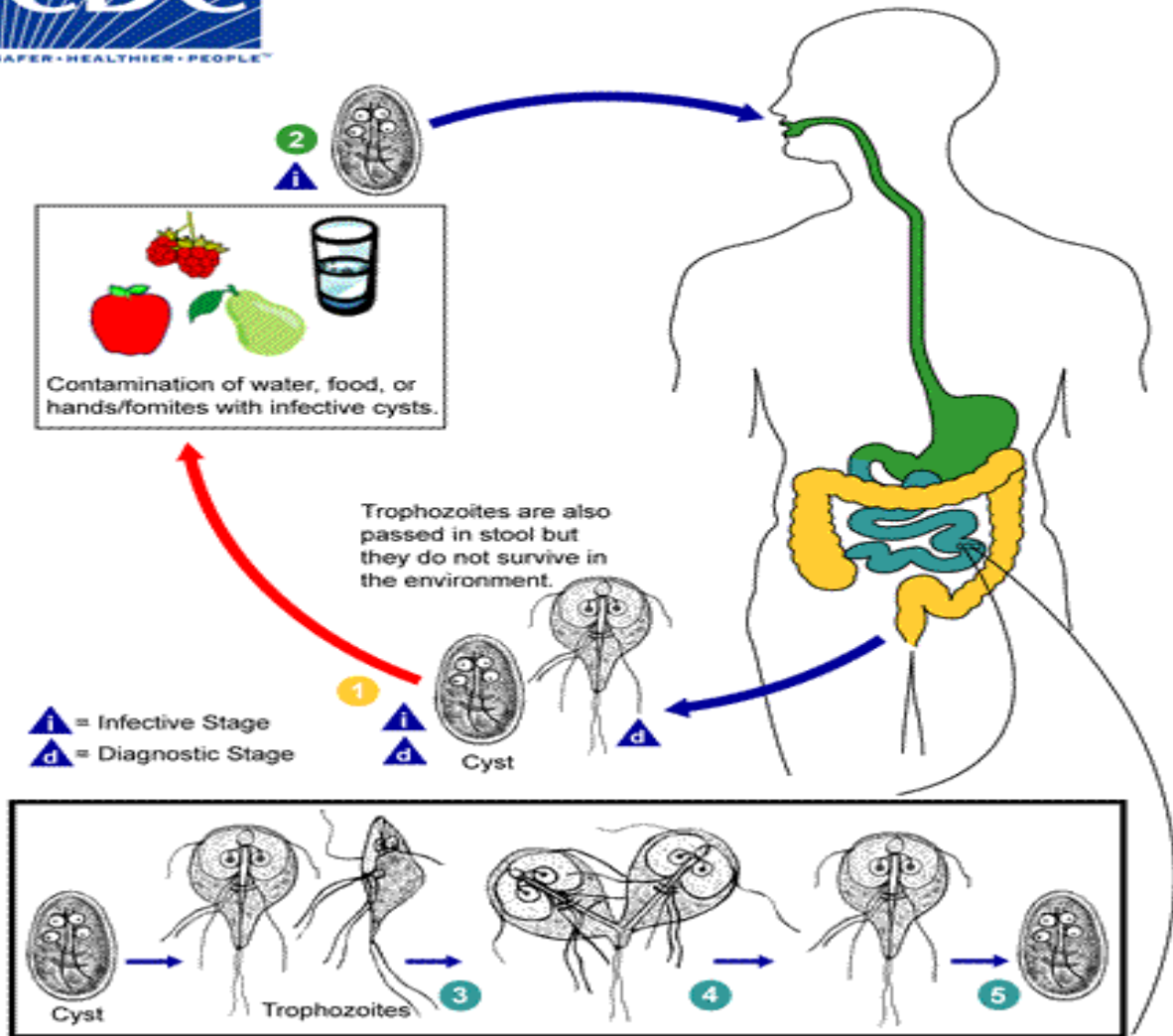


Fig 2. Ciclo biológico de *G. duodenalis*. El parásito *G. duodenalis* tiene dos estadios en su ciclo de vida: trofozoíto flagelado y quiste. (2) Los alimentos y agua contaminada con *G. duodenalis* son la fuente de infección de este parásito. (1) En su forma infectante, éste se presenta en forma de quistes, (3) Este quiste luego es ingerido por el hospedador y en el intestino pasa a su fase de trofozoíto. (5) El parásito es liberado en fase de trofozoíto o de quiste por las heces. Es ahí cuando *G. duodenalis* puede encontrarse en suelos, aguas y alimentos contaminados, capaz de infectar nuevamente a otros organismos. (4) *G. duodenalis* se reproduce mediante fisión binaria, o bipartición (CDC, 2017).

4. Mecanismos de Patogenicidad

Se conoce la estrecha relación entre el hierro y la virulencia de ciertos microorganismos. Estudios han comprobado que los patógenos desarrollan mecanismos de captación de hierro para reproducirse y causar infecciones. Una de estas estrategias es utilizar enzimas que inducen la proteólisis de glucoproteínas de transporte, otras es reducir los compuestos del hierro a forma ferrosa o producir sideróforos. El hierro se libera al torrente sanguíneo, donde se une a receptores específicos en la superficie de la membrana celular de los microorganismos y se internaliza (Del Castillo-Rueda y Khosravi-Shahi, 2010).

Estudios parecen mostrar, de manera “*in vitro*”, que *G. duodenalis* contiene una proteína rica en cisteína llamada CRP136, cuyo gen que la codifica posee una homología del 57% con el gen de la sarafotoxina, péptico tóxico, vaso activo, producido por la serpiente *Atractaspis engaddensis*. La ingesta oral de dicha toxina, induce una sintomatología parecida a la de los humanos infectados agudamente con *G. duodenalis*. La CRP136, constituiría por tanto la primera evidencia de la existencia de una toxina encontrada en *G. duodenalis* (Chen y col, 1995).

a. Citoadherencia

La patogénesis de *G. duodenalis* es un proceso multifactorial que comienza con la adhesión del parásito hacia los enterocitos del duodeno y la primera porción del yeyuno, en un medio con pH entre 6.8-7.2. La adhesión de los trofozoítos al epitelio intestinal es a través de un disco adhesivo y con la ayuda de receptores específicos como las α -giardinas las cuales son proteínas relacionadas a las anexinas y son altamente inmunogénicas que establecen “interacciones receptor-ligando” y alteran de este modo la topografía de los enterocitos, puesto que acortan la longitud de las microvellosidades. También estas α -giardinas están relacionadas con el montaje y desmontaje del citoesqueleto que marca la transición de trofozoítos infecciosos a quiste (Yoshida y col, 2011).

Por otro lado, estudios realizados por Sousa y Poiaraes-da en el 2001, encontraron esta unión entre el trofozoito y enterocito produciéndose una combinación de fuerzas mecánicas e hidrodinámicas. Se ha descrito la existencia de una lectina en la superficie

de *G. duodenalis* con especificidad para los residuos D-galactosa y D-manosa presentes en la superficie de los enterocitos, que actuarían como receptores de esta familia.

Se han propuesto diferentes mecanismos posibles de adhesión de este parásito: A) la **fuerza de succión** generada por debajo del disco ventral por movimientos propulsivos del flagelo ventral; B) **Procesos mecánicos** relacionados con proteínas contráctiles del disco ventral y del fleco ventrolateral (Yoshida y col, 2011; Peattie, 1990; Crossley y Holberton, 1983); en el disco ventral se encuentra la proteína tubulina, la cual es la proteína principal del disco entre otras proteínas contráctiles son la actina, alfa actina, miosina y tropomiosina que forman la cresta lateral del parásito C) Participación de **moléculas de superficie** que permiten la unión del trofozoíto a receptores en las células epiteliales del hospedero (Figura 3) (Pegado y de Souza, 1994). Hay pocos estudios acerca de cómo *G. duodenalis* causa la enfermedad, sin embargo la idea más aceptada es que la sintomatología ocasionada es debida a un acortamiento del borde en cepillo de las microvellosidades del epitelio, la cual representa un factor clave en la producción de las enfermedades diarreicas a través de malabsorción y mala digestión (Danquah y col, 2014; Halliez y Buret, 2013; Chávez y col, 1986; Gillon, 1984).

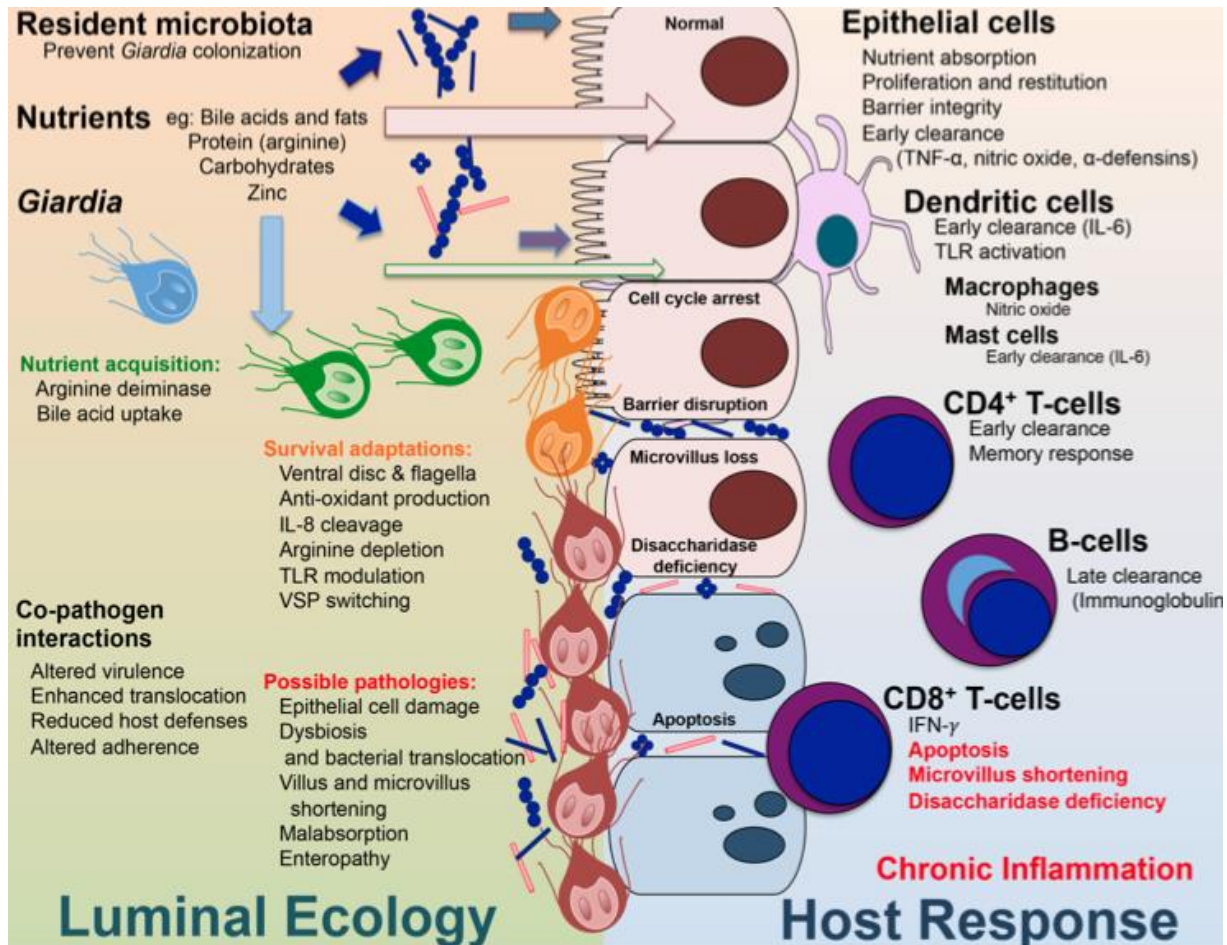


Fig 3. Interacción de *G. duodenalis* y hospedero. Microbiota (izquierda), Respuestas del hospedero (derecha) (Bartelt y Sartor, 2015).

b. Citotoxicidad

Diferentes estudios, en los cuales se han utilizado parásitos de pacientes con sintomatología de giardiasis, han establecido que *G. duodenalis* causa un fenómeno de malabsorción de glucosa, sodio y agua, así como una reducción en la actividad de la disacaridasa debido a la pérdida de la superficie absorbente del epitelio intestinal (Halliez y Buret, 2013; Cotton y col, 2011; Gascón, 2006; Müller y Von, 2005; Buret y col, 2002). Además, debido a este fenómeno de malabsorción, se observa una hipersecreción de cloro y electrolitos que provoca acumulación de fluidos en el lumen de intestino durante la infección crónica (Cotton y col, 2011; Troeger y col, 2007). Asimismo, se ha descrito la reducción y distorsión del borde de las microvellosidades, aumento en el índice mitótico de las células de las criptas epiteliales e interferencia en el metabolismo de sales y ácidos biliares (Halliday y col, 1988).

Pareciera existir una relación directa entre la magnitud del daño microscópico del intestino y la intensidad de la sintomatología. Si la infección es asintomática, el daño histológico es mínimo; pero en casos severos con malabsorción, se observa al microscopio óptico una configuración anormal de las vellosidades intestinales y bajo microscopía electrónica se describen alteraciones del enterocito tanto a nivel de las microvellosidades como del citoplasma. Las microvellosidades aparecen achatadas, engrosadas o emergiendo unas de otras. En el citoplasma, se presentan alteraciones evidentes que se manifiestan por un gran número de vacuolas, traduciendo un daño celular. El enterocito afectado de este modo, es eliminado al lumen intestinal, con lo que se acelera el recambio celular y la repoblación con células predominantemente inmaduras desde el punto de vista enzimático y de transporte. Estos hechos conducirían a un síndrome de malabsorción que afecta a lípidos, carbohidratos y aminoácidos (Halliez y Buret, 2013).

Recientemente se confirmó que el daño del enterocito explica la disminución de la actividad trípica, quimiotrípica, lipásica y fosfolipásica en pacientes con giardiasis, que mejoran después del tratamiento específico (Maya, 2014). Se han descrito las lesiones del borde en cepillo y las deficiencias de disacaridasas yeyunales (lactasa, sacarasa y maltasa) en pacientes con giardiasis, éstas son dependientes de la presencia de

linfocitos CD8+ (Halliez y Buret, 2013; Scott y col, 2004) y que un número incrementado de linfocitos intraepiteliales están íntimamente relacionados con el proceso de malabsorción durante la infección por *G. duodenalis* (Gascón, 2006.; Müller y Von, 2005; Buret y col, 2002). Aunado a esto, se ha observado que los trofozoítos de *G. duodenalis* son capaces de alterar la barrera epitelial incrementando la permeabilidad de los enterocitos principalmente a través de la ruptura de las uniones estrechas, producir modificaciones en el citoesqueleto de las células epiteliales, así como la inducción de la apoptosis de dichas células (Buret, 2007; Troeger y col, 2007).

Se ha planteado que el principal mecanismo por el cual los trofozoítos de *G. duodenalis* son capaces de inducir un daño citotóxico es a través de la liberación de proteinasas, lectinas e incluso se ha propuesto la presencia de una “enterotoxina” de 58 kDa que es secretada y en conjunto son responsables directos del daño ocasionado en el borde de las microvellosidades produciendo diarrea y malabsorción de vitaminas A, B12, D-xilosa, zinc, lactosa y **hierro** (Humen y col, 2011; Shant y col, 2004; Kaur y col, 2001).

Algunas proteasas de tipo cisteína son liberadas por el trofozoíto, el transcrito de la cisteín proteasa 2 (*CP2*) se sobreexpresa en las etapas vegetativa y de enquistamiento de los trofozoitos. La *CP2* participa en la degradación de proteínas de la pared quística y se encuentra localizada en vesículas específicas para el enquistamiento; dichas vesículas contienen los materiales precursores necesarios para la formación de la pared del quiste (Rascón y McKerrow, 2013). La actividad atribuida a otras proteasas se ha observado en cultivos de *G. duodenalis* e independientemente del análisis del genoma se ha confirmado la presencia de serina, treonina, metalo, aspártico y aminopeptidasas. Sin embargo, sólo dos proteasas han sido caracterizadas parcialmente en *G. duodenalis*; la dipeptidil peptidasa IV (*DPP IV*) (Rascón y McKerrow, 2013) y la proproteína convertasa subtilisina (*GSPC*) (Rascón y McKerrow, 2013), ambas son proteasas de serina que se encuentran implicadas en los procesos de enquistamiento (*DPP IV* y *GSPC*) y desenquistamiento (*GSPC*).

5. Evasión de la respuesta inmune del hospedero

Para sobrevivir dentro del hospedador y evadir la respuesta inmune, *G. duodenalis* manifiesta lo que se conoce como variación antigénica. Los trofozoítos se encuentran recubiertos de una determinada proteína de superficie que forma una verdadera interfaz entre el parásito y el medio, y que pertenece a una familia de proteínas denominadas proteínas variables de superficie (*Variant-Specific Surface Protein, VSPs*). *G. duodenalis* contiene en su genoma un repertorio de entre 150 a 200 genes que codifican estas proteínas, pero solamente una VSP se expresa en la superficie de los trofozoítos en un momento dado. Estas proteínas, a pesar de ser antigénicamente diferentes entre sí y ser heterogéneas en lo que respecta a su tamaño molecular, poseen un dominio transmembrana altamente conservado y una porción carboxilo-terminal citosólica compuesta por sólo cinco aminoácidos (CRGKA). Su región N-terminal es altamente variable (dándole a cada una de estas proteínas la característica de ser antigénicamente diferente), pero todas son ricas en cisteína (~12%), incluyendo una alta incidencia del motivo CXXC (donde X representa cualquier aminoácido). (Luján, 2006).

G. duodenalis posee proteasas que destruyen a la IgA modificando la respuesta inmune, con lo que se ven favorecidos los procesos infecciosos a nivel de mucosas.

El hospedero tiene mecanismos efectores a nivel de mucosas como lo son productos antimicrobianos, sintetizados por células epiteliales, como lo es el Óxido Nítrico (NO) que presenta una actividad amplia contra bacterias y parásitos. Dichas actividades están relacionadas con la neurotransmisión y regulación de la integridad de la barrera mucosal en el intestino, evitando el desarrollo de los trofozoítos e inhibiendo la enquistación y desenquistación del parásito, son eliminarlos. Los mecanismos celulares inespecíficos relacionados con el control de la giardiasis están gobernados por la secreción de moléculas relacionadas con procesos inflamatorios y de hipersensibilidad llamadas interleucinas (Bartelt y Sartor, 2015). Estas moléculas, han sido relacionadas con procesos inflamatorios y de diferenciación de linfocitos B, como lo es la interleucina 6 (IL-6), que es un homodímero cuyo tamaño es de 19-26 kDa y es considerada como una proteína multifuncional que se produce por un gran número de células, incluyendo

linfocitos T y macrófagos. Se ha estudiado la capacidad inflamatoria de *G. duodenalis* en el hospedero y la relación que se presenta con algunas proteínas indicadoras de procesos inflamatorios como lo es el factor de necrosis tisular (TNF). Esta proteína es un homotrímero de 51 kDa producido principalmente por linfocitos T y macrófagos. En el caso de la giardiasis, se ha encontrado que TNF juega un rol importante en el control de la enfermedad (Bartelt y Sartor, 2015). Otro mecanismo de defensa del hospedero es la lisis de trofozoítos por la vía clásica del complemento, se efectuaría en presencia de isotipos IgM. Tanto los anticuerpos del tipo IgG como IgM se sugiere que altera la adherencia y fagocitosis de los trofozoítos por macrófagos y células mononucleadas en ratas, a lo que se suma una disminución de la adherencia al epitelio (Maya, 2014). El principal mecanismo de defensa contra los protozoos que sobreviven en el interior de los macrófagos es la inmunidad celular, en especial la activación de los macrófagos por las citocinas sintetizadas por los linfocitos T_H1 (Abul y col, 2008).

6. Aspectos moleculares

G. duodenalis, al igual que los otros organismos amitocondriados, como *T. vaginalis* y *E. histolytica*, recibe gran interés debido a su infectividad. Aunque las posiciones evolutivas exactas de estos protozoarios permanece incierta, existen evidencias considerables que los ubican en una posición muy cercana en la evolución (Vanacova y col, 2003).

Actualmente, se cuenta el borrador de la secuencia del genoma de *G. duodenalis*, el cual tiene un tamaño aproximado de 12 Mbp (Franzén y col, 2013; Jex y col, 2013). El trofozoíto de *G. duodenalis* es inusual ya que contiene dos núcleos de igual tamaño y morfológicamente indistinguibles. Estos dos núcleos contienen la misma cantidad de ADN y ambos son transcripcionalmente activos. Los trofozoítos parecen ser tetra haploides con el ADN arreglado en cinco cromosomas. El contenido de G+C es de 42-49% (Prucca y Lujan, 2009; Vanacova y col, 2003).

Las regiones promotoras de este parásito parecen ser muy compactas y sus regiones intergénicas son muy cortas (a veces menos que 250 pb). Este parásito contiene las regiones no traducidas más cortas reportadas (1-6 nt). Sin embargo, estas regiones poseen todos los elementos requeridos para la regulación transcripcional, los cuales

son ricos en A+T. El elemento iniciador de este parásito consta de 8-11 nt (ATTAAAA en la posición -30), con sus variantes. Una A en el medio de la secuencia rica en A-T podría ser el mejor sitio de inicio de la transcripción (Tolba y col, 2013). Resulta interesante saber cómo *G. duodenalis* regula sus genes debido a la aparente limitada secuencia de sus regiones promotoras. Los genes de *G. duodenalis* no poseen estructura CAP en su 5'-UTR por lo que se sugiere que una secuencia corta de 6 nt podría actuar como sitio de anclaje de los ribosomas para la síntesis de proteínas. Por otra parte, la posible señal de poliadenilación se encuentra 20-30 nt río debajo de codón de paro (AGTPuAApy) (Vanacova y col, 2003). A la fecha poco se sabe sobre la regulación de este parásito aún cuando se tiene casi completa la secuencia de su genoma.

El genoma de *G. duodenalis* ha sido secuenciado y se informó en 2007, que este parásito tiene capacidad limitada o ninguna para sintetizar *de novo* la mayoría de los nutrimentos, tales como aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos (Morrison y col, 2007). En el metabolismo de los ácido grasos, *G. duodenalis* carece de ambas rutas sintéticas tipos I y II, y por lo tanto depende del suministro de los ácidos grasos del hospedero. Esta idea es apoyada también por principios de análisis bioquímico de este parásito. Este protozoo anaerobio conserva la capacidad de extensión de acilo limitado por poseer uno o más genes de elongación (ELO). Congruente con su estilo de vida anaerobia, *G. duodenalis* también carece de enzimas para la degradación de los ácidos grasos y la β -oxidación. Los ácidos grasos rescatados de los anfitriones se activa por primera vez por la acil-CoA sintetasa (ACS, aka. FA-CoA ligasa, ACL) para formar acil-CoA reductasa (FA-CoA) tioésteres antes de poder entrar a las vías metabólicas posteriores, como elongación de ácidos grasos, síntesis de lípidos y biomembranas. Por lo tanto, la orientación acil-CoA sintetasa puede bloquear todo el metabolismo de ácidos grasos, matando así al parásito (Gou y col, 2015).

7. Metabolismo

El hábitat de este protozoo es el intestino delgado, en su porción proximal: duodeno y segmentos altos del yeyuno. La forma vegetativa o trofozoíto, se encuentra en grandes cantidades en la superficie del epitelio intestinal, en el tercio basal de las vellosidades y

en el moco que recubre la pared. Dado que el duodeno es el primer punto de absorción de los alimentos, por ser la región inmediata al estómago y recibir enzimas del páncreas y bilis del hígado, se postula la predilección de los trofozoítos de *G. duodenalis* por esta región sugiere que requieren una alta concentración de nutrientes para su supervivencia y proliferación, especialmente de los nutrientes que el parásito no es capaz de sintetizar de *novo* (Yichoy y col, 2011; Hernández y col. 2007). En ausencia completa de oxígeno, los trofozoítos de *G. duodenalis* metabolizan la glucosa hasta etanol o alanina, mientras que a concentraciones sub-tóxicas de oxígeno, los productos finales son CO₂ y acetato (Maya, 2014).

El metabolismo energético de *G. duodenalis* es del tipo “fementador”, la principal fuente de energía es la glucosa, sus oligómeros y polímeros siendo los productos finales del metabolismo energético los ácidos orgánicos, etanol y CO₂ (Maya, 2014). Así mismo está ligado al metabolismo de algunos aminoácidos, entre los que se encuentra la Arginina que constituye uno de sus principales fuentes de energía y la Alanina como producto final del metabolismo en su ambiente natural. Los trofozoítos poseen un mecanismo de transporte para captar la Alanina, a pesar de que pueden producirla desde piruvato, mediante la enzima alanin amino-transferasa (Humen y col, 2011; Ringqvist y col, 2008).

En lo que se refiere a los lípidos, los trofozoítos de *G. duodenalis* requieren de lípidos y sales presente en la bilis, como son el colesterol, fosfatidilcolina, glicolato y glicoldesoxicolato, importantes para su mantenimiento y crecimiento en cultivos axénicos (Humen y col, 2011; Yichoy y col, 2011). Los ácidos grasos que mayoritariamente se encuentran en *G. duodenalis* son palmítico y esteárico como ácidos grasos saturados, y oleico y linoleico como insaturados. Se ha descrito la presencia de la enzima “ácido graso desaturasa”, capaz de introducir dobles enlaces en los ácidos grasos que incorpora. Estos ácidos grasos saturados, transformados por la enzima, son incorporados entre los fosfolípidos de membrana, así como en ácidos grasos citosólicos. De este modo, *G. duodenalis* es capaz de remodelar los ácidos grasos que captura (Humen y col, 2011; Diaz y col, 2003).

Se ha observado que *G. duodenalis* necesita para su crecimiento de un gran número de nutrimentos y metabolitos preformados como carbohidratos, aminoácidos, purinas,

pirimidinas, ácidos grasos y esteroides, esto se debe a que carecen de citocromos y de las rutas metabólicas principales como la de los ácidos tricarbónicos y de la fosforilación oxidativa por la carencia de mitocondrias. Sin embargo, se ha reportado la presencia de unas estructuras llamadas mitosomas que podrían llevar a cabo una función ancestral de las mitocondrias ya que se han encontrado proteínas que realizan transporte de electrones y una enzima tipo piruvato ferredoxina oxidorreductasa (PFO) (Dolezal y col, 2005; Townson y col, 1996). Las proteínas que se han localizado en los mitosomas son principalmente proteínas involucradas en reacciones oxido-reducción a través de grupos hierro-azufre y proteínas involucradas en la formación precisamente de estos grupos hierro-azufre, como la ferredoxina que junto con la PFO se encargan de activar a los derivados de nitroimidazol, que son los antiparasitarios más utilizados contra *G. duodenalis* (Bartelt y Sartor, 2015), teniendo el papel central el pirofosfato inorgánico como donante de fosfato en vez del ATP: la producción de fructosa-1,6-bisfosfato y producción de piruvato a partir de fosfoenolpiruvato (PEP). Un hito metabólico importante consiste en la descarboxilación oxidativa de piruvato hacia acetil-CoA, catalizado por la piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, donde la fracción de ferredoxina funciona como aceptor de electrones (Maya, 2014).

8. Control y prevención

La estrategia básica para el control de la transmisión de *G. duodenalis* se basa en prevenir o reducir la exposición a las heces infectivas. Hay que tener en cuenta que en zonas endémicas, el papel de la transmisión persona a persona puede ser muy importante y las medidas de control deben ir dirigidas a interrumpir este ciclo de transmisión. Son muy importantes la educación sanitaria para promover la higiene personal, el suministro de agua potable segura y la efectiva deposición de excretas (Ortega y Adam, 1997). La importancia de los animales como perros, ganado, castores y ratas; como reservorios de *G. duodenalis* puede potencialmente infectar humanos, también es efectivo para la detección, diferenciación y taxonomía de *G. duodenalis*. Los trabajadores de las guarderías infantiles o instituciones deben hacer buen uso de técnicas higiénicas y de lavado de manos cuando pasan de niño en niño o de paciente a otro. Igualmente, las prácticas sexuales con precaución pueden disminuir el riesgo de

contraer o diseminar las giardiasis (Procop, 2001).

9. Diagnóstico

Los síntomas se desarrollan, después de un periodo de incubación de 6 a 15 días que precede a menudo la detección de parásitos en las heces. El tipo de diarrea con experiencia en la giardiasis es clásicamente grasienta y maloliente (esteatorrea) con los resultados de la mala absorción de vitaminas A y B12, d-xilosa, hierro y zinc, así como la deficiencia de lactasa en 20-40% de los casos sintomáticos (Bartelt y Sartor, 2015).

Los síntomas característicos de la giardiasis son: calambres y distensión abdominal, diarrea malabsorción (esteatorrea) y pérdida de peso. Además, por razones poco claras, se presentan secuelas crónicas, incluyendo el síndrome post-infeccioso del intestino irritable, fatiga crónica, desnutrición, deterioro cognitivo, y las manifestaciones extra-intestinales (tales como alergia a los alimentos, urticaria, artritis y manifestaciones oculares inflamatorias) (Figura 4) se pueden desarrollar y posiblemente persistirán más allá de parásitos detectables vertimiento (Bartelt y Sartor, 2015).

Se confirma con el examen parasitológico seriado de deposiciones, en donde se encuentran quistes de *G. duodenalis* (Maya, 2014). Aunque el examen microscópico de las heces es el método más práctico y efectivo para establecer la presencia de la infección en el hombre, la eliminación de quistes puede ser intermitente, lo que pudiera llevar a falsos negativos. Por esta razón, es importante la realización de exámenes seriados con el fin de aumentar la sensibilidad (Procop, 2001; Ortega y Adam, 1997). El empleo de métodos parasitológicos de concentración como el método de Ritchie (formol-éter/acetato de etilo) o el de Faust (sulfato de zinc) aumenta considerablemente la sensibilidad del examen parasitológico; sin embargo, el uso de procedimientos de preservación de las heces con formalina pudiera afectar la flotabilidad de los quistes en algunos métodos parasitológicos como el de concentración por sacarosa (Moitinho y col, 1999).

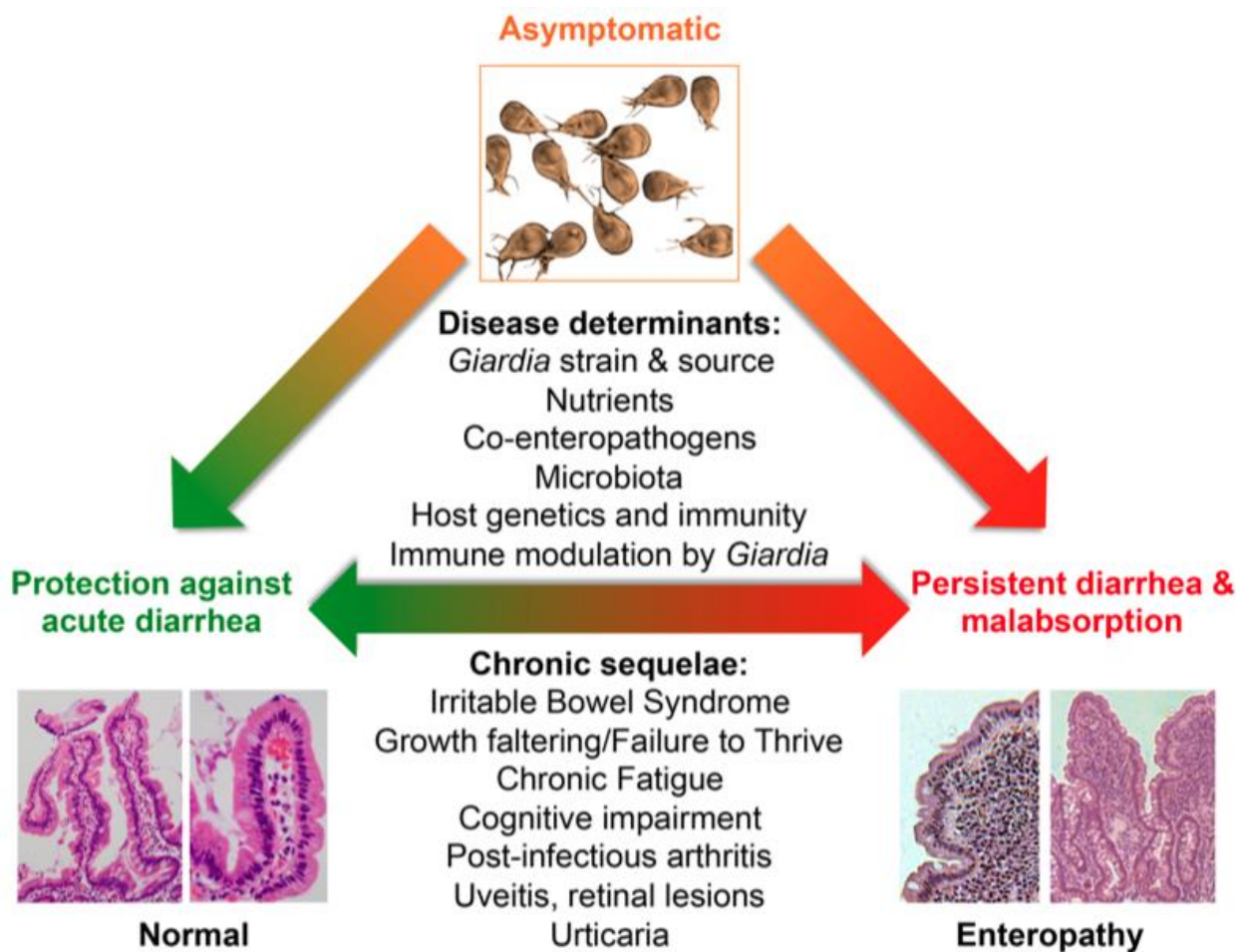


Fig 4. Manifestación de la giardiasis. Los cambios histológicos varían de histopatología normal (abajo a la izquierda) al acortamiento de las vellosidades e inflamación crónica (enteropatía) (abajo a la derecha). Imagen cortesía de Joel Mancuso y Scott Dawson. Imágenes de biopsias de intestino delgado de pacientes Guerin y Jörg con giardiasis mostrando normal (izquierdo) y anormal (derecha) (Bartelt y Sartor, 2015).

10. Tratamiento

Si no hay síntomas o éstos son leves, posiblemente no se necesite ningún tratamiento. Algunas infecciones desaparecen por sí solas al cabo de unas semanas. En la mayoría de las mujeres embarazadas, el tratamiento no debe comenzar hasta después del parto, puesto que algunos fármacos utilizados para tratar la infección pueden ser dañinos para el feto (Ortega y Adam, 1997).

Los medicamentos para el tratamiento de la giardiasis están disponibles, pero las opciones son limitadas (por ejemplo, metronidazol, tinidazol, albendazol y nitazoxanida). Estos medicamentos no son 100% eficaces y pueden ser inadecuados para algunos pacientes debido a la toxicidad. La resistencia a los medicamentos también es un problema emergente. Por lo tanto, se necesitan medicamentos nuevos o alternativos, sobre todo si la infección masiva ocurre en condiciones naturales o de origen humano (Guo y col, 2015). La ingestión adicional de probióticos pudiera ayudar en la eliminación de la infección, al interferir en el crecimiento de la infección por *G. duodenalis* a través de diferentes mecanismos que incluyen la competencia por los sitios limitados de adherencia y nutrientes como la glucosa los que pudieran ser utilizados por otros patógenos (Vanderhoof, 1998); además de la estimulación de la respuesta inmune (Pierangeli y col, 2003).

B HIERRO

El hierro (Fe), un oligoelemento importante, juega un papel vital en el metabolismo del oxígeno, consumo de oxígeno, el transporte de electrones en la mitocondria, el metabolismo energético, la función muscular y la hematopoyesis. Este catión tiene dos estados de oxidación relevantes para sus funciones biológicas: ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}); al paso reversible de uno al otro se debe su capacidad de participar en reacciones de transferencia de electrones (De la Garza y col, 2010). El hierro es indispensable para la sobrevivencia y la multiplicación de protozoarios, hongos y bacterias, con excepción de *Borrelia burgdorferi* y algunos miembros de la familia *Lactobacillaceae*, que utilizan manganeso en lugar de Fe (Del Castillo-Rueda y

Khosravi-Shahi, 2010). El hierro dietario se encuentra principalmente en estado férrico (Fe^{3+}) o como hierro hémico, mientras que el incorporado a través de productos farmacológicos usualmente está presente como sal ferrosa. El hierro inorgánico por acción del ácido clorhídrico del estómago pasa a su forma reducida, hierro ferroso (Fe^{2+}), que es la forma química soluble capaz de atravesar la membrana intestinal. Aunque el hierro puede absorberse a lo largo de todo el intestino, su absorción es más eficiente en el duodeno y la parte alta del yeyuno (Pérez y col, 2005).

El organismo debe retenerlo para su uso en reacciones biológicas pero, al mismo tiempo, debe protegerse del efecto tóxico de sus radicales libres, ya que pueden penetrar en las membranas, dañar las mitocondrias, lesionar órganos vitales y participar en la patogénesis de diversas enfermedades (Del Castillo-Rueda y Khosravi-Shahi, 2010). Por lo tanto, el metabolismo del hierro está estrechamente controlado para asegurar que los niveles de hierro libre se mantenga lo más bajo posible y garantizar una adecuada absorción, transporte y almacenamiento (Ludwig y col, 2015). Entre las hemoproteínas que utilizan hierro como cofactor se encuentran las que participan en el metabolismo del oxígeno (oxidasas, peroxidasas, catalasas e hidroxilasas), en la transferencia de electrones (citocromos) y en el transporte de oxígeno (hemoglobina) (Pérez y col, 2005).

El Fe^{+2} es un agente reductor deletéreo para los seres vivos debido a que produce radicales libres; de manera que el hierro es esencial pero en exceso es tóxico, por lo que su concentración está regulada estrictamente. En los hospederos el hierro que no se requiere para su metabolismo se encuentra unido a proteínas (ferritina, transferrina, lactoferrina), donde el hierro en el organismo se determina con Ferritina en sangre, que es la principal proteína que almacena hierro y es directamente proporcional a la cantidad de hierro almacenado. Entre más bajo es el nivel de ferritina, aun dentro del rango "normal", es más probable que un paciente tenga deficiencia de hierro. La transferrina es una glucoproteína sintetizada en el hígado que requiere la presencia de un receptor específico de membrana, el receptor de transferrina, antes de que pueda interiorizarse (Ludwig y col, 2015).

El hierro (Fe) es un metal de transición (son metales de transición los elementos que

forman al menos un ion que tenga un orbital “d” parcialmente lleno de electrones). Entre los metales de transición, el Fe es el más utilizado tanto en la transferencia electrónica como en la catálisis de las reacciones de óxidorreducción (redox). En el primero de estos procesos la función de la proteína cuyo grupo prostético contiene Fe, actúa como un vehículo para la transferencia de electrones, logrando recuperar su estado inicial después de intervenir en un ciclo completo (no hay un cambio neto). En el segundo, los electrones transferidos por el complejo proteína-grupo prostético con hierro, producen un cambio en los agentes que intervienen en la reacción, como sucede con la citocromo oxidasa, que transforma al O_2 en H_2O . El Fe tiene, además de las citadas funciones, la de transportar oxígeno (en la hemoglobina o en pigmentos análogos), almacenarlo (en la mioglobina), interviene en la biosíntesis del ADN (catalizando vía la ribonucleótido reductasa la formación de desoxirribonucleótidos), en el metabolismo xenobiótico y forma parte de hidrolasas. Además de las proteínas que ya se han mencionado, el hierro es constituyente de otras proteínas igualmente importantes como son las oxigenasas, las flavoproteínas y las redoxinas (Garza-Padrón y col, 2010).

1. Hierro en humanos

La distribución del hierro en diferentes componentes biológicos ilustra buena parte de sus funciones. En la especie humana se estima que en un adulto normal hay alrededor de 4 g de hierro, de los cuales el 65% está asociado con la función de transporte de oxígeno formando parte de la hemoglobina, el 9% forma parte de la mioglobina, menos del 1% en enzimas que contienen al grupo hemo, finalmente, entre el 15 y el 30% del hierro es almacenado en forma soluble como ferritina, o en depósitos, como hemosiderina (Herrera, 2015). El exceso de hierro se deposita intracelularmente como ferritina y hemosiderina en el sistema retículo endotelial del hígado, bazo y medula ósea. Cada día, se movilizan de 20 a 30 mg de hierro que provienen de la destrucción de los eritrocitos por el sistema retículo endotelial. El hierro se reutiliza, predominando cuantitativamente su incorporación a los precursores de eritrocitos de la medula ósea. Una pequeña cantidad se pierde por la orina y el sudor. Un promedio de 0,5 a 2 mg diarios se eliminan a través de pérdidas por exfoliación de células epiteliales, por lo que la ingesta dietética debe ser la adecuada para mantener la homeostasis del

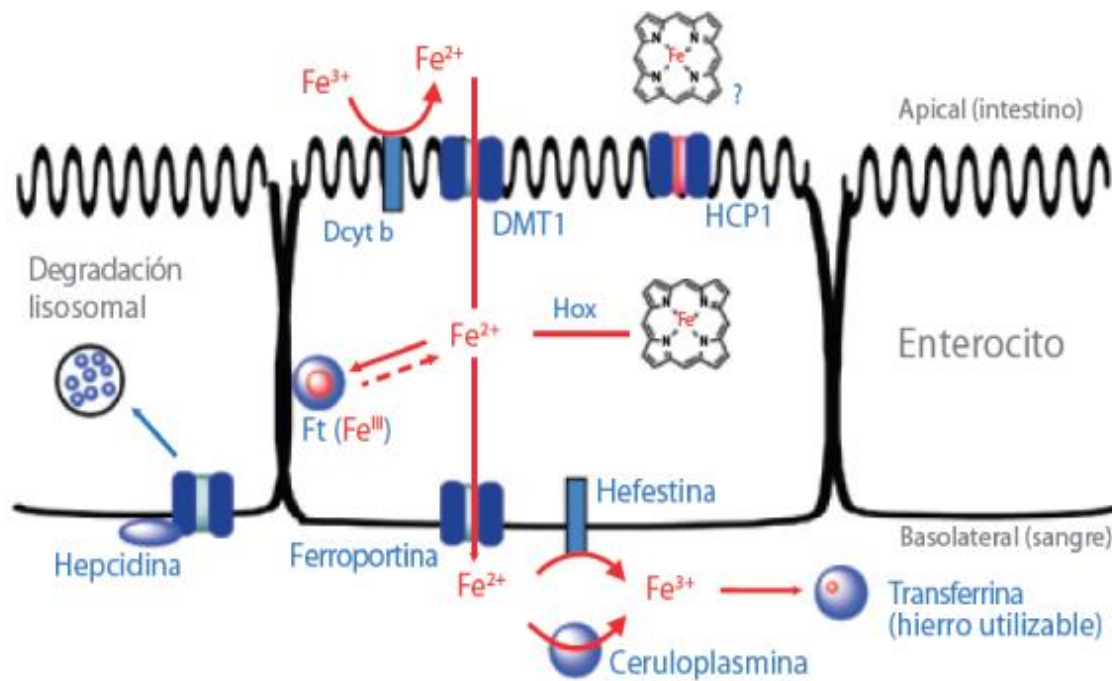
micronutriente (Toxqui y col, 2010). Se considera que la hemosiderina es una proteína que resulta de la degradación lisosomal de la ferritina y que excepto en los casos de sobrecarga de hierro, representa una concentración mucho menor a la que alcanza la ferritina (Herrera, 2015).

La participación del Fe^{+3} en la transferencia de electrones lleva a formar Fe^{+2} , que conduce a un exceso de “hierro lábil” en el citosol, donde puede ceder electrones a diferentes ligandos, como el H_2O_2 , transformándolos en radicales libres que son muy tóxicos (Garza-Padrón y col, 2010). La falta de hierro en el organismo puede producir mala síntesis proteica, deficiencia inmunitaria, aumento del ácido láctico, aumento de noradrenalina, menor compensación de enfermedades cardiopulmonares y anemia. La forma de identificarlo que demuestra carencia de hierro es una menor respuesta al estrés, menor rendimiento laboral, alteración en la conducta y mala regulación térmica (Herrera, 2015).

2. Captación del hierro

El destino del hierro depende de la concentración del catión dentro de la célula. Por lo tanto, el hierro se puede exportar a partir de células del sistema circulatorio o se puede acumular dentro de la célula. El proceso tiene lugar en la membrana apical de los enterocitos del duodeno y parte inicial del yeyuno. El Fe^{3+} forma fácilmente complejos insolubles y para su absorción debe ser previamente reducido a Fe^{2+} por una reductasa situada en la membrana apical del enterocito que recibe el nombre de Dcytb (citocromo b duodenal). Ya como Fe^{2+} puede ser transportado hacia el interior de la célula por el transportador de metales divalentes (DMT1 o Nramp2). El hierro hemo presente en la dieta se absorbe directamente a través de un transportador no identificado, pero donde se ha visto la participación de un transportador de folatos (PCTF) (Inoue y col, 2008; Makai y col, 2007; Qui y col, 2006). El hierro que se exporta al sistema circulatorio donde una proteína específica para este fin, la ferroportina 1, está es una proteína multipaso que se encuentra en la membrana basolateral de los enterocitos. Una vez exportado por ferroportina 1, el hierro debe transformarse por un proceso acoplado por reoxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} por peroxidasas, como ceruloplasmina, y seguido por la unión de Fe^{3+} a transferrina (Tf). Estas proteínas son capaces de regular el flujo de

hierro y por consiguiente la absorción de hierro, debido a la sobreexpresión de ferroportina 1, la cual es inducida por hierro celular y es suprimida por la hepcidina (Figura 5) (Garza-Padrón y col, 2010).



Dcyt b: citocromo b duodenal

DMT1: transportador de metales divalentes 1

HCP1: proteína transportadora de hemo 1

Hox: hemo oxigenasa

Ft: ferritina

Fig 5. Proteínas involucradas en la absorción del hierro (Garza-Padrón y col, 2010).

3 Metabolismo de hierro

Todos los organismos vivos, desde el más primitivo hasta el más complejo, requieren de hierro para una amplia variedad de funciones biológicas: procesos de óxido-reducción, en la respiración celular, síntesis de ADN y como transportador de electrones, entre otras. Sin embargo, debido al elevado potencial redox del hierro, junto a su facilidad para promover la formación de compuestos tóxicos reactivos los cuales causan daño oxidativo tanto en proteínas como en ácidos nucleicos, determinan que el metabolismo del hierro se debe controlar por un sistema regulador estricto (Ludwing y col, 2015; Wilkinson y Pantopoulos, 2014; Tandara y Salamunic, 2012; Jedelsky y col, 2011; Shiflett y Johnson, 2010).

La capacidad de hierro para existir en múltiples estados de oxidación es una propiedad explotada por los organismos. La bioquímica de hierro está dominado por dos estructuras, las agrupaciones de hierro-azufre de varios tipos, que utilizan azufre además de cisteína para unirse al hierro (Johnson y col, 2005), y el grupo hemo, en el que el metal reside en el centro de un macrociclo de porfirina y está coordinado por cuatro átomos de nitrógeno coplanares. El hemo es un cofactor notablemente versátil cuyas funciones están determinadas por la proteína que se une a ella. Casi todos los organismos poseen proteínas hemo y pueden sintetizar el cofactor, y en eucariontes la vía de biosíntesis del grupo hemo implica tanto enzimas citosólicas como mitocondriales (Layer y col, 2010). Aunque se trata de un eucarionte, el protozoo *G. duodenalis* carece de mitocondrias y en su lugar posee mitosomas, orgánulos residuales de origen mitocondrial que retienen la capacidad de ensamblar grupos sulfuro de hierro, pero no la capacidad para la fosforilación oxidativa o la biosíntesis de las proteínas hemo (Jedelsky y col, 2011; Tovar y col, 2003). Sin embargo, este parásito se basa en las vías de fosforilación y fermentación a nivel sustrato para satisfacer su necesidad de energía (Jarrol y col, 1989). A pesar de esto el genoma de *G. duodenalis* codifica proteínas hemo (Morrison y col, 2007), algunas de ellas han sido expresadas como proteínas recombinantes, incluyendo una flavohemoglobina con actividad óxido nítrico dioxigenasa (Mastronicola y col, 2010; Rafferty y col, 2010) y cuatro miembros de la familia del citocromo B5 de función desconocida (Cuadro 2)

(Rafferty y Dayer, 2015; Pyrih y col, 2014; Alam y col, 2012). Como un parásito, *G. duodenalis* se basa en su hospedero, y específicamente en los contenidos del tracto digestivo para muchas de sus funciones celulares. A pesar de su metabolismo anaeróbico, *G. duodenalis* consume oxígeno molecular mediante el uso de uno o más flavoproteínas, las cuales usa electrones proporcionadas por NADH para reducir el oxígeno a agua (David y col, 1996). Las flavohemoglobinas son eficientes óxido nítrico dioxigenasas que catalizan la reacción de globina unida al O₂ con óxido nítrico para formar nitrato (Gardner y Hill, 2001). Además, el óxido nítrico en altos niveles micromolares es tóxico para *G. duodenalis*, sin embargo, una flavohemoglobina funcional puede ayudar a protegerlo de los efectos dañinos de este radical libre (Alam y col, 2012).

Cuadro 2. Hemo proteínas de *Giardia duodenalis*

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

(Rafferty y Dayer, 2015)

4. Regulación del hierro

El Fe^{3+} es insoluble en soluciones con pH mayor a 3, por lo que, en el estómago, se forman complejos solubles del metal que aumentan su disponibilidad para ser absorbidos en el duodeno. Por otra parte, en el lumen del intestino se forman cantidades variables de Fe^{2+} como consecuencia de la reducción del Fe^{3+} por agentes dietarios (por ejemplo, ácido ascórbico). En consecuencia, ambos iones (Fe^{2+} y Fe^{3+}) pueden presentarse ante las células intestinales (Pérez y col, 2005).

Los diferentes mecanismo descritos para la absorción de hierro son tres:

- 1- Los iones Fe^{3+} pueden ser absorbidos vía una proteína de membrana miembro de la familia de las integrinas, la β_3 -integrina. Luego son transferidos a la proteína chaperon mobilferrina.
- 2- La absorción de los iones Fe^{2+} es facilitada por el transportador de metales divalentes DMT1 “divalent metal transporter 1”, también conocido como DCT1 “divalent cation transporter 1” o Nramp2 “natural-resistance-associated macrophage protein 2”. Por otra parte, la proteína DcytB “duodenal cytochrome b”, presente en la superficie apical del enterocito, reduce los iones Fe^{3+} dietarios, los cuales pueden entonces ser incorporados también vía DMT1.
- 3- El hemo es liberado de mioglobina y hemoglobina como consecuencia de la digestión proteolítica llevada a cabo por enzimas pancreáticas. Posteriormente es incorporado por las células del intestino delgado como una metaloporfirina intacta. El proceso de transporte es mediado por una proteína específica localizada en la cara apical de la membrana del enterocito. Dentro de la célula, el hemo es degradado por la hemooxigenasa, liberándose de esta manera el hierro inorgánico de la estructura tetrapirrólica (Pérez y col, 2005).

El hierro es transportado por Transferrina a las células a través de un proceso de endocitosis mediada por el receptor de transferrina (RTf). El primer paso es la unión de Tf al receptor en la membrana pero los RTf que se encuentran concentrados en fosas (invaginaciones de la membrana plasmática) revestidas internamente por la proteína clatrina, estos receptores no sólo son importantes

para facilitar el acceso del metal esencial a la célula sino que cumplen, además, un rol crítico en la liberación del hierro del complejo con Tf en el interior celular. Una vez formado el complejo Tf-RTf, el proceso de invaginación se completa, dando origen a una vesícula revestida que es transportada junto con el complejo ligando-receptor al interior celular. Una vez que la clatrina es removida, la vesícula resultante se fusiona con el endosoma, alcanzando el pH de 5.5, el hierro es liberado del complejo Tf-RTf como ion Fe^{3+} . Posteriormente, el metal es reducido (Fe^{2+}) por la ferri-reductasa endosomal y transportado al citoplasma por el transportador de cationes divalentes DMT1. El complejo apoTf-RTf es transportado intacto hacia la membrana plasmática donde, al tomar contacto nuevamente con el medio extracelular de pH neutro, se disocia. La apoproteína queda entonces disponible para captar nuevamente hierro y comenzar otro ciclo de transporte e internalización (Figura 6) (Pérez y col, 2005).

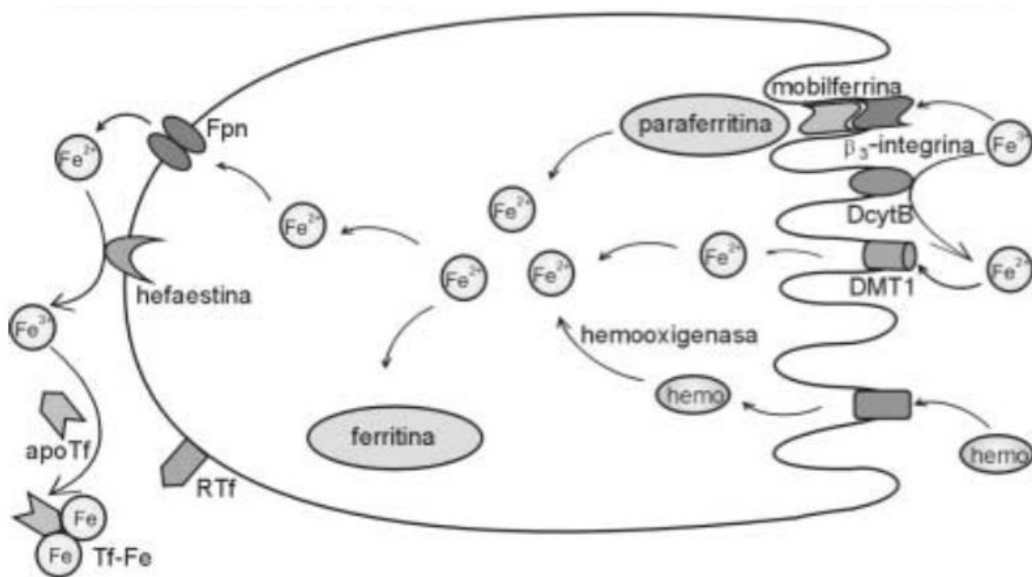


Fig 6. Mecanismo de absorción intestinal de hierro Tf: transferrina, RTf: receptor de transferrina, DMT1 “divalent metal transporter 1” transportador de metales divalentes, DcytB “duodenal cytochrome b” reductasa duodenal, Fpn “ferroportin” proteína transportadora de hierro (Pérez y col, 2005).

5. Homeostasis del hierro en las células

El hierro es un elemento esencial para todos los organismos vivos y el metabolismo de este catión se regula por sí mismo pero, tanto la sobrecarga como el déficit celular del hierro no. La deficiencia del hierro en la célula afecta su crecimiento y lleva a la muerte celular y el exceso de hierro libre también es tóxico para la célula y ciertos microorganismos proliferan y causan enfermedades, pero también la ferropenia favorece la infección nosocomial. La sobrecarga de hierro estimula el crecimiento de patógenos intracelulares mediante la reducción de citocinas y la inhibición de la función fagocítica, afecta el equilibrio entre los linfocitos T colaboradores y citotóxicos, modifica así, la respuesta proliferativa. También puede reducir la fagocitosis e inhibir la actividad del interferón gamma y la secreción de inmunoglobulinas, así como la supresión del sistema del complemento (Del Castillo-Rueda y Khosravi-Shahi, 2010). Esta toxicidad se debe a la habilidad del hierro libre de generar especies reactivas de oxígeno. Dado que tanto la deficiencia como la sobrecarga de hierro son perjudiciales, su absorción, concentración y estado redox deben ser regulados cuidadosamente (Wilkinson y Pantopoulos, 2014; Tandara y Salamunic, 2012; Del Castillo-Rueda y Khosravi-Shahi, 2010; Pérez y col, 2005; Pantopoulos, 2004).

En procariontes, la regulación por hierro se da principalmente por la proteína represora Fur la cual regula los genes que están involucrados en la captación de hierro y la biosíntesis de sideróforos (queladores específicos para Fe^{+3}) en respuesta al nivel de hierro en la célula. La secuencia que reconoce Fur es GATAATGATAATCATTATC conocida como caja Fur (Hantke, 2001).

En eucariontes, el hierro se encuentra formando parte de dos compartimientos: uno funcional y otro de depósito. El transporte de hierro unido a la transferrina facilita el intercambio de metal entre ambos compartimientos. El exceso de hierro se deposita intracelularmente asociado a ferritina (Rouault y Harford, 2000; Ponka y col, 1998; Hentze y Kuhn, 1996). Por otra parte, transferrina se une al receptor de transferrina y este complejo es endocitado y acidificado por una bomba de protones en el endosoma temprano por lo que se afecta la conformación del complejo transferrina/receptor de transferrina para liberar el hierro (Aisen y

Listowsky, 1980). Las proteínas que participan en la captura, almacenamiento, utilización y transporte de este metal deben ser reguladas coordinadamente. Las señales y mecanismos regulatorios que orquestan su secreción involucran la modulación de la transcripción, estabilidad del ARNm, traducción y modificaciones postraduccionales (Pérez y col, 2005; Hentze y col, 2004).

a. Sistema tipo IRE/IRP

La regulación post-transcripcional por el sistema IRE/IRP es la más estudiada. Las proteínas citoplasmáticas reguladoras de hierro, IRP-1 e IRP-2, interactúan con elementos de respuesta a hierro (IREs), los cuales son estructuras de tallo-burbuja conservadas que se encuentran en las regiones no traducidas (UTR) de los ARNm que codifican proteínas relacionadas a la homeostasis del hierro (Selezneva y col, 2013; Goforth y col, 2010). Los IREs son estructuralmente similares. Los IREs canónicos tienen 31-nt de los cuales seis forman una burbuja con la secuencia consenso 5'-CAGUGN-3', un tallo de cinco bases apareadas, una pequeña asa o protuberancia asimétrica con una citocina no apareada en la hebra 5' y un tallo adicional de longitud variable (Hentze y Kuhn, 1996). Un solo IRE localizado en el extremo 5' UTR del ARNm de ferritina es reconocido por la proteína IRP y este complejo IRE/IRP inhibe su traducción (Muckenthaler y col, 1998). El segundo tipo de regulación ocurre cuando el IRE está localizado en el extremo 3'-UTR del ARNm. El receptor de transferrina, por ejemplo, posee cinco estructuras IREs en esta región 3'-UTR y sirven para estabilizar el ARNm cuando se une la IRP (Hentze y Kuhn, 1996).

El almacén de hierro celular regula la unión de las proteínas IRP-1 e IRP-2 por mecanismos distintos (Henderson y Kuhn, 1995). Cuando los niveles de hierro son altos, un grupo 4Fe-4S de la IRP-1 se ensambla y se inhibe la actividad de unión al IRE por lo que se convierte en aconitasa (Haile y col, 1992). Cuando los niveles de hierro celular son bajos, la IRP-1 se une al IRE, por lo que la IRP-1 actúa como una proteína bifuncional (Figura 7) (Selezneva y col, 2013; Goforth y col, 2010; Brazzalotto y col, 2002; Gegout y col, 1999; Pantopoulos y col, 1996). La IRP-2 posee el 62% de homología con la IRP-1 pero, a diferencia de ella, no posee el

grupo Fe-S y no tiene actividad de aconitasa. La IRP-2 tiene la capacidad de unirse con elevada afinidad a secuencias IRE en condiciones de hierro bajo, pero en hierro alto se degrada vía proteosoma (Hentze y Kuhn, 1996; Iwai y col, 1995). La IRP-2 contiene una inserción de 73 aminoácidos ricos en prolina y cisteína en el extremo amino-terminal que se ha involucrado en la detección de hierro y en la degradación mediada por proteosoma, ver figura 7 (Guo y col, 1995).

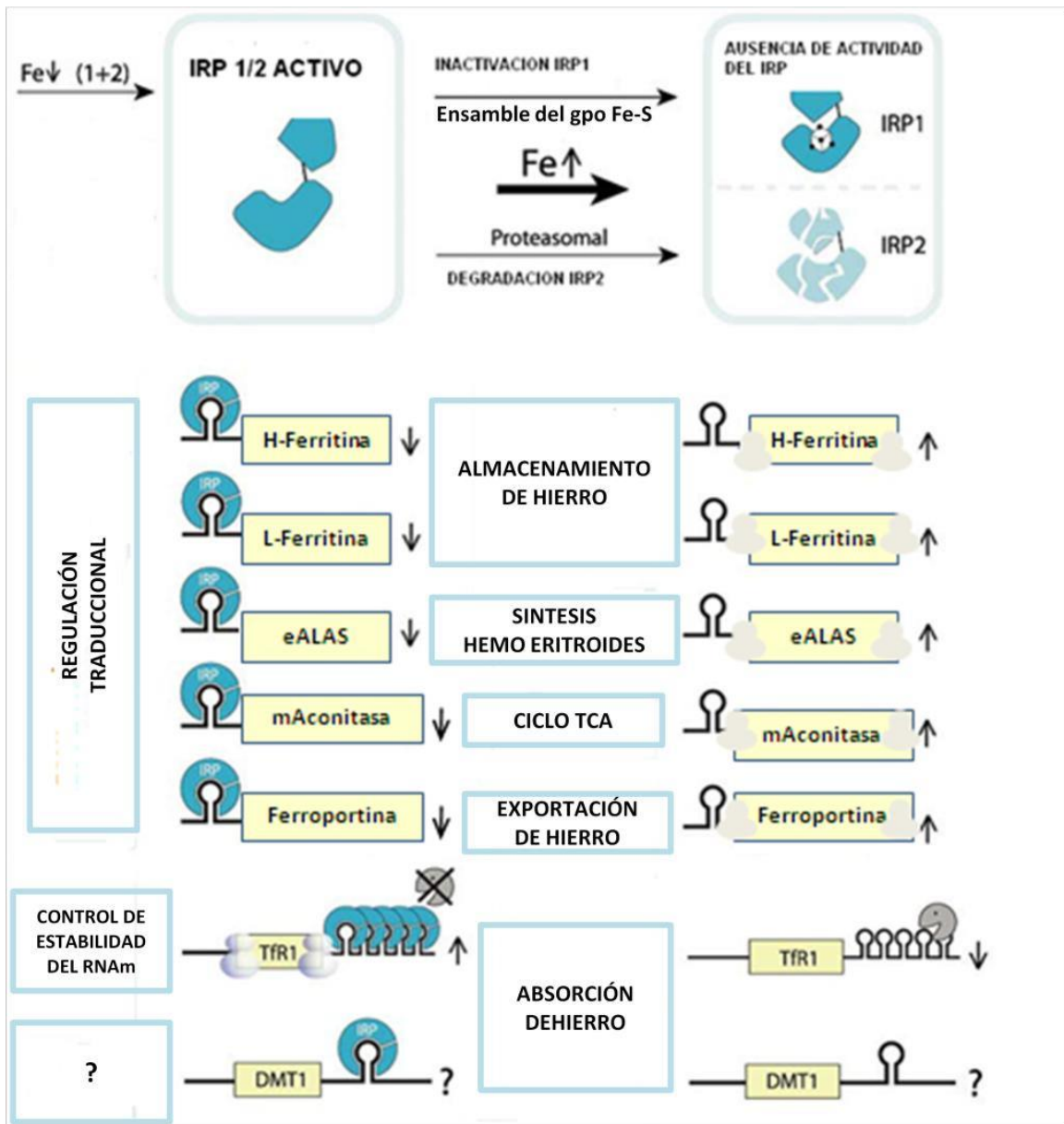


Fig 7. Sistema de Regulación IRE/IRP. Proteínas involucradas en el almacenamiento de hierro (Hentze y col, 2004).

b. ARNm con estructuras IREs

El ARNm en eucariontes que contienen IREs en su 3'-UTR son: DMT1 (transportador de metales), CDC14A (que participa en la división celular) y MRCK α (cinasa de unión a Cdc42) los cuales no han sido bien estudiados (Figura 8) (Leipuviene y Theil, 2007). Los ARNm de eucariontes primitivos son: *tvcp12* (cisteína proteinasa del parásito protozoario *Trichomonas vaginalis*) (León-Sicairos y col, 2017, *en revisión*) y en algunos que codifican para proteínas hipotéticas del parásito protozoario *P. falciparum* (Militello y col, 2004; Loyevsky y col, 2003). En cuanto a los ARNm de eucariotes que contienen IREs en su 5'-UTR se encuentran ACO2/acon (aconitasa mitocondrial), ferroportina, Subunidad b de la succinato deshidrogenada, ALAS2/ALASE/ASB (5'-aminolevulínico ácido sintetasa) y EPAS1/HIF-1 α (dominio endotelial PAS, inducible en hipoxia) (Leipuviene y Theil, 2007). En eucariontes primitivos, *tvcp4* (cisteína proteinasa 4 de *T. vaginalis*) (Solano-González y col, 2007). Todos estos ARNm codifican proteínas que participan en el metabolismo del hierro o en la virulencia. Además, se encuentra relación estrecha entre algunos polimorfismos de estos genes con enfermedades importantes como anemia, cáncer, diabetes, enfermedades infecciosas y deficiencias del sistema inmune (Malquori y col, 2008; Leipuviene y Theil, 2007; Good y col, 1988). Se han realizado estudios que sugieren la presencia de un mecanismo tipo IRE/IRP en *G. duodenalis*, así como se demostró en *T. vaginalis* y *E. histolytica* los cuales son evolutivamente cercanos y recientemente se ha reportado la presencia de este mecanismo de regulación por hierro. En nuestro laboratorio se realizaron análisis donde se encontraron estructuras tallo-burbuja en ARNm de *G. duodenalis*, la unión del IRE-Catepsina L11, IRE-RPL13 y el efecto del hierro en el crecimiento del parásito sugieren la existencia de un mecanismo de regulación postranscripcional tipo IRE-IRP en este protozoario (Plata-Guzmán, 2015). Por otro lado, aunque ha sido poco estudiado, el hierro forma parte importante en el crecimiento y virulencia de *G. duodenalis*, la gran necesidad del parásito por dicho catión se refleja en la anemia causada sobre todo en niños con giardiasis (Bartelt y col, 2013), donde, después del tratamiento con metronidazol se observa aumento de hemoglobina en la sangre (Monajemzadeh y

Monajemzadeh, 2008; Olivares y col, 2004) por lo que la presencia de *G. duodenalis* en niños está estrechamente relacionada con malnutrición y se ha considerado un marcador de dicha condición (Bartelt y col, 2013; Al-Mekhlafi y col, 2005).

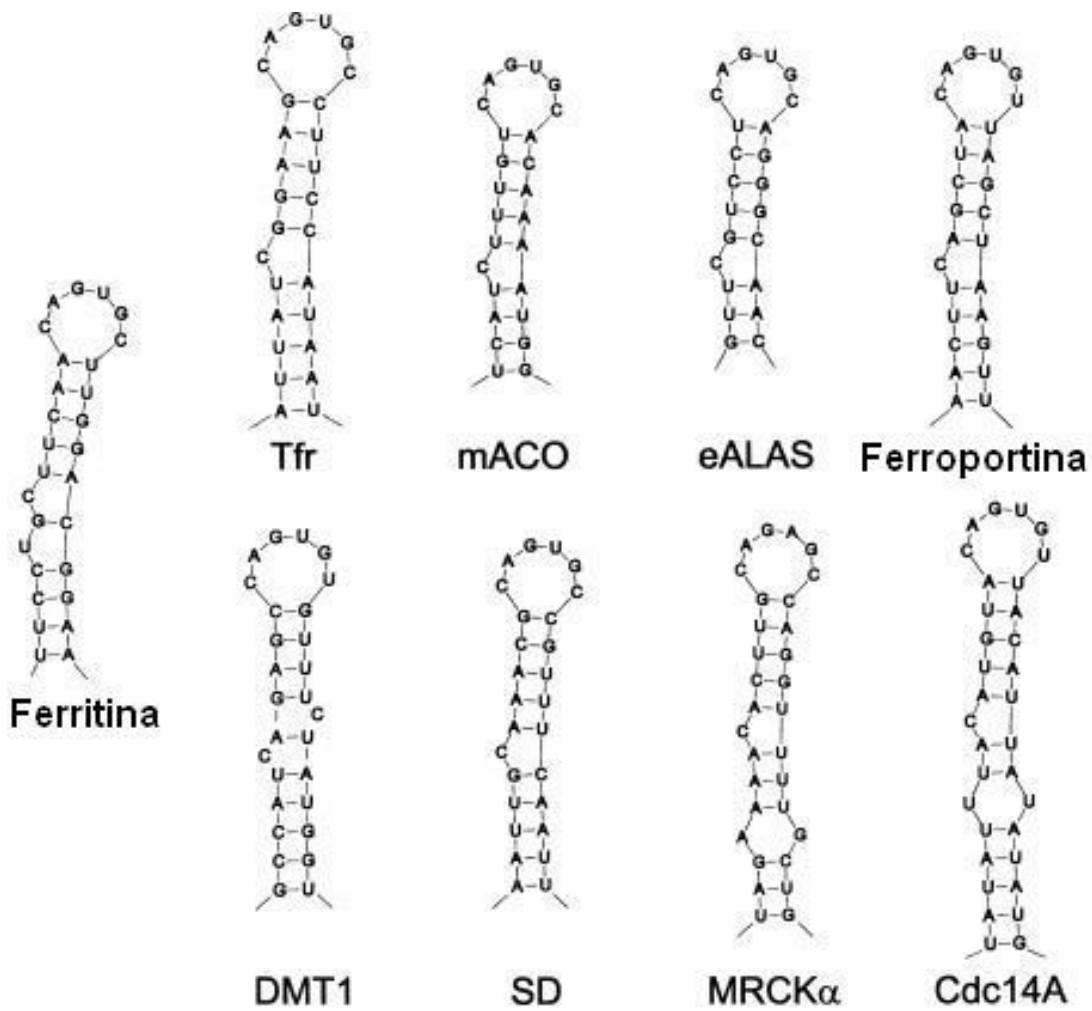


Fig 8. Elementos de Respuesta al Hierro (IREs). Estructuras tallo burbuja de ARNm de eucariontes superiores; Ferritina, Tfr, mACO, eALAS, Ferroportina, DMT1, MRCK y Cdc14A son genes de humano y SD es un gen de *Drosophila melanogaster*. Tomado de Piccinelli y Samuelsson, 2007.

6. Efecto del hierro en protozoarios

En los países en desarrollo, las infecciones parasitarias comunes asociadas con la pérdida de sangre puede causar depleción de hierro, deficiencia de hierro, y en última instancia la anemia. Los efectos negativos de algunos parásitos protozoarios y helmintos en la absorción de algunos micronutrientes que conducen a la anemia nutricional se han reportado en diferentes trabajos científicos (Al-Laham y col, 2015). Además, el hierro afecta los mecanismos de patogenicidad; por ejemplo, los mecanismos de adhesión y citotoxicidad de *T. vaginalis* y *E. histolytica* se ven aumentados en condiciones de hierro alto (Lee y col, 2008; Hernández-Gutiérrez y col, 2004; Park y col, 2001; Álvarez-Sánchez y col, 2000; Lehker y col, 1991). En *T. vaginalis*, se ha reportado que el hierro modula negativamente algunas cisteín proteinasas, ya que a concentraciones de hierro altas en el medio de cultivo se reduce la actividad y expresión de superficie de estas CPs (Hernández-Cuevas y col, 2014; Hernández y col, 2007; Álvarez-Sánchez y col, 2000). En *E. histolytica*, mediante ensayos de “Northern blot” utilizando parásitos crecidos en condiciones de hierro normales y bajo, se observó regulación negativa por hierro de seis diferentes proteinasas de tipo cisteína (CP1, CP2, CP3, CP4, CP5 y CP6) (Park y col, 2001).

Por otra parte, Lee y colaboradores en el 2008 reportaron que el hierro es un factor importante en la adherencia de *E. histolytica* a las monocapas de células CHO (células de ovario de hámster chino). Estos estudios mostraron que la ausencia de hierro en el medio afecta el crecimiento de los parásitos, pero que una concentración elevada de este catión no afecta dicho crecimiento. Sin embargo, la capacidad adhesiva de la *E. histolytica* aumenta en altas concentraciones de hierro (285 μM) (Lee y col, 2008).

Además, Cruz-Castañeda y Olivares-Trejo en el 2008 identificaron una proteína de 45 kDa, Ehhmbp45, que se une a hemoglobina como fuente de hierro y encontraron que los niveles de ARNm son regulados negativamente por hierro. Sin embargo, los mecanismos por los cuales ocurre esta modulación son poco estudiados a la fecha.

a. Hierro en *Giardia duodenalis*

Desde hace años es sabido que *G. duodenalis* influye en el estado de hierro y es capaz de afectar el estado de absorción de vitamina A y proteínas (Sánchez-Aviles y col, 2013; Le Blanc y col, 2012). La presencia de mayores grados de desnutrición van en relación con la duración de la parasitosis y la intensidad del cuadro clínico en aparato digestivo y cambios en la absorción intestinal, se encontró menos afectación de la esperada (Cuadro 3) (Sanchez-Aviles, 2013; Le Blanc y col, 2012; Monajemzadeh y Monajemzadeh, 2008). En consecuencia, el tratamiento de metronidazol de los niños con giardiasis corrige la absorción de hierro y la mejora los parámetros hematológicos (Monajemzadeh y Monajemzadeh, 2008).

A la fecha no se ha reportado si el hierro puede o no ser metabolizado por *G. duodenalis*. Sin embargo, existe evidencia que hace suponer que este parásito pudiese utilizar el hierro como elemento esencial en sus vías metabólicas y expresión proteica. La primera evidencia se da con la presencia de organelos tipo mitosomas en donde se ha demostrado que contiene las proteínas cisteína desulfurasa (Isc) involucradas en la formación de grupos hierro-azufre característico de las cadenas de transporte de electrones. Además, estas proteínas de tipo Isc tienen homología en secuencia con la de dos protozoarios anaerobios patógenos para el humano: *E. histolytica* y *T. vaginalis*, de quienes se tiene una amplia información sobre su regulación de hierro (Emelyanov, 2003; Tachezy y col, 2001).

Por otra parte, se ha demostrado la presencia de proteínas homólogas que requieren estos grupos prostéticos de hierro-azufre, una de ellas es una hidrogenasa dependiente de hierro que se expresa a nivel de transcrito en cultivos de *G. duodenalis*, y cuya secuencia se demostró era similar a la descrita en *E. histolytica*. También, como se mencionó anteriormente, ya se ha descrito en *G. duodenalis* proteínas de tipo ferredoxina y PFO, que son proteínas que requieren de grupos hierro-azufre para su función y cuyos homólogos en *T. vaginalis* se ha visto que su expresión es regulada por las condiciones de hierro. Recientemente, se identificó en *G. duodenalis* otra proteína de los mitosomas que se une a un

grupo FeS lábil, una variable de glutaredoxina que se involucran también en la formación de los grupos hierro-azufre (Dolezal y col, 2005; Tovar y col, 2003; Townson y col, 1996).

Aunado a estas evidencias de utilización de hierro en *G. duodenalis*, se ha identificado una enzima denominada FDP, cuyo centro activo contiene dos sitios para átomos de hierro y está involucrada en la reducción del O_2 en H_2O , por su afinidad específica en condiciones aeróbicas. Además, recientemente se reportó en *G. duodenalis* la presencia de un superóxido reductasa, cuya función se sabe es la de reoxidar los aniones O_2^- a O_2 y transportar los electrones a grupos de hierro (Dolezal y col, 2005).

Por último, el medio que se utiliza normalmente para el cultivo axénico de *G. duodenalis* contiene citrato férrico y suero bovino con trazas de hierro que podría estar utilizando los trofozoítos para su crecimiento *in vitro*. Todos estos últimos datos, junto con lo reportado en otros microorganismos y parásitos protozoarios en la utilización del hierro en su metabolismo, sugiere que *G. duodenalis* debe de utilizar el hierro para controlar su crecimiento y metabolismo (Tovar y col, 2003).

Cuadro 3. Valores hematológicos antes y después del tratamiento de 102 niños con giardiasis

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

(Monajemzadeh y Monajemzadeh, 2008).

IV JUSTIFICACIÓN

El hierro es un catión esencial para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, incluyendo a los protozoarios. En *E. histolytica* y *T. vaginalis*, la citoadherencia y citotoxicidad se aumentan por la adición de hierro en el medio de crecimiento. Además el hierro regula la expresión diferencial de los genes involucrados en la virulencia. Nuestro equipo de trabajo es pionero en el estudio de estos mecanismos de regulación en protozoarios. La cercanía evolutiva con estos protozoarios y la necesidad del hierro para su crecimiento en cultivos *in vitro* y en individuos que presentan niveles bajo de hierro sérico al estar infectados con *G. duodenalis* pero que aumentan al recibir antiparasitarios sugieren que también este parásito necesita del hierro para su sobrevivencia y virulencia, sin embargo existen pocos estudios relacionados. En nuestro laboratorio hemos encontrado evidencia del mecanismo de regulación tipo IRE/IRP *in silico* y de manera experimental, por lo que son necesarios más estudios que demuestren el efecto del hierro sobre el crecimiento en cultivos del parásito así como la presencia y expresión de diferentes genes involucrados en la adquisición y metabolismo de este catión.

V HIPOTESIS

El parásito protozoario *G. duodenalis* presenta un metabolismo necesario para la adquisición de hierro que le ayuda en su crecimiento y expresión de diferentes genes para su sobrevivencia y virulencia.

VI OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de un sistema de adquisición y metabolismo del hierro en el parásito protozoario *G. duodenalis*.

B OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar el efecto del hierro sobre el crecimiento y tasa de reproducción en cultivos axénicos de trofozoitos de *G. duodenalis*.
- 2.- Investigar la presencia de proteínas que participan en la adquisición y metabolismo del hierro en el proteoma de *G. duodenalis*.
- 3.- Investigar la presencia de estructuras tallo-burbuja (tipo IRE) en ARNm's que codifiquen para proteínas que participen en el metabolismo del hierro en *G. duodenalis*.
- 4.- Determinar la expresión diferencial por hierro de algunos genes utilizados como modelo de estudio.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

A. Cultivos de *G. duodenalis*

El aislado WB de *G. duodenalis* fue donado gentilmente por la Dra. Guadalupe Ortega Pierres del departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN y Dr. Héctor Samuel López Moreno de la Facultad de Químico Farmacéutico Biólogo. El cultivo se realizará en medio TYI-S-33 enriquecido con suero fetal bovino al 10%, bilis 1 g/L, pH de 7.0, 50 µg/mL de gentamicina y se filtrará con membrana de 0.45µm. Al medio de cultivo se le añadirá citrato de amonio férrico (sigma) a una concentración de 300 µM para obtener las condiciones de alto hierro y resina quelex para las condiciones de bajo hierro (7.7 µM) previo el inóculo de los parásitos crecidos en condiciones normales. Las Giardias serán cosechadas en tubos falcom de 15 mL con medio nuevo por enfriamiento a 4°C, se centrifugarán a 1500 rpm durante 5 min (Bagchi y col, 2012), posteriormente se decantará el sobrenadante, luego la pastilla se resuspenderá en 1.5 mL de suero fetal bovino; se homogenizará y se resuspenderá en 13.5 mL de medio nuevo, finalmente se incubará a 37 °C por 24 h (Tasca y col, 2005). El cultivo se observará periódicamente en un microscopio invertido (Leica) para verificar su crecimiento y descartar contaminación, al llegar a su fase logarítmica los trofozoítos serán decantados en tubos falcom de 15 mL, se centrifugarán a 1500 rpm durante 5 min a 4°C posteriormente se decantará el sobrenadante, luego la pastilla se procesará de acuerdo a los ensayos necesarios o se resuspenderá en 90% de suero fetal bovino y 10% de DMSO para su almacenamiento a -70 °C y uso posterior (Bagchi y col, 2012).

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

Para la medición del crecimiento del protozoario *G. duodenalis*, se partió del medio de cultivo TYI-S-33 en condiciones normales de hierro (100 µM) el cual fue descrito anteriormente. Para obtener las condiciones de alto hierro, al medio de cultivo se le añadió citrato de amonio férrico obteniendo una concentración de 300 µM y para las condiciones de bajo hierro (7.7 µM) se adicionaron 1.25 g de la

resina quelex dejándose en agitación en un ambiente frío (4 °C) durante 16 h. Para la realización de la cinética de crecimiento se inoculo 4.9×10^6 trofozoitos crecidos en condiciones normales en las diferentes concentraciones de hierro y se incubaron a 37 °C para obtener los tiempos 0, 24, 48, 72, 96 y 120h, transcurrido el tiempo los cultivos con las diferentes condiciones de hierro se centrifugaron en tubos falcom de 15 mL a 1500 rpm, 4 °C durante 5 min, a la pastilla se le realizó un lavado con PBS 1X, se homogenizó y se colocaron 10 μ L en la cámara de Neubauer para realizar el conteo de trofozoitos. De igual manera se preparó una dilución 1:10 con azul de tripano y se añadieron 10 μ L en la cámara de Neubauer para corroborar la viabilidad de las Giardias. El conteo, viabilidad y morfología del parásito se observaron en un microscopio invertido (Leica).

C. Análisis bioinformático del genoma del parásito *G. duodenalis*

1. Búsqueda de proteínas que participan en la adquisición y metabolismo del hierro en el proteoma de *G. duodenalis*.

Mediante análisis *in silico* se realizó la búsqueda de proteínas que participan en la adquisición y metabolismo del hierro en el proteoma de Giardia (www.giardiadb.org) utilizando como sonda secuencias aminoacídicas de parásitos protozoarios evolutivamente cercanos como *E. histolytica* obtenidas del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Por último, dichas secuencias se utilizaron para realizar alineamientos múltiples en el programa bioinformático Biology Workbench (www.workbench.sdsc.edu).

2. Búsqueda de estructuras tallo-burbuja en ARNm's de *G. duodenalis*

Se utilizó la base de datos de la secuencia del genoma de *G. duodenalis* (www.giardiadb.org), se tomaron las secuencias que codifican proteínas de virulencia, del citoesqueleto, proteínas ribosomales y del metabolismo. Los extremos de las secuencias se delimitaron de la siguiente manera. Para la región 5'UTR se delimitó de acuerdo a lo reportado por Knodler y col, 1999; Elmendorf y col, 2000 donde proponen regiones ricas de A/T como iniciadores de la transcripción. Una A en el medio de la secuencia rica en A/T podría ser el mejor sitio de inicio de la transcripción (Tolba y col, 2013). En la región 3'UTR se buscó

la señal consenso poliA AGTPuAA (Peattie, 1990), la cual es levemente degenerada en las posiciones 1, 2 y 3 al igual que la señal ATGGAA ubicada de 9-13 pb río arriba de donde se lleva a cabo la poliadenilación (Que y col, 1996). Una vez delimitadas las secuencias, las estructuras secundarias se analizaron mediante el programa mfold de Zuker (Zuker y col, 2003) en busca de estructuras tallo-burbuja.

D. Extracción de ácidos nucleicos

Se utilizó el reactivo TRIzol® (INVITROGEN) para la extracción de los ácidos nucleicos de las células de *G. duodenalis*, cultivadas previamente bajo diferentes concentraciones de hierro. Por cada 10×10^6 millones de células se agregó 1 ml de TRIzol® a las muestras. Se incubaron por 5 minutos en hielo y posteriormente se adicionó 200 μ l de cloroformo, se agitaron por inversión durante 30 segundos y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm a 4° C durante 20 minutos. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se adicionaron 200 μ l de cloroformo a la pastilla. Se incubaron de nuevo las muestras y se centrifugaron en las condiciones anteriores. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se adicionó 0.5 ml de isopropanol frío a la pastilla. Se agitó suavemente por inversión y se dejó precipitar por 48 horas a -20° C. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 11,000 rpm por 10 minutos a 4° C y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Se lavó dos veces la pastilla de ácidos nucleicos con 1 ml de etanol al 70% (diluido con agua inyectable), centrifugando cada vez a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4° C. Posteriormente se secó la pastilla al aire y se resuspendió en 100 μ l de agua inyectable.

E. Cuantificación e integridad de ácidos nucleicos

De las muestras obtenidas de la extracción de ácidos nucleicos se empleó una dilución 1:500 (agua inyectable) y se realizó la cuantificación en el espectrofotómetro (BioRad), para obtener la concentración de ácidos nucleicos. La integridad de los ácidos nucleicos se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa, a 80 Volts por 45 minutos. Posteriormente las muestras se almacenaron a -70°C.

F. Remoción de ADN contaminante del ARN obtenido

Para este ensayo se utilizó el kit masterpure™ RNA purification (EPICENTRE) y se siguieron las condiciones de la casa comercial. A cada muestra se le agregaron 0.5 µl de enzima DNasa y 19.5 µl de “1XDNase Buffer”. Las muestras se incubaron a 37°C durante 40 minutos. Pasado este tiempo, a cada muestra se le agregaron 20 µl de 2XT y solución de lisis “CLysis solution” y se mezclaron con agitación manual, posteriormente se agregaron 20 µl de “MPC Protein Precipitation Reagent”; se mezclaron de nuevo manualmente por diez segundos y se colocaron en hielo 5 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 10,000g a 4°C hasta formar el pellet. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante con ARN a un tubo limpio para microcentrífuga y se descartó el pellet. Se precipitó el ARN agregando 50 µl de isopropanol al sobrenadante mezclando suavemente y dejando en reposo a 4°C por 24 horas. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 4°C a 10,000g durante 10 minutos y se desechó el isopropanol de cada una de las muestras cuidadosamente sin disolver el pellet con ARN. Posteriormente las muestras se lavaron dos veces con 50 µl de etanol al 70% (diluido con agua inyectable) centrifugando cada vez 5 minutos a 4°C a 10,000 rpm cuidadosamente para no disolver el pellet con ARN. Posteriormente, la pastilla se secó al aire y cada una de las muestras se resuspendió en 10 µl de agua inyectable.

G. Diseño de oligonucleótidos.

Se diseñaron oligonucleótidos (Oligo 7.2 Software) específicos internos de la región codificadora de algunos genes de *G. duodenalis* cuyos transcritos poseen estructuras tipo IRE en su región no traducida, se amplificaron por PCR utilizando como molde el ADNc obtenido a partir del ARN total del parásito crecido a diferentes concentraciones de hierro, descrito anteriormente.

Se diseñaron los oligonucleótidos para *Glucosamina 6 fosfato desaminasa* y *Actina* de *G. duodenalis* (Cuadro 4), tomando las secuencias depositadas en el genoma del parásito obtenidas en <http://giardiadb.org/giardiadb/>. Se utilizó como control positivo para la amplificación por PCR los oligonucleótidos de *β-Tubulina*

previamente diseñados en nuestro laboratorio.

Cuadro 4. Oligonucleótidos específicos de genes de *G. duodenalis* para los ensayos de RT-PCR

Oligonucleótido	Secuencia	Tm °C
<i>Glucosamina 6 fosfato desaminasa</i> sentido	5' AGCAAGGTCAATATAAAG 3'	47.8
<i>Glucosamina 6 fosfato desaminasa</i> antisentido	5' CCTCACACTTGCTCTCAA 3'	
<i>Actina</i> sentido	5' GAGAAAAGATTTGCCAGA 3'	46.2
<i>Actina</i> antisentido	5' CTCCTTTTATATCACGCAC 3'	
β - <i>tubulina</i> sentido	5' AGATCGTCCACATCCAGGCA 3'	58.35
β - <i>tubulina</i> antisentido	5' CTTCGGGGACGGGACGACGG 3'	

H. Ensayos de RT-PCR

Para la retrotranscripción del ARN de las muestras de parásitos crecidos a diferentes concentraciones de hierro obtenidas de la remoción de ADN contaminante (ARN total) se utilizará el kit “MMLV Reverse Transcriptase 1st-Strand cDNA Synthesis” (Epicentre). El ARN se transcribió inversamente utilizando la enzima “AMV Inverse Transcriptase” y “oligo (dT) primer”.

A la mezcla para PCR se le añadieron 2 µl de cada oligonucleótido tomado directamente bajo las condiciones que especificó la casa comercial, agua inyectable a volumen total de 25 µl, Taq ADN polimerasa (INVITROGEN) 2.5 U, MgCl₂ 1.5 mM (dATP, dTTP, dGTP, y dCTP). Las siguientes condiciones se utilizaron para la amplificación: 94 °C durante 2 minutos para desnaturalizar el ADN, 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min de alineamiento a 47.8°C para *GlcN6P desaminasa* y 1 min de alineamiento a 46.2°C para *Actina* de *G. duodenalis*, el tiempo de extensión fue de 1 minuto a 72 °C y una extensión final de 7 minutos a 72 °C. El número de ciclos para cada amplificación fue de 30 para *GlcN6P desaminasa* y 29 para *Actina*.

Como control positivo se amplificó un fragmento de *β-tubulina* esperando un producto de 507 pb en *G. duodenalis*. Las condiciones de amplificación fueron 1 min de desnaturalización inicial a 94°C durante 1 ciclo, 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 min de alineamiento a 58.35°C, 1 min a 72°C de extensión durante 30 ciclos y 7 min de extensión final a 72°C. Los amplicones se analizaron en un gel de agarosa al 1%, con un amortiguador de corrida TAE 1X a 80 V por 50 min, teñido con 3 µL de bromuro de etidio.

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Efecto del hierro sobre el crecimiento y tasa de reproducción en cultivos axénicos de trofozoítos de *G. duodenalis*.

Se ha reportado que *G. duodenalis* utiliza el hierro para nutrirse, sin embargo, existen pocos estudios relacionados con el efecto del hierro en el crecimiento y virulencia en dicho parásito. En los parásitos protozoarios evolutivamente cercanos a *Giardia* como *T. vaginalis* y *E. histolytica* se ha reportado que el hierro afecta tanto el crecimiento como la virulencia y la expresión diferencial de genes (León-Sicairos y col, 2017 *en revisión*; Torres-Romero y Arroyo, 2009; Lee y col, 2008; Solano-González y col, 2007; Park y col, 2001), por lo que hipotetizamos que el hierro tiene un efecto sobre el crecimiento de *G. duodenalis*. Por lo cual, se realizaron cinéticas de crecimiento del parásito partiendo del medio de cultivo TYI-S-33 de una concentración normal de hierro (100 μM); para obtener las concentraciones de alto hierro, al medio de cultivo se le añadió citrato de amonio férrico (300 μM) y para las condiciones de una concentración bajo de hierro, se adicionó resina Chelex para obtener una concentración final de 7.7 μM (Figura 9). Para el inicio de la cinética de crecimiento se utilizaron 5.2×10^6 trofozoitos crecidos en condiciones de una concentración normal de hierro, estos se inocularon en las diferentes concentraciones de hierro (7.7 μM , 100 μM , 300 μM) y se incubaron a 37°C durante los tiempos $t_1=0$, $t_2=24$, $t_3=48$, $t_4=72$, $t_5=96$ y $t_6=120$ horas, realizando el conteo y viabilidad celular (Figura 9). Después de 24 h (t_2) de la primera incubación, el número de parásitos fue de 6.0×10^6 trofozoitos en una concentración baja de hierro, 6.4×10^6 trofozoitos en de una concentración normal de hierro y 6.7×10^6 trofozoitos en una concentración alta de hierro, lo que sugiere que *G. duodenalis* requiere de hierro para su adecuado crecimiento pues a mayor concentración de hierro mayor número de parásitos. Conforme aumenta el tiempo de incubación ($t_4=72\text{h}$) se ve aumentado el número de parásitos, 6.3×10^6 trofozoitos en una concentración baja de hierro, 7.0×10^6 trofozoitos en una concentración normal de hierro y 8.5×10^6 trofozoitos en una concentración alta de hierro, sin embargo, después de $t_5=96\text{h}$ se observó una marcada disminución de

5.6 x 10⁶ trofozoítos en una concentración bajo de hierro, 5.9 x 10⁶ trofozoitos en una concentración normal de hierro y 6.7 x10⁶ trofozoitos en una concentración alta de hierro. Posteriormente, al t6=120h se observó una mayor disminución de *G. duodenalis* en las tres condiciones de hierro; 2.4 x 10⁶ trofozoítos en una concentración bajo de hierro, 3.4 x 10⁶ trofozoitos en una concentración normal de hierro y 0.6 x 10⁶ trofozoitos en una concentración alta de hierro. Por lo tanto, bajo las tres condiciones de hierro analizadas, se observó un crecimiento y viabilidad mayor a una concentracion alta de hierro pero con una muerte de *G. duodenalis* mas rápido; por el caso contrario a una concentración baja en hierro se observó una reducción de parásitos lo que indica que el hierro es un elemento esencial para el crecimiento y viabilidad de *G. duodenalis*, tal como lo demostró Plata-Guzmán (2015), donde se ve afectado el crecimiento de Giardia por este catión, caso similar sucede en *T. vaginalis* y *E. histolytica* (Soto-Castro y col, 2017; Calla-Choque y col, 2014; Torres-Romero y Arroyo, 2009; Solano-González y col, 2007)

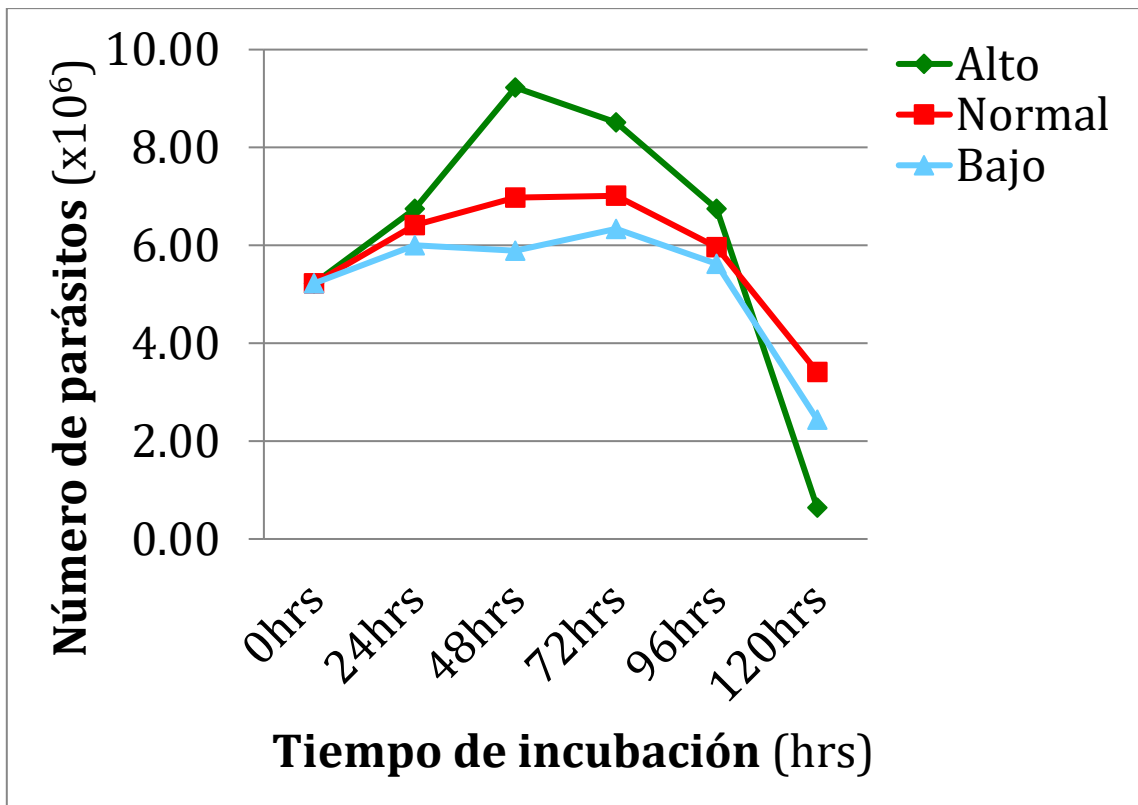


Fig 9. Efecto del hierro sobre el crecimiento de *G. duodenalis*. La cinética se inició mediante la inoculación de 5.2×10^6 trofozoitos a diferentes concentraciones de hierro: concentración baja de hierro $7.7 \mu\text{M}$ (color azul), concentración normal de hierro $100 \mu\text{M}$ (color rojo), concentración alta de hierro $300 \mu\text{M}$ (color verde). Se incubaron a 37°C durante los tiempo $t_1=0$, $t_2=24$, $t_3=48$, $t_4=72$, $t_5=96$ y $t_6=120$ hrs.

B. Posibles ortólogos que participan en la adquisición y metabolismo del hierro en *G. duodenalis*.

En el parásito protozoario *E. histolytica* evolutivamente cercano a *G. duodenalis*, nuestro grupo de investigación ha reportado proteínas que participan en la adquisición y metabolismo del hierro (Hernández-Cuevas y col, 2014; Cruz-Castañeda y col, 2011; Cruz-Castañeda y Olivares-Trejo, 2008), por lo tanto, se realizó la búsqueda del o los ortólogos de proteínas que capturen y metabolizen este catión mediante un análisis *in silico* en el proteoma de *G. duodenalis*. Primeramente, se realizó una búsqueda de proteínas que participen en la adquisición y metabolismo del hierro en *E. histolytica*, posteriormente se utilizaron como sondas en el proteoma de *G. duodenalis* y obtuvimos secuencias aminoácidas en este parásito. Finalmente se realizaron alineamientos múltiples en el programa bioinformático Biology Workbench.

Se ha reportado que *E. histolytica* utiliza a la hemoglobina como fuente de hierro para su proliferación y crecimiento, además se ha identificado una proteína de unión a Hb de 45 kDa (Ehhmbp45) (Cruz-Castañeda y Olivares-Trejo, 2008), por lo cual utilizamos como sonda la secuencia de la proteína Ehhmbp45 de *E. histolytica* cuyo gen ID es EHI_096540 y obtuvimos identidad con las secuencias GL50803_16500, GL50803_15531, GL50803_15162, GL50803_11953, GL50803_14174 y GL50803_10822 del 31%, 29%, 28%, 27%, 27% y 26% respectivamente (Figura 10). Posteriormente, se realizaron alineamientos por separado (Figuras 11-16) para mostrar los sitios conservados de las secuencias de Giardia con la secuencia de la proteína Ehhmbp45 de ameba. La secuencia que tuvo un mejor alineamiento fue GL50803_10822 anotada en el genoma como “WD-40 repeat protein family”, la cual es una proteína que se encuentra en el citoplasma y que tiene función de unión, por lo cual, de acuerdo a su porcentaje de identidad y su longitud tan similar a la Ehhmbp45 de *E. histolytica* podríamos hipotetizar que tiene una función similar a esta proteína de unión a hemoglobina. Además, las secuencias anotadas en el genoma como “Sperm-associated WD-repeat protein” (GL50803_16500), “Periodic tryptophan protein 1, putative” (GL50803_15531), “Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa” (GL50803_15162) y

“Glutamate-rich WD-repeat protein” (GL50803_14174) todas son proteínas que tienen función de unión y a pesar de tener longitudes diferentes presentaron sitios de aminoácidos fuertemente conservados lo que podría sugerir que también presentan sitios de unión a la hemoglobina.

> [GL50803_16500](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=Sperm-associated WD-repeat protein
location=GLCHR04:494199-496349(-) | protein_length=716
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=716
Score = 34.7 bits (78), Expect = 0.023, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 14/45 (31%), Positives = 27/45 (60%), Gaps = 1/45 (2%)

> [GL50803_15531](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=Periodic tryptophan protein 1, putative
location=GLCHR04:871959-873473(-) | protein_length=504
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=504
Score = 27.3 bits (59), Expect = 4.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 12/41 (29%), Positives = 18/41 (44%), Gaps = 0/41 (0%)

> [GL50803_15162](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa
location=GLCHR04:662812-663291(+) | protein_length=159
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=159
Score = 25.8 bits (55), Expect = 7.4, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 14/50 (28%), Positives = 26/50 (52%), Gaps = 2/50 (4%)

> [GL50803_11953](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=Coatomer alpha subunit
location=GLCHR04:898146-901979(+) | protein_length=1277
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=1277
Score = 31.6 bits (70), Expect = 0.23, Method: Composition-based stats.
Identities = 16/60 (27%), Positives = 29/60 (48%), Gaps = 2/60 (3%)

> [GL50803_14174](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=Glutamate-rich WD-repeat protein
location=GLCHR02:891829-893424(-) | protein_length=531
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=531
Score = 32.3 bits (72), Expect = 0.10, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 18/67 (27%), Positives = 32/67 (48%), Gaps = 2/67 (3%)

> [GL50803_10822](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=WD-40 repeat protein family
location=GLCHR01:1298886-1299914(-) | protein_length=342
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=342
Score = 29.3 bits (64), Expect = 0.84, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 15/58 (26%), Positives = 28/58 (48%), Gaps = 1/58 (2%)

Fig 10. Descripción de las secuencias obtenidas del proteoma de *G. duodenalis*, utilizando como sonda la secuencia de la proteína Ehhmbp45 de *E. histolytica*.


```

>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe -----
>GL50803_16500_Sperm-associa MDVSQRYELPPEIARILGTYDADDIPMPEELRGQEALPDSLDFGVDEDF

>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe -----
>GL50803_16500_Sperm-associa DTISLEVTKKRVRELEKSRPGHVDTVLPKADLNTSSIEDYVRNFLAQASL

>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe -----MTSIKGH
>GL50803_16500_Sperm-associa VKTLECFQSEWLEVNAQGNLPATSQFVASIPDALVENRNLHKKISDLEQI
                                     ::::

>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe NAPVTCVNWSLTNNFLFCSGD-----EKGIFRIWDFRTMKTIK
>GL50803_16500_Sperm-associa NAHLKNSAEKARDQYELLRKDRDFHKSCHRRAYQEKVLLNDLRLRDLDC
** :. . : : : * : : : : * : :

>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe AFQAPNKSSITSSQFNDDICFVSSGNEINQLDLRVDGLFIKNVLFKDEAK
>GL50803_16500_Sperm-associa ALYEPLIRDLTERHDSIHRAKQMVALLQDKLESRVNALEETINAMRGDSA
* : * : : * : : . . . . : : : * : * : * : . : : :

>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe DEINKIK-----IDTTNRYGY
>GL50803_16500_Sperm-associa YDDELIRVFTKVQSGLKFGKIIGADGKKVEVQSIIKTPVPKTKGYQD
: : : : : : : : : : : * : *

>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe CDDSGNISVFEFNSNK-----RIVDLVGTHTESV
>GL50803_16500_Sperm-associa LSNPGHFTKLTGQSSSKMDASLIKTIKSKAFPSDAQRLNPLIQNKLEL
. : * : : : : * : : : : * : * : : :

>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe CDLS-----SEFINEIKENNVHLCSDVFDDKEMTLYSTGLD-----
>GL50803_16500_Sperm-associa SDFETVADSRLTLNTILINAHSTVSSVDFHQNRQVMATSSIDGSKVWF
* : * : : * * * * * * : : * : : : : *

>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe -----MTVVKSKLW
>GL50803_16500_Sperm-associa SNHDAQTAPGQLILSGSGHTDFVTSARFCPVINGQTLTLLTTSADTTCKLW
: . . . * * *

>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe NPS-----PKTKYVMNKCSFPKTGT-----
>GL50803_16500_Sperm-associa NIATQQQVLELAEHSSIIWDCWHCTGTSVVTCSDQTTIKIWDITTLTGM
* : : : : : * : : * * *

>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe -----NTLVNPPMAHSIDMNMKGDRLMVACNGMIYWLTTGALKITQS--
>GL50803_16500_Sperm-associa LADEKGSILNVGVEDTDDTLGAGNMTSMTGGFSMISGAQQAPQKTKPGL
: : : * : : * * * : : * * * : : * * * :

>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe -----FEISMGMLQQASYFNHDLRYLIA-----TPNLQCRSSCA
>GL50803_16500_Sperm-associa GYCIGSLRGHMGPVLSVSYEPFGNLVLSSSIDKKIKVWDPRTLTCVRSYS
: . * * : : * * : : * * : : * * * * :

>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe YETVFARN-----FIGIN
>GL50803_16500_Sperm-associa FNITNACKSCWLSLDSGKIAMGDVDGHVVVYDMRAMQPLVQLDLGQKAGVT
: : * : : : : * :

>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe DFSANQTTKHILVADHSCDIHLLSVVEEKEDDE-----
>GL50803_16500_Sperm-associa ALCFDRSSDGVIAACSDSVLRILGVTKGKVHTTVKTNGVVESIQFSRNSA
: . : : : : : : * : : : * : : * :

>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe -----
>GL50803_16500_Sperm-associa VCVTGNDSGEVNVNGV

```

Fig 11. Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp45 de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_16500 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_15531_Periodic_tryp      MNAFIDARTSSIEVCSIGFWITIKMFSSMAWVPRGRLLNHNLKYQPTEAD
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe    ---MTSIKGHNAPVTCVNWSLTNNFLFCSGDE-KGIFRIWDFR-----
      : . : . * .: : : * : : : . . : * : : :
>GL50803_15531_Periodic_tryp      EKAARALMEELKAGVVPDEPEEYDSQSDEEQPEGCEEPQREAPAIQEGA
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe    -----TMKTIKAFQAPNKSSITSSQFNDDICFVSSGNEINQLDLRV DGL
      . : . . * : : : * : : : . * : : : . . : : : *
>GL50803_15531_Periodic_tryp      HAPENIVDODDEEQRDQFQLVNSDNMLICARSAELGFVDCLVYNGQTDDF
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe    FIKNVLFKDEAKDEFINKIKIDTTNRYGYCD--DSGNISVFEFN-----
      . : . . * : : : : : : : : * : : : . : * : : :
>GL50803_15531_Periodic_tryp      FFHNLITSIPLCTVYLDIFSPLNGASGNVCAVSTCSTEIEIWDLDTLD
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe    -----SNKRIVDLVGTHTSEVCDLS---
      . * . * . * . : * .
>GL50803_15531_Periodic_tryp      TISPVLTLLGGFQEVGLKPKKSAPYNYHLKKNRKTQVPLPGSHKDHVLTLS
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe    -----SEFINEIKENITHVHLCSDFVFOKKEMTLY
      * * . : * : : : . . . : * *
>GL50803_15531_Periodic_tryp      WSSLHRNILASGSADETIKLWDLNTAKCIATFSNVHSGGPVSCVLFNPF
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe    STGLDMTVVKS-----KLWNP-SPKTKYVMNKCSFPKTGTNTLVNPPM
      : . * . : : * * * : : * . : : . : . * * *
>GL50803_15531_Periodic_tryp      PGLLASTCIGDRKVAVISVMDPSPAPKILTVLKADPEQLDMLTEDLLCCT
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe    AHSIDMNMKGDOR-----LMVACGNGMIYWLTTGALKIIT
      . : . * * * : : . : : * * * . * *
>GL50803_15531_Periodic_tryp      TEMGELLVLDIKKDPQSAVVGSIPLAEYAVSIDLSPGKAPLTGLSVHPA
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe    -----QSFEISMG-----
      * : : * *
>GL50803_15531_Periodic_tryp      VKGLIAVGGPEIPGIALCAYVADSLTVLHVPEVFEVFSVLAWCTGEDSLS
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe    -----MLQQASYFNHDLRYLIATPNQLQ
      : : . * . * : : * .
>GL50803_15531_Periodic_tryp      LAVGSSNSTAYILQPFGWSLATPIQOVFNIRLDVPSRKQHKLTVDDDEKD
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe    CRSSCAYETVFARNFIGINDFSANQTTKHLVADHSCDIHLLSEVVEEKD
      . . : * : : : * . : . * . : * : * * * * : : : *
>GL50803_15531_Periodic_tryp      VEDD
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe    DE--
      *

```

Fig 12. Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp45 de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_15531 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_15162_Ubiquitin-con -----MSQSYTRRILGDMRRMSEY
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe MTSIKGHNAPVTCVNWSLTNNFLFCSGDEKGIFRIWDFRTMKTIKAFQAP
                                     : : : * : : : .

>GL50803_15162_Ubiquitin-con N--GIFATVDPNNISLCDAVVIGPSSTIWEHGVFRLKVTFTNNYPAEPPA
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe NKSSITSSQFNDDICFVSSGNEINQLDLRVDGLFIKNVLFKDEAKDEINK
* . * : : : * . : : . : . * : * : * * : : *

>GL50803_15162_Ubiquitin-con VRFLSSIIYHPNVYKDG-----
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe IKIDTTNRRYGYCDDSGNISVFEFNSNKRIVDLVGTHESCDLSSEFINE
: : : : : . * .

>GL50803_15162_Ubiquitin-con -----KICLDILTKEWKPVYDLGTVLTSIRSLCDPNPK-----
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe IKENNTHVHLCSDFVFDKEMTLYSTGLDMTVVKSKLWNPSPKTKYVMNK
: * * : : * : . : * . * : * : * * : * . *

>GL50803_15162_Ubiquitin-con -----DP-----ANCDAAEYIYDR-----H
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe CSFPKTGTNTLVNPPMAHSIDMNMKGDRLMVACGNGMIYWLTTGALKITQ
                                     : * . * . * :

>GL50803_15162_Ubiquitin-con LYEMKVRECVRNSWLNPNYDVYKKEE-----
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe SFEISMGMLQQASYFNHDRLYLIATPNQLQCRSSCAYETVFARNFIGIND
: * : : : * : * : *

>GL50803_15162_Ubiquitin-con -----
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe FSANQTTKHILVADHSCDIHLLESVEEKEDDE

```

Fig 13. Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp45 de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_15162 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_11953_Coatomer_alph      MVYAQLNLQTERVKCVFHPKRPWIFSCQNGVELWDYVTKALIDKFRA
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      -----MTSIKG
                                         : : : :

>GL50803_11953_Coatomer_alph      HNSPVRCIDFHPT-QPLFVTGGDDATIKLWLSDRKLLYVFTG-HTDYVR
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      HNAPVTCVNWSLTNNFLFCSGDEKGFRIWDFRTMKTIKAFQAPNKSSIT
**:* * : : : * : * * : * . . . : : * : * . . . :

>GL50803_11953_Coatomer_alph      SVFFHPDIHPYILSASDDNTARIINWQSRQRVADLVGHRDLVMCARWHP
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      SSQFNDDIC-FVSSGNEINQLDLR-----V
* * : * * : : * . . . * :

>GL50803_11953_Coatomer_alph      EDLIVTASMDATVRVWDISSIRTKGATGRFQQLAMQALSLPHTIISSSV
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      DGLFIKNVLFKDEAKDEINKIKIDTTNRYG-----
: * : : : : : * . . . : . . . * :

>GL50803_11953_Coatomer_alph      GTGHGRGVNWSWMPDAGNYFLSGSDDTCKKLWHLTRGSSTGLSLLGPDA
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      -----

>GL50803_11953_Coatomer_alph      LLYCSSTIEKHTGNVSVVEPSVRNVI LTAGVDGRCLCLFSLSNRAYIGSIT
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      --YCD-----DSGNISVFEFNSNKRIVDL-----
** . : * : * . . . : * :

>GL50803_11953_Coatomer_alph      VHDLPTATVSSLAPSDHKMLRWSLREHPTINMWAAGHDGGLCIFSTQL
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      -----VGTHESVCDLSSEF
. * . . : * : * : :

>GL50803_11953_Coatomer_alph      EESVGTVEGDTCYFIDSHKLISTNLKAIVADASTKPTVKVEASLIKQтар
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      INEIKENN-----
: : :

>GL50803_11953_Coatomer_alph      SGAFGSSVVVVEPVDIIVMGNPFPIVSYWDGKNRFIVPYATLKDCSPSS
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      -----THVHLCSDVF
: : : **

>GL50803_11953_Coatomer_alph      YDPKNVIEVSSNVARLSASHVAWIQRSSEGLVLAVAVFGTGGGLTIKTMHP
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      FDKKEMTLYSTGLDMTVVKSCLWNPSPKTYVMNKCSFPKGTNTLVNPP
: * : : * : : . . * . . * : . . . * . . *

>GL50803_11953_Coatomer_alph      VSSTVLSVFPGRTESEVISSPTKLSLYTLNLSLNQPIVLLKLSVLPQL
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      MAHSIDMNKMG---DRLMVACGNGMIYWLT--TGALKITQSF EISMGM
: : : : * : : : : : * * : : * . . : * :

>GL50803_11953_Coatomer_alph      IQHAYYSNDQYQLAVVAHEFVALINMDFTINTSQMSHTAISRGVWGLIG
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      QQASYFNHRLYLIATP-----NQLQCRSSCAYETVFARNFIGIN-
* : * . . : * * . . . : : . : * . * . : * . * :

>GL50803_11953_Coatomer_alph      RGLEESEQRATANAFIYSTYTHICYMLPFISPTASEANRLAAHTQKISRVT
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      ---DFSANQTTKHILVADHSCDIHLLESVEEKEDDE-----
: * : * : : : : : : : * . . . :

>GL50803_11953_Coatomer_alph      KPIAGILTSLNRPICIVSASGQVIVYVLDREGLKCI EFDSRVAGLVQAVA
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      -----

>GL50803_11953_Coatomer_alph      SGRADDASIMLARLQNTPLGLSLSKTL LDMNRPDLALALPKDEIQIRDE
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      -----

>GL50803_11953_Coatomer_alph      LALNLGLLDHVCHDTKSQSANSYHIWLRIFAESLAQQGLIARDALLKIA
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      -----

>GL50803_11953_Coatomer_alph      RIDLLGFLLSLYNTT LSGSLSKLDYSRLSTSSSIQECLNAAVLVGDKSLF
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      -----

>GL50803_11953_Coatomer_alph      HSTLLRAGLSIPAKIFGEANGIDTPVEQASAPPVSPTKTISIGKKITVPL
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe      -----

```



```

>GL50803_11953_Coatomer_alph      RKGSLRNYPTTSLLNITYESLMREIASAAEHELPAEGKRYQGHWGSDDDDDVD
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     -----

>GL50803_11953_Coatomer_alph      CVLPAEPVKGSVQMTSGPSEPLDATQASEAAAADSAIIVPSHGVMVSKHP
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     -----

>GL50803_11953_Coatomer_alph      LLGSNSEKEEFLASNGILSEKSLSILKPHIDKLASHNKRLQEVTPMKGLS
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     -----

>GL50803_11953_Coatomer_alph      IWPISDSLSVDTIDTMQREFSSIMEKVDTGAFADALAPLRLLQRALL
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     -----

>GL50803_11953_Coatomer_alph      ACTFAGPNDHDDLSTLVLNSTLYILALSCELRATEKVATPERVCELYV
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     -----

>GL50803_11953_Coatomer_alph      LFSLQNMKTNHALLALRLAISGTRKRYGAYSHCKQLAQRFIQLSQLPEARS
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     -----

>GL50803_11953_Coatomer_alph      LDVCQSYLPKAKKMAALEDEDVVQLSFSAADQDTVMLCAVSYKSIKGPHC
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     -----

>GL50803_11953_Coatomer_alph      ICSACKTCACDQYLKASCPVCELGTGVKA
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     -----

```

Fig 14. Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp45 de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_11953 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_14174_Glutamate-ric      MQMSDREDSLGSSADEHPECALGGEELVELKSVADLPNYKADFDVDSPEP
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     -----MTSIKGHNAPVTCVNWSL
                                   ::: : : * . . .

>GL50803_14174_Glutamate-ric      RREIYLPHTAQKQPNSQHEELEYNPSTYDYLHRFTVWNPVLSLDPIDVNF
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     TNNFLFCSGDEK-----IFRIWDFRTMKTIKAFQ
                                   .:: : : * : : * . : : . *

>GL50803_14174_Glutamate-ric      GLNRSEFPHQLLLLGGCQVDRNCTEMGELVLYHFTDVSSTRFEEDSSLDP
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     APNKSSITSSQFNDDICFVS-SGNEINQLDLR-----VDGLFIKN
                                   . * : . : . : : * * . . . * : : * * : : . : .

>GL50803_14174_Glutamate-ric      TLIQRKIDIPATVNRIRSGTSFYSNCPAGSAAIAGLWTDGDISFINCA
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     VLFKDEAKDEINKIKIDTTNNRYGYCDDSGNISVFEFNSNKRIVDLVG--
                                   . * : : . . : : * : . . * * : * : : : : . : : : .

>GL50803_14174_Glutamate-ric      PLLKSAGVGAFASGEYWHTSTGASLAGAGAIQIPPIHTETSMPVGLTKKP
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     -----THESVCDLSSEFINEIKENN-----
                                   * * : . . : : * * : : .

>GL50803_14174_Glutamate-ric      QKSKRAKGRSTLEVHLANPLCIHATDNNGIEGYALACNPVRSLWLAGDCQ
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     -----THVHLCSDVFVDKKE-----MTLYSTGLDM
                                   . * * . . : : . : : : : * : : *

>GL50803_14174_Glutamate-ric      GFLRAFHMPPDGSVAVDNTRKQPHNDSIEDIVFAKTGALLESSCFATCSC
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     TVVKSKLWNPS-----PKTKYVMNKCSFPKGT
                                   . : : . * . * * : : : . : . * . .

>GL50803_14174_Glutamate-ric      DGRLI IHDPRTAASTYAFNVGSADVNVCDWNFFNENLLVTGDAGQLCLW
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     N---TLVNPMAHS-----IDMNMKGDRLMVACGNG--MIYW
                                   : : : * * * * * : * : . : * : * : : . : : *

>GL50803_14174_Glutamate-ric      DIRSTTAPAGAFPYHSQAITSVKFSPNDPSLFAATSDDGVLSIWDHEIEN
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     LTTGALKITQSFEISMGMLQQASYFNHRLYLIATPN-----
                                   . : : : * : : . . : : * : : * : .

>GL50803_14174_Glutamate-ric      DDVEIAGADFTTDAVSQLNQLPKELLFLHMNLQEPKELAFHPQVSGAMF
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     ---QLQCRSSCAYETVFAR-----NFIGINDFSANQTTKHILV
                                   : : . : : * * : : : : : : . . : .

>GL50803_14174_Glutamate-ric      VTDANGIQLFKPINVGIEYDEIEKDSOVEDS
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamoe     ADHSCDIHLLESVEE-----KEDDE-----
                                   . . . * : : : : : : : * : .

```

Fig 15. Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp45 de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_14171 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_10822_wD-40_repeat_      MQVTSGKNS-ALYLSFNQDGCITVGTNRG--FRVFNTVPPRPLYGRDFP
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamo     MTSIKGHNAPVTCVNWSLTNNFLFCSGDEKGI FRIWDFRTMKTIKAFQAP
* .*:*. . :.: . . : . : . **::: .: . : . : *

>GL50803_10822_wD-40_repeat_      DGCSSVAMLFRSSILAIVGTGMNSRYPKDAVTVYDDQSGRTIGEVHFRTP
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamo     NKSSITSSQFNDDICFVSSG-----NEINQLDLRVDGLFKNVLFKDE
: .*: .: * . . * : . . . . . : : : : . * * : * :

>GL50803_10822_wD-40_repeat_      VLNACHTREKIFIVFENKVFVYNLSDMRLLDSDTYPNPHGIFSVVGDTD
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamo     AKDEIN--KIKIDTTNRYGY-CDDSGNISVFEFNSNKR-IVDLVGTHE
. : . . . . . * * * * * : * * : . * : * . : * * :

>GL50803_10822_wD-40_repeat_      VMIATLGLRMGEVLIKRYSANMSATYLVNICHENDIRCLNFSLDGRFIAT
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamo     SVCDLSEFINEIKENNTVHLCSDVFDK-KEMTLYSTGLDMTVVKSKL
: . * : . : . : . : . : . : . : * : . : . : . :

>GL50803_10822_wD-40_repeat_      ASSKGLTIRVWTTDSFQKI-KEVRRGSEKADIQSIGFSPDSSIIAVTS--
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamo     WNPSPKTKYVHNKCSFPKTGTNTLVNPPMAHSIDMNMKGDRLMVACGNM
. . . . * . . * * * . : . . * . . : . . * : * .

>GL50803_10822_wD-40_repeat_      -SRKTLHTFYVMQPTQMA YGMQPQADNKKHKM QFMSTINKYFD-SEWSF
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamo     IYWLTTGALKITQSFEISMGLQQASYFNHDLRYLIATPNQLQCRSSCAY
* : : : * . : : : * * * : : : : : : * * : * . : :

>GL50803_10822_wD-40_repeat_      AKIALDDPVS LCRFITNDCMIVVCGDGSYYKLRIANNAIEKENFLNMLTD
>EHI_096540_Ehhmbp45_Entamo     ETVFARNFIGINDFSANQTTKHILVADHSCDIHLLSVEEKEDDE-----
. : : : . : * : * : : . . . : : . . . * * :

```

Fig 16. Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp45 de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_10822 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

El patógeno *E. histolytica* puede crecer utilizando diferentes fuentes de hierro tales como; hierro libre, lactoferrina, transferrina, ferritina o hemoglobina. Por otro lado, este parásito es capaz de proliferar en presencia del grupo hemo como su único suministro de hierro. Además se ha reportado que Ehhmbp26 es una proteína relacionada con el mecanismo de adquisición de hierro en este protozoo (Cruz-Castañeda y col, 2009). Por lo anterior, se utilizó la secuencia de la Ehhmbp26 de amiba con el gen ID EHI_022250 como sonda en el genoma de Giardia, obtuvimos el 42% de identidad con la secuencia GL50803_137684, 27% de identidad con GL50803_24980, 23% de identidad con GL50803_16693, 22% de identidad con GL50803_16157; los cuales están anotados como proteínas hipotéticas, el 30% de identidad con GL50803_14568 la cual está anotada como “Ser/Thr protein phosphatase PP1-alpha 2 catalytic subunit”, el 28% con GL50803_16592 anotada como “ABC transporter family protein” y el 27% con GL50803_16595 la cual está anotada como “Liver stage antigen-like protein” (Figura 17). Después se realizaron diferentes alineamientos por separado para mostrar los sitios conservados de las secuencias de Giardia con la secuencia de la proteína Ehhmbp26 de amiba (Figuras 18-24). La secuencia que tuvo un mejor alineamiento fue GL50803_14568 anotada en el genoma como “Ser/Thr protein phosphatase PP1-alpha 2 catalytic subunit”, la cual es una proteína que presenta actividad de hidrolasa, sin embargo, podría actuar como una proteína de unión a la hemoglobina por el alto porcentaje de identidad y la presencia de sitios conservados de aminoácidos idénticos con la Ehhmbp26 de Entamoeba. Por otro lado, las secuencias con el gen ID GL50803_24980 y GL50803_16693 anotadas como “Proteínas hipotéticas” las cuales presentaron una longitud muy similar a la secuencia utilizada como sonda podríamos sugerir que también presentan una función similar a la proteína de unión a hemoglobina.

> [GL50803_137684](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB
product=hypothetical protein
location=GLCHR05:3608004-3612014(-) | protein_length=1336
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=1336
Score = 28.1 bits (61), Expect = 1.7, Method: Composition-based stats.
Identities = 13/31 (42%), Positives = 20/31 (65%), Gaps = 0/31 (0%)

> [GL50803_14568](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=Ser/Thr protein phosphatase PP1-alpha 2 catalytic subunit
location=GLCHR04:933447-934424(-) | protein_length=325
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=325
Score = 25.4 bits (54), Expect = 8.2, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 18/61 (30%), Positives = 28/61 (46%), Gaps = 1/61 (2%)

> [GL50803_16592](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=ABC transporter family protein
location=GLCHR03:1285617-1292381(-) | protein_length=2254
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=2254
Score = 28.5 bits (62), Expect = 1.2, Method: Composition-based stats.
Identities = 29/102 (28%), Positives = 46/102 (45%), Gaps = 19/102 (19%)

> [GL50803_16595](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=Liver stage antigen-like protein
location=GLCHR03:1265109-1270544(+) | protein_length=1811
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=1811
Score = 27.3 bits (59), Expect = 2.6, Method: Composition-based stats.
Identities = 17/62 (27%), Positives = 36/62 (58%), Gaps = 4/62 (6%)

> [GL50803_24980](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=hypothetical protein
location=GLCHR03:1121773-1123335(-) | protein_length=520
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=520
Score = 29.6 bits (65), Expect = 0.49, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 17/63 (27%), Positives = 28/63 (44%), Gaps = 4/63 (6%)

> [GL50803_16693](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=hypothetical protein
location=GLCHR05:3448786-3450252(+) | protein_length=488
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=488
Score = 28.1 bits (61), Expect = 1.3, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 19/82 (23%), Positives = 40/82 (49%), Gaps = 2/82 (2%)

> [GL50803_16157](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=hypothetical protein
location=GLCHR03:1674725-1677046(-) | protein_length=773
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=773
Score = 26.6 bits (57), Expect = 4.5, Method: Composition-based stats.
Identities = 33/147 (22%), Positives = 66/147 (45%), Gaps = 24/147 (16%)

Fig 17. Descripción de las secuencias obtenidas del proteoma de *G. duodenalis*, utilizando como sonda la secuencia de la proteína Ehhmbp26 de *E. histolytica*.

```

>GL50803_137684_hypothetical      MEPEITRSQMFQAANEDDCVVLQMNLNDFQRALDSKGETALMVAVRAGNL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_137684_hypothetical      AAAHILAEVESKMTTPTGHTALMLAAGSNNTDLCRLLAPLESGITTDGTG
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_137684_hypothetical      NALMVAADTGSNDALRVLVDHIGDDTDEGHTALFYAALSIGHIQCATILV
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_137684_hypothetical      RAFPPTKKELVSCIDMATTQGDVQMLDFLNGLLQEIVGSDSINDVIRECR
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_137684_hypothetical      SAAALERSISKGGEPTSIDHVSYDDTRVNEACCSANVSSDDHQHATVDSM
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_137684_hypothetical      YPYSVYASPPGTDTPWDLDSKNDLVVSDTSIDVRSIQTGE LHANLQQGGA
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----MSQVILPSEFQRILTIAKA
                                   : * ..*:: * . *

>GL50803_137684_hypothetical      SIFNSSSPTRRDIGRKGE EIANLRSQLYTATYEQRLQNLKEQSCRSWE
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     FITTVP-----DIDIILNGHYNIIFESKTVSELYLR-----WA
                                   * . . . . * . * . * . * . * . * . *

>GL50803_137684_hypothetical      NKFNSLDNSFTTPTPDADIRRLQDKCSSLELQVSS--LELRNKQLRMSL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     PLFWNFLRNPNIIPFDKCLKLFTYFSPCSKQPLQSNGLTKMTDDQLMLSL
                                   * * : .. . * . . : . ** . ** . * :: :. ** : **

>GL50803_137684_hypothetical      DDIEQGQSSKVLPAAKNEGVT EELTVEQILEFLRNKDSAEQVYNDLKR
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     NEVIKRNRLRMDPIFYQKYIKERNAVEHFKSFLQLLK-----
                                   :: : : . : : : : . * : ** : : ** : *

>GL50803_137684_hypothetical      SMSVPEQSSTGRPQSIVPIDADTDGPCNNVDDVGSNCPTSHSSSIEMVE
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----AHDNMRKDPVEIVV
                                   . * . : . . : * : *

>GL50803_137684_hypothetical      MRSPTPGCTVVPGLEERLE ENLSLQAEVEALTRQLATRDEQIKTLRQEL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     DP-----FYFAGVELKRKEE-----REELIQLILKEF
                                   ..* : * : : * . * * * : : * :

>GL50803_137684_hypothetical      YDLRQSQLKMSMTMGPSMESVRPQIASNKYDLSETNHEIEVDMTISNTSF
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     QRANQNTLEQIFNS-----LKVSQTQWDELNFDQYS---
                                   . * . * : . . : * : * : : * : : .

>GL50803_137684_hypothetical      SFPESHYGTGKESAGSNQMA SEGREYVMSFDIGTDQDIRYREPPTAKLPP
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----VKDLKSLLYLFN-----
                                   . . : : . : * :

>GL50803_137684_hypothetical      LPGTKSNEFTEINASVVQIKLNKVQLELQEAALDDKQVILEQLREERDEKS
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_137684_hypothetical      QLVSELTVCRDTIDHMTSEIEELKDRLEDESLAKESTLSNDIILELRGRMTS
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_137684_hypothetical      SPRPGEGSPVSVLGFNDNNQQPSPKMDDIYDIIRNSNSYHELLIKLNFS
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

```

```

>GL50803_137684_hypothetical      PDEIDDILSHQKAYDRDDPADDPPKNLVHEISTINLRTGAVSHLPADDE
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_137684_hypothetical      LEKELTRLQNSNDDLEKKCMDLQSSNVVLSAEAGKLASEIIDLRELLKEQ
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_137684_hypothetical      EKKYADILAEKAMLEARPAYAHNRANHDSLYEIQPEQKEIEACTNVQTKGP
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_137684_hypothetical      QAPLSTQSTRPASLRGEGDSHVYASGGNDDRATSYSGSITDELCKKISS
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_137684_hypothetical      RRGSSVRQEKSQSGRRNPFDMRDYVPGDEEDSYLAALQDERDRRMTTQD
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_137684_hypothetical      LEPGSSMTSTTTSTASFCLNLIDGIYTNVTPLMRAVLNDKISEVDKNLHY
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_137684_hypothetical      VRKTRSDGATALMLAAYLDRAQIAEKLGPLEANIRGPENLTALEIALYKG
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_137684_hypothetical      NYATAAILRSLEGIDIGNGIKVTRRHTDLMTAVTENNPLTVWCLIPLQG
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_137684_hypothetical      RVQDWSGKTALMHAVEQKRTFCARILATAETRIQDRNGFTALMYAVVMGN
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_137684_hypothetical     >NNLVNLLVEDEAGFVGRWHERLPSKFTALILACYHGRLKAATILLPFEGG
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_137684_hypothetical      MKDSIGRGPKYAQNCSPRVPPQVRASLIDLFSQDYKYK
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

```

Fig 18. Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp26 de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_137684 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_14568_Ser/Thr_prote      MPLNVDSILYRLLSVRGMKPGSQVDLPEHEIEELVNKAFEIFISHPVLLLE
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     ----MSQVILPSEFQRILTIAKAFITTPVDIDIIILNGHYNIIFESKTVSE
      :.:.: . * .: . . . . :*:.: * :.:.: . : *

>GL50803_14568_Ser/Thr_prote      LEAPIKICGDIMGQFYDLLRLEFYGGFPATNYIFLGDYVDRGKQSLLECI
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     LYLRWAPL-----FWNFLRNPNIIPFDKCLKLFTYFSPCSKQPLQSNLGL
      *      *:.: * * :      . : :. . . :. : * * . :

>GL50803_14568_Ser/Thr_prote      ILLLCYKIKYPENFFMLRGNHECSSINRIYGFYQECKTRYISINLWKFKR
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     TKMTDDQLMLSLNEVIKRNRLR--MDPIF-YQKYIKERNAVEHFKSFLQ
      : : : . * .: *.*: : : * : : : * * :. : * * :

>GL50803_14568_Ser/Thr_prote      CFDALPIAAVIDDKIFCTHGGLSPELSSLNAIQKIVRPTEVPDSSLCDL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     LLKAH-----DNMRKDPVEIVVDP-----
      :.*      :      :.:.: * *

>GL50803_14568_Ser/Thr_prote      LWSDPEPGITGWHENDRGVSFTFGHDIVMKFLKKHDFDLICRAHQVVDG
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----FYFAGVELKRKEEREELIQLILKEFQRAN--
      : * :. : * :. :. :. * * : .* :. :

>GL50803_14568_Ser/Thr_prote      YEFFAKRRLVTIFSAAPNYCDEYDNAGAMMSVDDTLMCSFQILKAMNKDSY
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----QNTLEQIFNSLKVSTQWD
      :. * * * * : * * . :. :

>GL50803_14568_Ser/Thr_prote      NSLGYSGYNQNRPGSPQKSSGRANY
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     VELNFDQYSVKDLKSLLYLFN----
      .*:.: * . : * .

```

Fig 19. Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp26 de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_14568 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_16592_ABC_transport      MRTRSLYTSQYRAIIFKQYVDMIQGGWLILFLRFALPLILVLVLYLNPLV
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      AYYQSSDNLKPTIWPDEDMRVKCFVLDDANGRYGFGTLIPDQTRNCKTL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      GFYPDNPYVRKVMKKVAEQSGLDFDLDLQGFSTRVEAENTLRQDPKHFTF
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      MIGFDAPFEKQSGTSGGQTPSSDKEILSDLSILINYNQTLAFPNFYA
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      FYLRDQVSMASARGMAATVPLRVQMALGRAILLVSEGIGVDFNPRLTQLP
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      FNIMAAATITMFGLFFSSFLGTIKLGMSIGFVMVAGSFVETMVFMTTPE
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      RIYDPTFINQFGAFLLQLLFPFTPIIQTTLQMVETAMPTSDANPRTFEMQ
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      LVSPKNPWFSTWFRGESSPLNQPVDKQSICTYRAPPVVVYLVFMLLD
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      TILYFLITWVFSEAVPSHSSLCRKPWQLFTKDYWSTSGEGYSLSSILDDR
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      ESRYRRRLAKRDAYKKAGITNAHTVDYSLDDEYLPVLDATGDVLERAPHT
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      FRATAQQPDGTESLCCVCFRKARRQKGESDFLTGRQPVPVGSVFEAVLRSL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      LPLDSKVSSVLRHTMTASNKNTVLVTHLQKTFVRKACSGSKEDKNKVG
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      KYHYAVRGLTIRICHGQIFGLLGQNGAGKSTSINCIIGSLHPDKPPKNLL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      ESPLSARNPCIGNGWIDDYSILYQMNHIRRKIGVCPQHNTTLWPLTPVQ
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      HLKLVCLLHNIPEFEIPMLVEKHLRQVALYEYRDKPCKKFSGGMQRRLCI
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----MSQ
                                         :.

>GL50803_16592_ABC_transport      AIATCGYHKKLLLFDEATTGTDPETRKRIVWSAIQKTSRNHMNVPVVTGSAK
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     VILPSEFQRILTIAKAFITTPD-----
.* .. :::* : :*  * *:

>GL50803_16592_ABC_transport      GKDLHVKRIHRPPPGILLTSHDMTEVDYLSDEIAIMSSGKVIASGTSLEL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----IDIILNG
                                         * *: .*

```

```

>GL50803_16592_ABC_transport      KRLYGSGYOFIIASSTKAANVMSELVKYWLOOSYPEIEYVTKTTDTADF
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----HYNIIIFES-----KTVSELYLRWAPLFW-----NF
                                   ::**.*  :.:*** *   :                               :*

>GL50803_16592_ABC_transport      LREKSQPRIGLINQTGQSLVYSVNLMAEYALPGFILFVETHKTGRHTLDE
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     LRNPNIP-----FDKKLKLFTYFSPCSKQ-----
                                   **: . *                               : * * * * *

>GL50803_16592_ABC_transport      NSQEIVRDIPSVGSLSLGDNRLGSLGPLVADYQLEGTTLEEVFIKLGKIY
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----PLQSNSGLTKMTDDQLMLSLNEVI
                                   ** : : * * * : : : : . * : :

>GL50803_16592_ABC_transport      QAGVFSQMDKYTSQQDALQGVNIKELANLSSTLDHTSPSNIDNKLPNQGS
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     KRNRLRMDPIFYQKYIKERNAVEHFKSFLQLLKAHDN-----
                                   : . : ** * : : : : . : . * . .

>GL50803_16592_ABC_transport      SALGEDQQLPQHATDVSVDSDMSDPALLKYTDAEAHDTLINGEEIRIEKF
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----MRKDPVEIVDPFYFAGVELKR--KEEREELIQLILKEFQRA
                                   : : : : : ** . * * * * : : ** : : : :

>GL50803_16592_ABC_transport      TKSIRYSNMQRGGTGRIYVFDKTRGFGSGIDETIVLQDALRHRMVYS
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      YNLTVNNTTIPFSSVDYKVFTVMGLPVSSSIKNQVSVAMSSFMSTKFDSL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      FTDLSTSGGTNYLDYFSVKPLAVPMYTSTTTISDDFQLKPDFYFVNGYSK
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      YDTIDTLLELLYIQRSGGIPRPEGTVYYDRCYSEPVECGNLTKRVYVDP
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      TDLATIQQCYNYVLSKVPLAVLEFDTAESYSETGGIKVLRPVIHSYLPAK
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      LGNYPYKRLTLRLRFNTTSIVQRAKEFGINDIMSPGTSVNSSITLPPAK
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      APSIIEETSLLDTRAITIHNEVHARLVEAIARASYGISPAASYTSPATSI
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      NIRFGLQPWDWVWTFPITSGEDKMKVLLALIMLALACMSMVPMMFVVL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      DRQQGLRQMFKLNGVPTWLYWCANFIYQLCFAVLVYSVMVVLGYFVFKLS
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      LLRKMDFGMILLVFTAGAYGQLTTAFLFSLFFPNTQLSTLVGNILIIVLA
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

>GL50803_16592_ABC_transport      IVLMIEGEVQTENLLWYFFTPMMSFAAILGFVGWSAQDFKFSFMNSPMRW
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoe     -----

```



```

>GL50803_16592_ABC_transport      LILGMWVEGTIFFLLTIYFDYIIPRESNGVPLPWNFIFTCCCKRSKSSNG
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16592_ABC_transport      ASTFNLNADLVSIARDSQLTNGSASTRLVLTKAVPESTDQLLATATMLT
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16592_ABC_transport      DVSTITGISALEADSVEGCRCQTSPGSLVGCIEEETDGTYLDSSTYVRP
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16592_ABC_transport      PINVQLNAMPTHRKKALPPRTGRDYAVRTGQAEMDIDVLAERQYMYNGI
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16592_ABC_transport      RSTTPVIVCNLQKFYPPAFVAVRDVVSFHLPRSTCF AFLG SNGAGKSTTIS
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16592_ABC_transport      MMTGLIKPTKGTVIINGWDVRRDPSEIYKSI GLCPQH DAYIPI LSVRDHL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16592_ABC_transport      TLFARLHGVSKADEKNVVEKLASFVYLYDVLDRQARQLSGGMRRRLSLAL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16592_ABC_transport      ALIG
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    ----

```

Fig 20. Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp26 de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_16592 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_16595_Liver_stage_a      MEDIAYTDGYAAQYGDNYAYDGYGGDLAVGDYNPYGTDYGYDAGGYDY
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      GAGYGGYGNQETGYGDQTYGYGEPAEQPQDSLKLDPEKPFTEQDDGRS
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      LVVRTDAASVSMDFPSAPIDTVTEPIGSQHTHTSSAFPPVSQDLLNSIRVQ
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      QETSGNLSKSPSKISSRPASARLDELDKVIEEDAQLNREAKTDTHTVGA
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      APDTSDFMGFTDQPAAPTATEEPVATAGDDMFGFGLSEDAHDATVQPPVE
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      DAGPALPDKEAPSTEAEDDMFGFATSPQETIASPPAGSTAPAAEPVDDMF
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      GFTDPAVESAAATAEPGTMEGDDMFGFGPSESTPKDPDASAVAKDVTVD
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      AQDAADDMFGFDGAGSPAEPQSTEAVASPVADLETDSMFGFDSPPAPA
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      DNTTTPVDDSAADLFGFGPSTLDAQGEPAQQAQPDIQDVAQVSADSMFG
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      FDLPADASATVEPSTTGLATEKPEDSPVDDMFGFSPNEAAATAKSDDEQE
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      ITPVNTKTLDEPLSVANDYTQPTAGPSDDMFGFGNSADLPQTDSVPHSGA
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      TADSMFGFDSVPATGASVEPPTETPELHDASQTQPTLDMPTIPEHIPTIE
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      DNQTDLSHESQNESQVASEESDQLRETNETLEGEEMNKELAQEPAVEDMF
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      GFGDASAPVEDSSTEKATESHPTEPPNLADLPPPVSASSLLPVQTLESAK
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      QSARAATTPVADMAIDIDSMSAALVPQQPSAPEQKVEDQVLDESSPNV
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      ITAELPPIVVKGSLEEANDKSAESQHEPVELSEDRDLSKDIELVAQDPL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      PAEEDTQDIFVEPAVPVEALERLAISETFIKLQEELQFTYLMPEPNREEL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----MSQVILPSEFQRILTIAKAFITVDPIDIILNG-----
                                     : : : * * . * : * : * * . : : :

>GL50803_16595_Liver_stage_a      DKLQMTDHEQQLIQLKDEAERLQRENKVLAGRSAAPRHLHPNEFDSKISIS
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----HYNIIIFESKTVSELYLR-----W
                                     : * : : . : : : : * :

```



```

>GL50803_16595_Liver_stage_a      VSFFEGLLNEPTHS DGISLTTGEE LRL LAILEQGDYFALDALHGMSPEEL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    APLFHNFLRNP-----NIPFDK LKLFYFSPCKQPLQNSGLT-----
..* ..*:* ..* ..* ..*:* ..* ..* ..*:* ..* ..* ..*:* ..*

>GL50803_16595_Liver_stage_a      QLMEQREREFN LK LKELTDRRDELLYKDDTEALKLIEEEI WAFVDAEEEEK
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    ---KMTDDQLM LSLNEVIKRNN-----
: : : : *:*:* :*:*

>GL50803_16595_Liver_stage_a      KMRIQAADDLLK KRAQEEDRRRAEIEAKIKEEQDRVAEERRLQEEMIAL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----RLRMDPIFY
*:* : *

>GL50803_16595_Liver_stage_a      QKKQQQEYAEQETR KADLLREAMEKEQLERIEEEQRIKAEARRRLIDDL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    QKYIKE-----
** :

>GL50803_16595_Liver_stage_a      ATAERAAAEDRIRV KAELEEMARIKKELEFAARTASEEKRLLLQQKEQL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      EREMAETARRHEEDVARRH KELQTLHEERRKMREQRLASSEPMDELLRED
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----RNAVEHFK SFLQLLKAHDN-----MRKD
* : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

>GL50803_16595_Liver_stage_a      GNDASADPF SYASLDIERRIREMKAQLEKEMTEKMALEHADLNALEQELA
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    PVEIWDPFYFAGVELKR--KEEREELIQLILK--EFQRANQNTLEQIFN
: : : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

>GL50803_16595_Liver_stage_a      AKKLS TLQAERLLSTAASDTVARLDNEDRLFNEAMDAKRQELLLLKEQYG
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    SLKVSQTQMDVELN-FDQYSVKDLKSLLYLFN-----
: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

>GL50803_16595_Liver_stage_a      LVRHQNESQRALHLEEQRKAKKLARLVEQVAELAEKKNLERKIAHGNGE
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      FHKKESKLVASNSKGAL KALRKEHAKEHEALETQLSSVSEQLRRAKKQLK
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      VLNPQGETSDMDRSLSVKDYLRSTDRSEKEQEVSAADKDHSPRLSVFEG
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      GSLGQPSLVSGHGIGTAMSTGVDHGDGGRKQHASSDL PVALQKLREEHAR
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      RLEKIEQRRAAFASEREQLQAQAHAEALQSKPVNVPDSKLR TREQRKQI
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      IFAEMNRMEKLSKAHPVEVKPQIPEKTIDDILNERRKRHGEEREQLKNMA
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      VRFTSAYDRHSRVSVNMDSSDDEWINDLAARTSSRYADISAKPRSMQAQVR
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      QFASDRIDPAFNSYIEAPVRPGYESSLLSYVKVSSDPTTCHPTKFVARLT
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      AHTWCIEQSKSPYVVYFTISTEKGVEVAKRFSELRELDKALRRVFPTV
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

>GL50803_16595_Liver_stage_a      KVRHDILVYHR
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----

```

Fig 21. Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp26 de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_16595 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_24980_hypothetical_      MSGENEYEDDFLSYQSDFDPSSEQDSPQQLKEAYQALELKGNAYTAPSN
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     -----

>GL50803_24980_hypothetical_      ITISQGTIAFSQPPMDYRKKKIEGICKEQFVRTLQQFVSRGTSTYHATES
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     -----

>GL50803_24980_hypothetical_      ITRGVQMPSELLTNHGFQGGVTLAESLMTIALTGQAKSSDMEDLPAQTAQ
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     -----MSQVILPSEFQR-----ILTIAKAFITTPDIDIILNG---
                                   *..::  *::      ::*** : : . *:: :

>GL50803_24980_hypothetical_      VRNKSI LRNLNMMKEKLITRGTRETRMGFLMEQCVPFPGGFVALIAVKLL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     --HYNII FESKTVSELYLRWAP--LFWNFLRNPNI PFD-----
                                   : * : : : * : ..      .** : **

>GL50803_24980_hypothetical_      EEELEESYPLEEEVYYP LNRVLMYQFL LISCDLSLTVTHIYTG RSGAQQR
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     -----K K L K L F T Y F S P C S K Q P L Q S N S G L T K M T D D Q L M
                                   ::: : : : : ... * . * : . *

>GL50803_24980_hypothetical_      MPVDFILVPSENDIPPRIVLFSRRISHMGKDTTQPKRPYASNDISILTVP
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     LSLNEVIK-RNNRLRMDPIFYQKYIKER-----NAVE
                                   :::: : :  * :  : : : * ..      : *

>GL50803_24980_hypothetical_      FLEGFYEVYPYKPSDNFSPPPSKILWRVAHRVAKNITVIGLGDGDSLSYMW
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     HFKSFLQL-LKAHDNMRKDPVEIVDPPFYFAGVELKRKEEREE-----
                                   : : * : : * . ** : * : * : : .. : : : :

>GL50803_24980_hypothetical_      YDDLNCEISVCPVTIGSLADGIAVLSIHSISFSSHSADKNVLMHMTNGL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     -----LIQLILKEFQRANQNTLEQIFN---
                                   * : * . : * : * . * : : *

>GL50803_24980_hypothetical_      LVVQFMAHHALASEIQRLLLESCSAVSTIAPGTAL SQNAYYNPLHTAVRSV
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     -----SLKVSQTQNDVELNFDQYSV
                                   . : ** . : * : **

>GL50803_24980_hypothetical_      KRIPHVTIRASALYNGITCIQYTDGVIECFGPAISERLGVCLMRKDGLD
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     K-----DLKSLLYLFN-----
                                   *      : * * *

>GL50803_24980_hypothetical_      VLMGFISEATAERIHKELQD
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     -----

```

Fig 22. Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp26 de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_24980 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_16693_hypothetical_      MLRLETKQTGVITIKNIGKGLVNHAIYSNKIREILSHYPTGHYMSLVSAY
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----MSQVILPSEFQRILT-----
                                     :..* ..:..**
                                     :
>GL50803_16693_hypothetical_      SPLSIFDSIGAFNITDVTANQTLFEFDGVAKNLADLISHSISANVEINIT
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----IAKAFITTPVDIIDI
                                     : . *:: :*:
                                     :
>GL50803_16693_hypothetical_      EDGFVRFILTQAITAENHFINLNLSPSAAWALGFGTTKQLFSRNLPPQGER
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    LNGHYNIIFESKTVSELYLR-----WAPLFWN----FLRN-----
                                     :* .:* : . :* : :
                                     : * * . * **
                                     :
>GL50803_16693_hypothetical_      SILLSDIPIPPVTLKYLQIICKNVCGTSDSNMTPACIGVMHITNNSFLI
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----PNIPFDKCLKLFTYFSPCSKQ---PLQSNISGLTKMTDDQLML
                                     * * . * : . *... . : : * : : : : :
                                     :
>GL50803_16693_hypothetical_      NPHIAVNRHINEGRIIDIEILDQNNRPFLLAPVYLELFITESAEHEKKQG
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    SLN-----EVIKRNNR-LRMDPIFYQKYIKERNAVEHFKS
                                     . :
                                     *:::*** : : * : : : * . * : : .
                                     :
>GL50803_16693_hypothetical_      FFRFEKPHAILLHSPVAKLSVPDFFFLEPTFTFEYGDYAEVTSKKVRR
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    FLQLLKAHDNMRKDPVEIVDP-FYFAGVELKRKEEREELIQLILKEFQR
                                     *::: * . * : : . ** : * * : * : . : : : * : : * : : *
                                     :
>GL50803_16693_hypothetical_      FYPHKDPYFLSLRGTVITKTAMVNIKFYINNYFLKEIGPNPSGPIAAWL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    AN---QNTLEQIFNSLKVSTQWDVELNFDQYSVKDLKS-----
                                     : : . : . : : : : : : : : * * : : .
                                     :
>GL50803_16693_hypothetical_      DGDDLVLMTTVMITPDFITAWHIRKTDLIKLYEAIPTTRIKIPPYV
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----LLYLFN-----
                                     * : * :
                                     :
>GL50803_16693_hypothetical_      WYNKDSRINLYCKEYHERYPIVSARRIHDRYQVINPLFWAWHELEKPTNK
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----
                                     :
>GL50803_16693_hypothetical_      LHFRADHIVTYPDGSVDARPFSAKIEGDWAPIFQLFYK
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamoee    -----
                                     :

```

Fig 23. Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp26 de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_16693 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_16157_hypothetical_      MALCADRPSLPPAGAVSPLSSIQSIILLHYSSLFQVPLGVLELIFGDVCKQ
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     -----

>GL50803_16157_hypothetical_      IDEALYNQPLAQLDTRFKVHLRVLEGLVLRSTPLTELLPPAKLYTSG
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     -----

>GL50803_16157_hypothetical_      NTIREFTIFCDNYAGVTDIODDSRQLELSSFEDYLCPACEKMLLLPVVLH
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     -----

>GL50803_16157_hypothetical_      PCGHTICRNCLERGTTCVSGPLSRSEPRYITTCSLCAAQVTFANYQHEMY
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     -----

>GL50803_16157_hypothetical_      QKLRNRFTFNCAFLSEGCIYKGLLSDMESHQICPYALKDQQTNETAVA
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     -----MS
                                         ::

>GL50803_16157_hypothetical_      IVRLKEKQLRGLLEADIGLYSATLKTLSERVRLFSEGADTLSLAARRLADL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     QVILPSEFQR----ILTIKAFITVDPDIDILNGHYNIIFESKTVSEL
                                         * * . : * : : * : : : * : : : *
                                         * * . : * : : * : : : * : : : *

>GL50803_16157_hypothetical_      VPCPTGSPFPAQLTQIDHDIRDPLNLNLAALKQILGDAVHSFVSSQTT
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     Y-----LRWAPLFWN-----
                                         : * * *

>GL50803_16157_hypothetical_      STVHSSAIADQSGNIAMIHSLESQGYKQLADTERNLKEVTSKQGSLK
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     -----FLRNPNIIPFDKLLKLFYFSPCSK
                                         : : : : * * . * . *

>GL50803_16157_hypothetical_      QEIEVQRALLEESQQTINDLTTQLSLARDQLIEVQRSCCAVVRNCNEEL
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     QPLQSNGLTKMTD-----DQLMLSLN-----EV
                                         * : : . * : : : * * * : : *

>GL50803_16157_hypothetical_      AAENKRMQMSVSSLQRMLGDSKQELSARSEETEMYKERLVSLMMDTNLA
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     IKRNNRLRMDPIFYQKYIKER-----NAVE
                                         . * : : * . * : : : * :

>GL50803_16157_hypothetical_      NTLVKFQLLTAEQNKRLREMSGQLQLFYSGKPVYDCGCKIDSATLDSNT
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     HFKSFLQLLKAHDNMRKDPVEIVVDPFYFA-----GVELKRKEEREEL
                                         : : * * . * * * . : : * * . * : . :

>GL50803_16157_hypothetical_      IIYTTTELVKQSERTLAEVASASLGVGTSAVSGIDPSASSHFPLKRESEA
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     IQLILKEFORANQNTLEQIFNS-----
                                         * . * : : . * * : : :

>GL50803_16157_hypothetical_      APLKSENGSLHVLASDYPPLSLERFMEDDINIDITAITLLRYIFHPKVLRS
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     -----LKVSQTQMDVELN-----FDQYSVKDLKSLLYLFN-----
                                         * * : : . * : : : * * * * :

>GL50803_16157_hypothetical_      RTKLEHFANDCKALLRKAIGRDEPLSDEKQLQALYQLLASLRQFYANDYP
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     -----

>GL50803_16157_hypothetical_      LDEILDFLARFQLENSLIMRDQFGVEARRSIMEGYKKVRSENRIKATLE
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     -----

>GL50803_16157_hypothetical_      QLQEKKSIYHSLVAEKSRGRRID
>EHI_022250_Ehhmbp26_Entamo     -----

```

Fig 24. Alineamiento en ClustalW entre la proteína Ehhmbp26 de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_16157 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

Por otra parte, utilizamos como sonda la secuencia de la proteína Rubrerythrin putative de *E. histolytica* la cual es una proteína de unión a los iones metálicos como el hierro, además participa en los procesos de oxido-reducción cuyo gen ID es EHI_134810 y obtuvimos identidad con las secuencias GL50803_11443, GL50803_113284, GL50803_90131, GL50803_10810 del 46%, 38%, 33%, 33% respectivamente anotadas en el genoma como proteínas hipotéticas, y el 24% de identidad con la secuencia anotada en el genoma como coiled-coil protein (GL50803_17508) (Figura 25). Después, realizamos alineamientos para mostrar los sitios conservados de las secuencias de Giardia con la secuencia de la proteína Rubrerythrin, putative de *E. histolytica*. Las secuencias que arrojaron un mejor alineamiento fueron GL50803_11443, GL50803_113284, GL50803_10810 anotadas en el genoma como proteínas hipotéticas (Figuras 26-28), de acuerdo a su porcentaje de identidad y su longitud tan similar a la Rubrerythrin putative de amiba podríamos hipotetizar que las secuencias de Giardia tienen una función de unión al hierro similar a la secuencia de Entamoeba utilizada como sonda.

- > [GL50803_11443](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=hypothetical protein
location=GLCHR05:2290425-2290730(-) | protein_length=101
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=101
Score = 30.4 bits (67), Expect = 0.10, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 16/35 (46%), Positives = 19/35 (54%), Gaps = 4/35 (11%)
- > [GL50803_113284](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=hypothetical protein
location=GLCHR05:994269-995027(+)| protein_length=252
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=252
Score = 26.9 bits (58), Expect = 3.4, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 12/32 (38%), Positives = 18/32 (56%), Gaps = 4/32 (13%)
- > [GL50803_90131](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=hypothetical protein
location=GLCHR04:972228-977576(-) | protein_length=1782
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=1782
Score = 29.3 bits (64), Expect = 0.93, Method: Composition-based stats.
Identities = 14/43 (33%), Positives = 26/43 (60%), Gaps = 1/43 (2%)
- > [GL50803_10810](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=hypothetical protein
location=GLCHR02:474509-475348(-) | protein_length=279
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=279
Score = 26.9 bits (58), Expect = 4.6, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 13/39 (33%), Positives = 19/39 (49%), Gaps = 0/39 (0%)
- > [GL50803_17508](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=Coiled-coil protein
location=GLCHR01:1347292-1349610(+)| protein_length=772
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=772
Score = 26.9 bits (58), Expect = 4.9, Method: Composition-based stats.
Identities = 9/37 (24%), Positives = 23/37 (62%), Gaps = 0/37 (0%)

Fig 25. Descripción de las secuencias obtenidas del proteoma de *G. duodenalis*, utilizando como sonda la secuencia de la proteína de Rubrerythrin, putative (EHI_134810) de *E. histolytica*.

```

>GL50803_11443_hypothetical_
>EHI_134810_Rubrerythrin__pu
-----MRRRSGADGLIAEMCRNSSEFDD
MATLINLCKAFAGESQARNRYLIYAKTAKKEGLD-VIAQLFNETANQEGT
      :.* * :**:: .:::: :.

>GL50803_11443_hypothetical_
>EHI_134810_Rubrerythrin__pu
LMRTDEALFVWRCRVCGESAQSKKACPS-----CSMIHCT
HARILFEMIQSLKKEGQETPKIETAVPIDFGTTADNLLAAIAGETYEHE
 *  ::  :  *::: .:* *  :  * *

>GL50803_11443_hypothetical_
>EHI_134810_Rubrerythrin__pu
SCSEICAVCSR----RVCMLCSLLSGDSYHCLDCYNSKIDYTKKRK----
MYPEFAKVAKEEGHAQIAARLNLIAKAELNHHHNYQKILDELKANSLYKK
 .*: .*...  ::.  .*:  . :  : *:. :* * ..

>GL50803_11443_hypothetical_
>EHI_134810_Rubrerythrin__pu
-----
TEKVFVWCRECGYIFESTQPPKVCPLCGEPGDFFRVQVSI

```

Fig 26. Alineamiento en ClustalW entre la proteína Rubrerythrin, putative de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_11443 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_113284_hypothetical    MALIEAAKENRLDYVRAHKAADAGQRDADGKTALMVAEAGHTAVALLELV
>EHI_134810_Rubrerythrin__pu    -----MATLINLCKAFAGESQARN-----RYLIYAKTAKK--EGLOVI
                                   .  ::  :* . . . . .      *::* * :  .*:::

>GL50803_113284_hypothetical    DAEAGLVSNDSFALIAAAKRGNLELIQALFEKEGRLRDAGKLSALNHAS
>EHI_134810_Rubrerythrin__pu    AQLFNETANQE-----GTHARILFEMIQSLKKEGQETPKIETAVPIDFGT
                                   .  .:*:  .: *  :*:**:*  ::  . . . .  .:..::

>GL50803_113284_hypothetical    RAKQFEAAKVLRLKTIETMDAAMLEQLRQRVAATYEMAKKSQQAEVKSH
>EHI_134810_Rubrerythrin__pu    TADNLLAAIAGETYEHEHETMYPEFAKVAKEEGHAQIAARLNLIAKAELNHH
                                   * .: : ** . . .   *** . . : : .: . * : : :  **:: *

>GL50803_113284_hypothetical    NMAIFRSFFFAFYSLSCSGIDQGAETISEEQLNKSLEKCLGEIRKLLNSKK
>EHI_134810_Rubrerythrin__pu    NN--YQKILD-----ELKANSLYKKEKVF-----
                                   *  ::.::::      *:. .:* * . ** :

>GL50803_113284_hypothetical    YTKCVKCRANAPNLVCMPCKHYYLCKDCGKDVASKVCPACNKPVVEEFMEV
>EHI_134810_Rubrerythrin__pu    -----WVCRECGYIFESTQP-----PKVCPLCGEPGDFFRVQ
                                   ** * : . . .:  .**** *:* : *

>GL50803_113284_hypothetical    FK-
>EHI_134810_Rubrerythrin__pu    VSI
                                   ..

```

Fig 27. Alineamiento en ClustalW entre la proteína Rubrerythrin, putative de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_113284 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.


```

>GL50803_10810_hypothetical_      MQSEKDDLAGDARDPGVVKSSSEDLKVALHAILPRNEYFLDYMAVTAKGID
>EHI_134810_Rubrerythrin__pu     -----MATLINLCKAFAGESQARNRYLIYAKTAKKEGLD
                                   :.. : * . .**.*:: :.. :*:
                                   :.. : * . .**.*:: :.. :*:

>GL50803_10810_hypothetical_      ALAQRLETDRQEADSEDDLYEAREAAIHQAFQFAAVGQARAAFRKLDVPPF
>EHI_134810_Rubrerythrin__pu     VIAQLFNETANQEGTHARILFEMIQSLKKEGQETPKIETAVPIDFGTTAD
                                   .:** :.** .** .** :* : : : : : : : : : : :
                                   .:** :.** .** .** :* : : : : : : : : : :

>GL50803_10810_hypothetical_      FPPPQFVSEMYRPEEIMKRVEGQRKAIEDAKLEKERARNLRLQRKLSKQL
>EHI_134810_Rubrerythrin__pu     NLLAAIAGETYEHETMYPEFAKVAKKEGHAQIAA-----RLNLIKAEL
                                   ..** * * * : .. * * .**:: ** : .:**
                                   ..** * * * : .. * * .**:: ** : .:**

>GL50803_10810_hypothetical_      KHEKNRSKIQSEKAQKEVIRRWKEERIQLKKQGIAEDNLPSELDVEKKYV
>EHI_134810_Rubrerythrin__pu     NHNNYQKILDELKANSLYKTEKVFVWCRCGYIFES-----
                                   :*:* .** * .** : : : : : : : : * : .
                                   :*:* .** * .** : : : : : : : : * : .

>GL50803_10810_hypothetical_      SERRRRRIGKNIKYSGRKDFNRKYSERKKNQDITLDKDTFVYRQFSHLRK
>EHI_134810_Rubrerythrin__pu     -----TQPPKVCPLCGEPGDFFRVQVSI---
                                   : : * * : : . * . * *
                                   : : * * : : . * . * *

>GL50803_10810_hypothetical_      DDSGAGRINKYKASATSKEKVTGGGKFKR
>EHI_134810_Rubrerythrin__pu     -----

```

Fig 28. Alineamiento en ClustalW entre la proteína Rubrerythrin, putative de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_10810 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

Al utilizar como sonda la secuencia de la proteína “Major Facilitator Transporters (MFTs)” de *E. histolytica* cuyo gen ID es EHI_173950 el cual es un componente integral de la membrana y funciona como un transportador transmembranal, obtuvimos el 44% de identidad con la secuencia GL50803_87945 (Kinase, NEK), 36% de identidad con GL50803_112063 (proteína hipotética), 36% de identidad con GL50803_114777 (proteína hipotética), 30% de identidad con GL50803_112692 (ABC-type multidrug transport system, ATPase component), 30% de identidad con GL50803_94478 (ABC-type transport system, ATP-binding chain, putative), 30% de identidad con GL50803_39074 (proteína hipotética), 29% de identidad con GL50803_16373 (proteína hipotética) y 29% de identidad con GL50803_18470 (Vacuolar proton- ATPase subunit, putative) (Figura 29). Posteriormente se realizaron diferentes alineamientos por separado entre las secuencias de Giardia que presentaron una longitud similar de aminoácidos a la proteína MTF de amiba para mostrar los sitios conservados entre dichas secuencias (Figuras 30-33). Las dos secuencias que tuvieron un mejor alineamiento fueron GL50803_112063 (Figura 30) y GL50803_114777 (Figura 31), ambas están anotadas en el genoma como proteínas hipotéticas y arrojaron un 36 % de identidad con la sonda de amiba, por otro lado, en el genoma están descritas como componentes integrales de la membrana y que además funcionan como transportadores transmembranales, por lo que juegan el mismo papel que los MTFs.

> [GL50803_87945](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=Kinase, NEK
location=GLCHR03:1161320-1169011(-) | protein_length=2563
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=2563
Score = 28.1 bits (61), Expect = 5.2, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 16/36 (44%), Positives = 20/36 (56%), Gaps = 2/36 (6%)

> [GL50803_112063](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=hypothetical protein
location=GLCHR02:1260578-1262548(-) | protein_length=656
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=656
Score = 27.7 bits (60), Expect = 5.2, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 13/36 (36%), Positives = 20/36 (56%), Gaps = 0/36 (0%)

> [GL50803_114777](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=hypothetical protein
location=GLCHR05:4424716-4426686(+) | protein_length=656
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=656
Score = 27.7 bits (60), Expect = 5.6, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 13/36 (36%), Positives = 20/36 (56%), Gaps = 0/36 (0%)

> [GL50803_112692](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=ABC-type multidrug transport system, ATPase component
location=GLCHR05:4428890-4434361(+) | protein_length=1823
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=1823
Score = 28.1 bits (61), Expect = 5.0, Method: Composition-based stats.
Identities = 28/93 (30%), Positives = 39/93 (42%), Gaps = 20/93 (22%)

> [GL50803_94478](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=ABC-type transport system ATP-binding chain, putative
location=GLCHR04:345470-351409(+) | protein_length=1979
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=1979
Score = 28.1 bits (61), Expect = 4.8, Method: Composition-based stats.
Identities = 28/93 (30%), Positives = 39/93 (42%), Gaps = 20/93 (22%)

> [GL50803_39074](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=hypothetical protein
location=GLCHR02:876900-877070(-) | protein_length=56
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=56
Score = 25.8 bits (55), Expect = 4.5, Method: Composition-based stats.
Identities = 11/37 (30%), Positives = 21/37 (57%), Gaps = 0/37 (0%)

> [GL50803_16373](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=hypothetical protein
location=GLCHR05:1290492-1295120(+) | protein_length=1542
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=1542
Score = 33.9 bits (76), Expect = 0.093, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 27/94 (29%), Positives = 37/94 (39%), Gaps = 6/94 (6%)

> [GL50803_18470](#) | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
product=Vacuolar proton-ATPase subunit, putative
location=GLCHR02:690309-693110(+) | protein_length=933
sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
Length=933
Score = 27.7 bits (60), Expect = 5.5, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 9/31 (29%), Positives = 22/31 (71%), Gaps = 0/31 (0%)

Fig 29. Descripción de las secuencias obtenidas del proteoma de *G. duodenalis*, utilizando como sonda la secuencia de la proteína MTF (EHI_173950) de *E. histolytica*.

```

>GL50803_112063_hypothetical      MANLVLNPAGEARARTQYRCFEYLRLLVAAAGHAFDAYGLGDSNRDRYLG
>EHI_173950_transporter__maj      -----MHKVLKVLSPITNFFPKG-----F
                                     .: *:::.. : *

>GL50803_112063_hypothetical      DCIQCTDILELVVCAAGCAAAGPPSAPLDADSPKMDLHLPEAMGASEAVL
>EHI_173950_transporter__maj      PVRKLVPLLLLLLICES-----FTNNSIAAYAGFMVTDGIVDNPSQAGY
                                     : . : * *::* :      .. : * : * .: . . : *

>GL50803_112063_hypothetical      PAADPAEAHRRYQNYCTEMNRVHPDPLHPAPELATTETFYKLVDLHFFSSL
>EHI_173950_transporter__maj      YSGILNACYFFSQFLSSFFLGLVSDNIGRRPILLIGS-----LGSLISTL
                                     :. .: * .: : * . * : * * . . . : *::*

>GL50803_112063_hypothetical      VYVEKLMGTPKIDWNADHFTLDYKPCPDEVKLVINLDAEATSAHDNNKDL
>EHI_173950_transporter__maj      LFG-----FSFNWMAVISRSINGLVNGNIGVIKTFMGEFST
                                     : :      * . : . . : : * : * . : : .

>GL50803_112063_hypothetical      QSKPNWCANKVWYVMILSFFLGTSLSLLSLTVPFYLTNLGANASQTANAQ
>EHI_173950_transporter__maj      KEN----RAQVFLIGLNLGLG---MIIGASVGGYLARPAKQYPSIFGGM
                                     : :      : * : : * : * * : : . : * * : . . : . .

>GL50803_112063_hypothetical      AFFNLGQLFFCPLWLWLSEIIGRKPVIIVLFAGYILTFGLTTLTPIIFKA
>EHI_173950_transporter__maj      KFFEIFPFILPNLVCSLITMVGIVLGYFYLEETKPRERTNDQWYIQILNI
                                     *::: : : * * * : : * * * : * * * : : *

>GL50803_112063_hypothetical      TTNISINSQEQINYILGIRFATGIFAYAVPISFVTVADLASPRARPMALI
>EHI_173950_transporter__maj      FKKVIGRTIKIVKMLFSKEFVGLCCFSYSIISVGAAMLLT-----
                                     . : : . : : : : . * . : : : . * * * * :

>GL50803_112063_hypothetical      AVNIVTQIGTGIASVVVAFATTGTYANDTVKSFLHTFYLAIALLVAGLV
>EHI_173950_transporter__maj      -----VIPLLMASIEVGGFGWETSQIGTFNMISAVGIICT---
                                     : : : : : : * : . : * : . . : * : : :

>GL50803_112063_hypothetical      FSCFFKESAGVIARKAAKMGKTDQYKANKVRRDSFCVTFKDKILKNKE
>EHI_173950_transporter__maj      -QLFIYRPTVKLFGPLWTRIGSLGNLILYN----IPPCIYYLYPYGN--
                                     . * : . . . : : . : : : * . . . . * : : *

>GL50803_112063_hypothetical      LILLWFAYVFQIFCTQLPVATQSFLIAKFGYFTNAQSKQLNALSNIVVV
>EHI_173950_transporter__maj      -VALWIG--LGAFGIMVNITTQFCFASVMAMIANSVKNDLLGTLNGLSQS
                                     : * : . : * : : : * * : : : : * : . . * : * : :

>GL50803_112063_hypothetical      IIAVCFTFLTRLIANKIGELRVIVISYFAMLPSSLRWAI DPPIPKWIM
>EHI_173950_transporter__maj      LVALFRLFAP-----LISSPLIAWSFTQKFPFNAH
                                     : * : * . : : : * : : : * : : * : : *

>GL50803_112063_hypothetical      FLPFNTIALSLGDALFIQFATLYT-TPKNRGTLLGLFQIGNSIGRFGGAL
>EHI_173950_transporter__maj      FTFFVLAVIPFINFLLLLLIPKSINYPKQEVQYTKIVELDDIKAKDETTQ
                                     * * . . : : : * : : : . * * . : : : : . :

>GL50803_112063_hypothetical      IGGELYNNWNRNGSIFLLYGFTSLLLLCFVKPPLEQNTAAQIEQKQREQ
>EHI_173950_transporter__maj      QKDETTQNVN-----SPNQINTTKTSSEEQAHAIIDEDENQ
                                     . * : * . : : : * : : . . . * : : * * : : : *

>GL50803_112063_hypothetical      IKSRAAV
>EHI_173950_transporter__maj      VEL----
                                     : :

```

Fig 30. Alineamiento en ClustalW entre la proteína MTF de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_112063 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_114777_hypothetical      MANLVLNPAGEARARTQYRCFEYLRLLVAAAGHAFDAYGLGDSNRDRYLG
>EHI_173950_transporter__maj      -----MHKVLKVLSPITNFFPKG-----F
                                     .: *:::.. : *

>GL50803_114777_hypothetical      DCIQRTDILELVVCAAGCAAAGPSSAPLDADSPKMDLHLP EAMGASGAVL
>EHI_173950_transporter__maj      PVRKLVPLLLLLICES-----FTNNSIAAYAGFMVTFDGI VDNPSQAGY
                                     .: .:* *::* : .: .: * : * .: . .:* *

>GL50803_114777_hypothetical      PAADPAEAHRRYQNYCTEMNRVHPDPLHPAPELATTET YFKLV DHLFSSL
>EHI_173950_transporter__maj      YSGILNACYFFSQFLSSFFLGVLSDNIGRRPILLIGS-----LGS LISTL
                                     .: .: * : * .: .: * .: * .: .: *::*

>GL50803_114777_hypothetical      VYVEKLMGTPKIDWNADHFTLDYKPCPDEVKLVINLDAE AISANDNNKDL
>EHI_173950_transporter__maj      LFG-----FSFN YWNAVISRSINGLVNGNIGVIKTFMGEFST
                                     .: .: * : .: .: * : * .: .: .

>GL50803_114777_hypothetical      QSKPNWCANRVWYVMI LSFILGFSL S-LVALTIPFYLTYL GANASQTANL
>EHI_173950_transporter__maj      KENRAQVFLIGL TNLGMII GASVGYLARP AKQYPSIFGG-----
                                     .: .: .: *::* *:: * : * : * : *

>GL50803_114777_hypothetical      QSFFNLTQLFFCPLWLWLSEIIGRRPVYIVLFA GYAVTTGLTGLAPIIFQ
>EHI_173950_transporter__maj      MKFFEIIFPILPNLVCSLITMVG-----VILG-----YFY
                                     .**:: : : * * : * *:: * *::

>GL50803_114777_hypothetical      ARDNSKTHSQDQINYLGMRFATGIFAYAIPIGFVTVADLASPRARPMAL
>EHI_173950_transporter__maj      LEETKPRERTNDQWYIQILNIFKKVIGRTIKIVKMLFSKEFVGLCCFSY
                                     . . . : : * * : .: .: .: * * : .: .: .: .:

>GL50803_114777_hypothetical      IAINVMTLIGTAIASIIIAFI FTIGTYTGDNVKSF LHTFYLAIALLVAGL
>EHI_173950_transporter__maj      SIISVGAAMLTVIPLLMASIEVGGFGWETSQIGTFNMISAVGIICT--
                                     *.* : : : .: : : * : : .: .: *::: :

>GL50803_114777_hypothetical      VFSFCFFKESSAGVIARKAAKKMGKTDSQAYKANVRRDSFCVTFK DILKNK
>EHI_173950_transporter__maj      --QLFIYRPTVKLFGPLWTRIG-----SLGNLILYN
                                     . * : . . . . : : * : : : : : : :

>GL50803_114777_hypothetical      ELILLWFAYVFQIFCTQLPVATRGFLVAKFYGF TSAQEAKQLNALSDIVA
>EHI_173950_transporter__maj      IPPCIYYLYPYGNVALWIGLGAFGIMVNITTQFC-----FASVMAMIA
                                     : : * : . . : : : *::* * : : : : *

>GL50803_114777_hypothetical      IAITVCFILGLTRIIANKIGELRIIVISVYFAMF PSLLRWAVDPPIPKWI
>EHI_173950_transporter__maj      NSVKNDLLGLTNGLSQSLVALFR LFAP----LISSPLIAWSFTQKFPNA
                                     .: .: * .: .: .: *::: .: .:* * .: *

>GL50803_114777_hypothetical      MFLPFNSIAFSLGDALFIQFATLYT-TPKNRGTLLGLFQIGNSIGRFGGA
>EHI_173950_transporter__maj      HFTFFVLAVIPFINFL LLLIPKSINYPKQEVQYTKIVELDDIKAKDETT
                                     * * .: .: *::: .: *:: .: .: .: .:

>GL50803_114777_hypothetical      LIGGELYNNWRNGSIFFLYGFASLLFLCFVKPPL EQNTAAQIEQKQLE
>EHI_173950_transporter__maj      QQKDETTQNVNSP-----NQINTTKTSSSEEQAHAIIID
                                     . * : * .. : : .: .: * .: .:

>GL50803_114777_hypothetical      QKRRQASV
>EHI_173950_transporter__maj      EDENQVEL
                                     : . . * . . :

```

Fig 31. Alineamiento en ClustalW entre la proteína MTF de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_114777 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.


```

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      MLLVFLPWLFLALVSDVYRKHPEDYPVVDITDSGDSMTPRNTSVCVAVQLQ
-----

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      RISDGS LAFQYFDDGAVHFFANSYLF DGLESTIGKVVWETS PAGELYLLE
-----

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      FSPLPSHPFNYSYLR EYTD SQETPLQGTADPLTDVYYAIKARILFLKMRLT
-----

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      NANTTLRS DGSLLLSSSPRKDSRVPEKYPYSLPYTLKKHIYNCVSM EYKS
-----

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      STKAKLGRPCMPPEGM RPILKEQHDLFNMLSAGKMYVDYTGSIYIPVCGV
-----
                : : : ** . : : *           : . : * : :
                : : : ** . : : *           : . : * : :

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      TTDEAYTQGNTAPTAYFIKLLDGD SNRRTYPHRAGFIPRVTSRVWVVDYY
LICESFTNNSIAAYAGFMVDFGIVDN---PSQAGYYS GILN-----
                * : : * . * * * : * * * * : * : * : * : . . .

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      SDWVGLATVHGVGLLNLNANSYRSGPWAENCYYSLRMVG NPFMHEVGHNE
-----
                : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :
                ** : : : . . * : : . . *

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      GGLHNGVSDS ANFHRFISHYRQEPISGAGTFSYMASGGFPFLTAVQSAS
G-----RRPILLIGSLGLIS-----TLLFG
*           : : ** * : : . : *           . .

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      HYYNAWETVLPWRVRV LKHWDNGVIPEANTPEKGRRGPHGGKADIGMHK
FSFNYWMAVIS-----RSINGLVNNGNI GVIK
. : * * * : : . .           * . : * : : * : : * : :

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      LRIMDAEHQYTYKFLGADDDAYTPATYTEYAADPKTGKTSKVVKIAWIGF
TFMG-----EFSTKENRAQVFG LIGL
:           :           : * : . . : . **

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      QDGYD PDDIVQGLLR RNHVLMIEVYLDKEGFFSEMITDFVSVLIEYRSNT
TNGLG-----MIIGASVG-----
: * .           : : * . : .

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      RMSWNGHSIHFQALRPHNFESNI VVNI LHACVEQNHGGQELTSQATASPI
-----

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      PGR LWTCP ECDKGT FQLLVIDGN YARVDPMNTT MFDEARQERIRNIPYRN
-----
                : * *           : : * . :
                * *           : : * . :

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      LVIN YRPGTLPAPAPDPRFYPLRFMESPAVHCSIKDGNIPTEPERVFNVT
-----
                : * : : * : * : ** :
                * : : : * : * : ** :

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      CEALLRLENYAVHAI SNYFVNDPHNGPIRQYADR FAYLSTYRTLSSGAIN
-----
                : * . * ** : :
                * . * ** : :

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      YLGNV NKDPKNAAKMQMQMTRFGGTT SANS CYLHGGILT DGS SLAGAKQSD
-----
                : * : : * : : . .
                * : : : * : : . .

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      FPTMVRFYDSIISYVPPGSQE QILVSPGPGNFTGRIGWSMSMENRKKFAQ
-----

>GL50803_16373_hypothetical_
>EHI_173950_transporter__maj      SSNNGYAIMFD AVWNP SLYYL TDDYDTAFLGNENHKEAYYLAHTFQY TNG
-----
                : * . * . : : . . : . . * : *           : * : * :
                : * . * . : : . . : . . * : *           : * : * :

```

```

>GL50803_16373_hypothetical_      QCGYNAYFHSFTGNTHAGAKMGHGTSVQVFMTSSGDRVLMSNLSYSYDQTFR
>EHI_173950_transporter_maj      -----IISVGAAMLLTVIP-----
                                   ::: * :*:: :.

>GL50803_16373_hypothetical_      LLPDGFSLEGTGCAHQHRPTIYRANQWHMIYNPAPSKRNLLVLDFDSE
>EHI_173950_transporter_maj      -----

>GL50803_16373_hypothetical_      IPDNLILFTDSYNSTDAIDLRMLYLVNKISNTGGANDRTIYWSYALDNYA
>EHI_173950_transporter_maj      -----LLMMASIEVGG-----
                                   * :: .* *

>GL50803_16373_hypothetical_      MLHEYYRYEELGENPGLRFAFNKDVRLVNIRFMTPQFGTFNPWNGRGTM
>EHI_173950_transporter_maj      -----FGWETSQIGTFNMISAVG--
                                   : : *.*:**** .. *

>GL50803_16373_hypothetical_      EGKGKTVQLSSRPADNRPDGVLDKPHMNPYTISISGTRYEFSTKNDTYTV
>EHI_173950_transporter_maj      -----IICTQLFIYRPTVKLFGPLWTNRIGSLG-----
                                   :::: ** * * . *:.

>GL50803_16373_hypothetical_      PFPLTVHEGRFSVPTKIEYFHPDRPTCKDGEYAWRLQTGAFTCMICPTGY
>EHI_173950_transporter_maj      -----NLILYNIPPCIYYLYP-----YGMVALWIGLGAFGIMVNITTQ
                                   : :.:*.*:*:* * * : *** * : *

>GL50803_16373_hypothetical_      FCSEGMNPPCGYYTDLEGQSSCLSYSAATSNREFNKITASEYYAGIDY
>EHI_173950_transporter_maj      FCFASVMAMIANSVKNDLLGTLNGLSQSLVALFRLFAPLISSPLIAWSFT
                                   ** .* . . .* * . * * .: * * : : * *

>GL50803_16373_hypothetical_      SRFPIRNPDGTVRGFYNCPGNKFTLNGECKTCPSAGYICVPGMDPVLCPR
>EHI_173950_transporter_maj      QKFPN-----AHFTFFVLAVIPFINFLLLLLLIPK
                                   ::**: . . . * * : : : * * :

>GL50803_16373_hypothetical_      GFRCRGGYAQPCVGDEYQDEEGRDVCKKYPQSGTRLACIKGEVDIPLDGD
>EHI_173950_transporter_maj      SINYPKQEVQYTKIVELDDIKAK-----
                                   :. . .* * : * :.

>GL50803_16373_hypothetical_      DRRLMSVAYSALLVYLMDRPNAGCRPCPLGYSCIDGAVIPCTYDQYSPE
>EHI_173950_transporter_maj      -----

>GL50803_16373_hypothetical_      GDEVCHDCRHGTIRNVDGSGCVSLDPQDESKVEEGPGFAFYGFYPTYSPP
>EHI_173950_transporter_maj      -DETTQQKDETTQQNVNSPNQINTTKTSS-----
                                   ** .: . * :**:. . . . . *

>GL50803_16373_hypothetical_      SQEYIKTEKERVQSRIYLHSGDKIIDVVEGVETVAEARRQMKTRTRAAVG
>EHI_173950_transporter_maj      -----EEQAHAIIIDEDENQVEL-----
                                   * . * :. . . : : :

>GL50803_16373_hypothetical_      WMFLGLLLLWLLLVGACAIYNHLKRKRKMQHLRASYQPTYRND
>EHI_173950_transporter_maj      -----

```

Fig 32. Alineamiento en ClustalW entre la proteína MTF de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_16373 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_18470_Vacuolar_prot      MSALDLWRSQTMRLVAFTVSREIAPSVEEMMALGCMHFVDACSDVSFFD
>EHI_173950_transporter__maj      --MHKVLKVIILSPITNFFPKGFVPRKLVPLLLLLICESFTNNS-----
      . : :      . : * . . . : * : * * * . : . :
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      RAYTANIMQLATTESKLDYIRDQFIALEIPLPEQEDRVELMPLGNLDAEL
>EHI_173950_transporter__maj      -----IAAYAGFMVTFDFGIVDNPISQAG-----
      : . : : * : *
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      TATMKTVKTLLEDEYQQHLADLSANLTYSQVLDIVRRESASSAQNKMLRDV
>EHI_173950_transporter__maj      -----YYSGILNACYFFSQFLSSFFLG-----VLSDN
      : . * * : * * . :      : * *
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      LSENTHLIGSSPDDEAQETDTSANLYFLACTVPDVSVTPMLQRLATRATLS
>EHI_173950_transporter__maj      IGRRPILLIGSLGSLISTLLFGFSFNYYMNAVISRSINGLVN--GNIGVIK
      : . . . * : * . . . : . : . : * : : : . : . . .
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      NCMIEVVGKISTPDLAALIGADQSPSKPASPKKAKHKAADQQEYDVFV
>EHI_173950_transporter__maj      TFMGEFSTKENRAQVGLIGLTLNGLMIIG-ASVGGYLARPAKQYPSIFG
      . * * . * . . : : * * * . : . . . * : : * *
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      YTPGVQLQSKVGSIVTSLSGTIHSQGVQGGGAVDSVQSLDSVSRVQQS
>EHI_173950_transporter__maj      ---GMKFFEIFPFIPLPNLVCSLITMVGVLG----YFYLEETKPRERTN
      * : : . . * : * * : : * * *
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      IEDHRTLRLSKQRITTIINQLGAQLEAYYRLILKEEVMGVLNKLRPSL
>EHI_173950_transporter__maj      DQMYIQLNIFKKVIGRTIKIV-----KMLFSKEFVGLCCFSYSI
      : : : * : * * : : :      : * . * * : * * : *
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      ADAKILTGIAHIPEQTFSDVDTQIVEACNERYKGLPFSIKDLNALSCTRK
>EHI_173950_transporter__maj      ISVGAAMLLTVIP-----LLMHASIEVGGFGWETSQIGTFNMISAVGI
      . . : : * * : : : :      : * * * * : * :
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      NGTSVLINTDRLRPATVDALHHSPEKHLRQPPTYFKTGKFTKVFQNIIES
>EHI_173950_transporter__maj      ICTQLFIYRPTVK-----LFGPLWTRIGS
      * : * * : :      : * : * *
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      YGIPSYKEINPAFFYLYQFP-FTFAMVYGDIGHGIIITIVSALMVGYERR
>EHI_173950_transporter__maj      LGNLILYNIPPCIYLYPYGNVALWLGAFGIMVNIITQFCFASVMAMI
      * : * * : * * * : : : : * * : * : * :
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      LGKVKNDMWSLIFAGRYIILLMSIFSIFTGLIYNDMFALAYDFHFSRYTF
>EHI_173950_transporter__maj      ANSVKNDLLGTLNG--LSQSLVALFRLFAPLISSPLIAWS---FTQKFPF
      . * * * * : : . : * : * * : * * : * : * : * : *
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      NRSSTPNLFESTYDTTKYSSPVYAFGIDPAWRHSDNSMFMINSYKMKMA
>EHI_173950_transporter__maj      N-----
      *
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      VIIGILQMIFGIVLKLNLNVIYSRDIVGLLTCWIPEFLFMTCTFFGYMFCI
>EHI_173950_transporter__maj      -----AHFTFFVLAV
      . . * : * : . :
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      IYKWLNEWPEGSNPPALTSLLIQMFLSPGISIPESYLFNNIPLQTNLQLA
>EHI_173950_transporter__maj      IPFIN-----FLLLLIPKSIN-----
      * : : : * * *
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      LFAICIIISVLMVAKPVYEVVQLKKAACKGLAHGVPISGQAASHEAAP
>EHI_173950_transporter__maj      -----YPKQEVQ
      . : . :
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      ITSEADLAKADTDDAQTKTNLLVSDGKDAQGRGSSRKADQDDDDAEHGV
>EHI_173950_transporter__maj      YTKIVLDDIKAKDETTQQKDETTQNNVNSPNQINTTKTSSSEEQ---A
      * . : * . . : * * * : : : . : : : : * : . . . :
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      GDIIVHQQVIHTIEYVLGAISHTASYLRRLWALS LAHAQLSEVFYEQFLTLS
>EHI_173950_transporter__maj      HAIIDEDENQVEL-----
      * : : . : : *
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      YGFSVSENKWLSGVVQGVSVFVYSAHFGVTIGVIIIMEALS AFLHGLRL
>EHI_173950_transporter__maj      -----
>GL50803_18470_Vacuolar_prot      AWIEFNKIFYQAEGYIFELAPVEYTL SLEKQDE
>EHI_173950_transporter__maj      -----

```

Fig 33. Alineamiento en ClustalW entre la proteína MTF de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_18470 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

Con la proteína anotada en el genoma de *E. histolytica* como “ATP-binding cassette protein, putative (ABC transporters)” cuyo gen ID es EHI_178050 el cual es un componente integral de la membrana y funciona como un transportador transmembranal, así como una proteína de unión al ATP, obtuvimos el 31% de identidad con la secuencia GL50803_17132 (MRP-like ABC transporter), 29% de identidad con GL50803_115052 (Multidrug resistance-associated protein 1), 29% de identidad con GL50803_28379 (Multidrug resistance-associated protein 1), 28% de identidad con GL50803_9741 (ABC transporter, ATP-binding protein), 27% de identidad con GL50803_221689 (ABC transporter, putative), 26% de identidad con GL50803_7662 (RNase L inhibitor), 25% de identidad con GL50803_3470 (ABC transporter family protein), 25% de identidad con GL50803_87446 (ABC transporter family protein), 25% de identidad con GL50803_17315 (Multidrug resistance ABC transporter ATP-binding and permease protein), 25% de identidad con GL50803_16605 (ABC transporter family protein), 25% de identidad con GL50803_41118 (Multidrug resistance-associated protein 1), 24% de identidad con GL50803_112692 (ABC-type multidrug transport system, ATPase component), 24% de identidad con la secuencia GL50803_9133 (ABC transporter), 23% de identidad con GL50803_16592 (ABC transporter family protein), 23% de identidad con GL50803_21327 (ABC transporter, ATP-binding protein), 23% de identidad con GL50803_16575 (ABC transporter family protein), 22% de identidad con GL50803_113876 (ABC transporter, ATP-binding protein, putative), 22% de identidad con GL50803_21411 (ABC transporter, ATP-binding protein), 21% de identidad con GL50803_137726 (ABC transporter ABCA.1, putative), 21% de identidad con GL50803_92223 (ABC transporter family protein), 20% de identidad con GL50803_94478 (ABC-type transporter system ATP-binding chain, putative), 20% de identidad con GL50803_8227 (ATP-binding cassette protein 5) y 20% de identidad con GL50803_103946 (proteína hipotética) (Cuadro 5). Después se realizaron diferentes alineamientos por separado entre las secuencias de Giardia que presentaron una longitud similar de aminoácidos a la proteína ABC transporters de amiba para mostrar los sitios conservados entre dichas secuencias. Las secuencias que tuvieron un mejor alineamiento fueron

GL50803_17132 (Figura 34), GL50803_115052 (Figura 35), GL50803_28379 (Figura 36), GL50803_221689 (Figura 37), GL50803_3470 (Figura 38), GL50803_16575 (Figura 39) y GL50803_8227 (Figura 40), las cuales están descritas en el genoma como componentes integrales de la membrana y que además funcionan como transportadores transmembranales y son proteínas de unión al ATP, por lo que juegan el mismo papel que los transportadores ABC.

Cuadro 5. Secuencias aminoacidicas de *G. duodenalis* obtenidas con la sonda EHI_178050 de *E. histolytica*

Secuencias	Gen ID	Nombre	Longitud (aa)	Identidad
Sonda	EHI_178050	ATP-binding cassette protein, putative	1343	
1	GL50803_17132	MRP-like ABC transporter	1574	31%
2	GL50803_115052	Multidrug resistance-associated protein 1	1598	29%
3	GL50803_28379	Multidrug resistance-associated protein 1	1503	29%
4	GL50803_9741	ABC transporter, ATP-binding protein	781	28%
5	GL50803_221689	ABC transporter, putative	1181	27%
6	GL50803_7662	RNase L inhibitor	674	26%
7	GL50803_3470	ABC transporter family protein	1113	25%
8	GL50803_87446	ABC transporter family protein	957	25%
9	GL50803_17315	Multidrug resistance ABC transporter ATP-binding and permease protein	933	25%
10	GL50803_16605	ABC transporter family protein	859	25%
11	GL50803_41118	Multidrug resistance-associated protein 1	410	25%
12	GL50803_112692	ABC-type multidrug transport system, ATPase component	1823	24%
13	GL50803_9133	ABC transporter	903	24%
14	GL50803_16592	ABC transporter family protein	2254	23%
15	GL50803_21327	ABC transporter, ATP-binding protein	2180	23%
16	GL50803_16575	ABC transporter family protein	1085	23%
17	GL50803_113876	ABC transporter, ATP-binding protein, putative	2071	22%
18	GL50803_21411	ABC transporter, ATP-binding protein	1978	22%
19	GL50803_137726	ABC transporter ABCA.1, putative	1979	21%
20	GL50803_92223	ABC transporter family protein	941	21%
21	GL50803_94478	ABC-type transport system ATP-binding chain, putative	1979	20%
22	GL50803_8227	ATP-binding cassette protein 5	1065	20%
23	GL50803_103946	hypothetical protein	451	20%

```

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
--MPPAHNRKICVSGAQGFPPPSDAYQFTTMETKQPLHEYFPRCLYYTY
MSLKSIEPKIEIEGED--TTSSDDGIFETDDVVKYDKSPNSVVKFFRTL
: . . : : * : * : . . . . * . * . * : : *

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
HWLSPIIKLIK-RQGAIPRDVYILPRHMRVSEASRRLLVGAWNRTVARD
FFRTSMPQLLKGRKGNLRVSDLCPIPKTLILEGYEAELENWEKEALS
. . : : * : * : * : * : * : * : : . . * * : : . .

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
ARGKKRMSLLISICIRAYKSSMLIIFCLIPVYTFGLGLVPSIALNNLT
P-----SLFLTIFKKEWYHFLFSYILVSIYELFSLAFPLECQYIVK
. . ** : : : * : : * : : * : : * . . : : . . *

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
AEENIRRISLDYLLTTGQQASVTYLIGQLFAKAVPWIGLVFVSQITLAF
NKENPP-----TYMAAVFICLAIVFQLIVCFSQEFGKKW
: ** : : . . . . * : : : * . **

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
INISMLKNFEVNTMTSQALSDLLYRKLTLSELSRSSSISGSIINFIFD
IFVSALR-----IRNGLTGLIYDKALKLNASGIEE--PGRVLNLMAN
* : * * : : . . : * : * * * . . . . * : * : : *

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
TGRITDFLAFIPMFTAVPFRVYSIVILSTTINPLTMVGIIGLTTSP
ASVFIGNIEYAVFGLASPMFIVLFLIYIYMGKWYIPLIVFVFNII
: . . : : : * * . : : * : : : . . : : * . . :

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
VLFIRRQLWFTKHYMCYKDLRIKRATEVLTGIRVIKYFSMEKLQAIRL
HSGFGLSGFLYKFKVHVKDKRVSMGEILHNIKFIKYNNEKPKKRIW
. * . : : : : * * * . . * : * . : * * * . * * * :

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
ARDRELSHLINIKMNSAYTVIVTSTTGPLMLTLALTTLALAGYLDNAT
YLRITIEIWLILVGFVRSFYITITIEIGAILSLSMFVTMVL-----
EAL
* * * * : : : * * * : : : * : * :

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
SAALVINTLSMIFNQLPQLLAKLFESLISSDRLIAFFNLPNKDGQVCL
RQLANVITISLFN-----
. * * * * : :

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
TLECCAHOSTDSDGSPMQORDASTNEDNDKCGIGSGDVILSTVGNPSY
W-----

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
GTAKHLSLPIILDPLFKQTQDTIKK FARQLPVLNNQLARALATLDRDP
AY-----

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
SILLRSNPLTAQRGVADQSTDEQETSSILSSATDRPLEPRKIGLQD
DC-----SIRIPIRTIGMAATC
. : * * * : *

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
LQAVVFTQSVSAQEWDALHKPVTTSCVHLDKKCKDCOTIPFSTIDQI
SSINWSLG-----RIKRFLLKPELQPIQVVKES-
: : : * : : : . : * : : : *

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
YKETSYPQLQEDNPLTVVKKIYVHCAVMTFFLTDPKFDSDHRASFKV
AREI-----ENAIEMNDVNYIFPDGETAFACD-----
: * : : . * : . * * *

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
LTTKDSFPNVINLDFKVKRGALVGIHGRVSGSKSSLLALLGELANTSP
-----ELKIKKGEVLCVLSVSGSKSSFLALLNELE----
: : * : * * : * * : : * : * : * : * : *

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
EKQARIHCTASIAVCPQLPTIFSGTLKSNILFFKDCEDERLKNVIKI
CALKKKGSYLNKITYSSQSAWLMNATVRENICFLAPYNKEKYKQAIK
DACL: * : . . . * : * . . : : . * : : * * * : : : : * : * * *

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
ETDLNSMAHGVDETEIGERGITLSGGQKARIALARAVYSDADIFLLD
DPLSTSDIDNLVGGDQYVIAEKGSNLSGGQRQRIALARSLYNSQDIM
LDDPLS: * : : . . * : * : * . * * : * : * : * : * : * : * : * : *

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_
>EHI_178050_ATP-binding_cass
AVDAHVGSTLWNCILNVLVREQGKTVIIVSHQIHFFSDCDDIYEMNH
GAVDFHVGTYIFENAIKSLG---GKTRIIVTNQTYFIEKADRIIVID
NK** * * : : : . * : * * * * * : * : * : * * : : :

```

```

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_ LTR-MTLEEMRNQNLISVSSMLTDTGSLANAATKSTLQLDIGEAEQVPVQ
>EHI_178050_ATP-binding_cass LAFNGSLEELKNSLEASQFIKTL-----SKKSENNEENGEVISG
* : :***:*. * : : * : * . : : * : : .

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_ KAVRMIEDEKHAAGRVQLGVYHAWIKAGGYGIFWGYILLTLTGNGILQY
>EHI_178050_ATP-binding_cass DSYNTKTREEGKELGRVSFKVYWEYIKAGLVFLGAACIVFLSARIVALYF
. . . * : :***: * * :***** : . * : : * : :

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_ LGLYINHWSSNLYG----FSSAGYIVLVYSISMLYILIVFLERVAFIKS
>EHI_178050_ATP-binding_cass YNTFLTkwGRSIRPKLGLPQGNREEFNKFCYTFIADFVGVVYLTEIFIIF
. : :*. . : : . . : : : : * : : *

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_ SVNATRLLHNRMVDAVLNTQLFFETNPLGRILNRLSRDQDCDSAIPNS
>EHI_178050_ATP-binding_cass CITSSHNIHKMVKVMNAKLGFFDITPIGRILNCFSRDFQNIIDYALAMF
.: : : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_ IVLSNDLLYLLVNLVIMLLSWPTIVFIIPLGILYIFIFNTFRLIAPQL
>EHI_178050_ATP-binding_cass TEPLIVNVSTIVIVAITITKASIVLVILVIVVIFVAFYIFTSKPIVIEI
. * : : : : . * * : : : : : : : : : : . : :

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_ KRITPILSSPILALVQDSLALPSIRCYGSEDHLIELNRLNLRYSYADW
>EHI_178050_ATP-binding_cass QRLEGVSRSPIFVHFQDTLMLGLSTIRVSNQNEFKTKLIDKIKNNTMAFY
:* : : * : : . : : * . * : * * . : : : : : : : : : * : :

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_ LMRVMNRWLSFRVNVIMGIFASLVSMVVIAPIGN--SARYTGLILMNS
>EHI_178050_ATP-binding_cass TCKMAKLWYLQRMDWIG-AFIIIVITTTVICITKINKGMDPSTAGTALTNL
: : : * * : : * * : : : : : * : * : . . : * * *

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_ FTLISRLIMLAFSINSLESSMSSAERVLEYGKLGEEEDGLTYPALSTQSA
>EHI_178050_ATP-binding_cass TNIPSTITTLGLAILEIETIMQSTERIFQLNKVRNEESERVKENYEQPPD
. : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_ DP--AKFVDVSSLSLRYRKDLVLRNVFSFAHRGERIGIVGRTGAGKSS
>EHI_178050_ATP-binding_cass EWPSKGEVVKFDKYFRYRRGLPLVLKGINASIEDKEKIGVVGRTGSGKST
: * : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_ ITAAMFRLVEPEPGSSIVNGVDLLSVPLDDARAQTLTIIPQDPFLFSGTI
>EHI_178050_ATP-binding_cass LMAGLFRIIEP-AGGKILVDGIDITKVPLHILRNRMCIIPQEATMFSGTV
: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_ RTCLCFYSQLTAEGITPKDMPPGVERISDEKLWRVLEQVRMREYFEKQPG
>EHI_178050_ATP-binding_cass R-----DNLDPKQTSDEEMKRVLKLVNS-----VN
* : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_ GLDAKITANGDNL SAGQRQLVCVARALLRDAPVVILDEATAQVDRENDAI
>EHI_178050_ATP-binding_cass ELDDVVLENGDNFSLGQRQIICLARALLKSKILIMDEATANIDIQTDKT
* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_ IQSTIRTALEDREVVIATAHRIINTIIDFDRIIVMDAGEVKEFOTPRALLSN
>EHI_178050_ATP-binding_cass IQEMVRKNFNECTVITVAHRLQSIMDANKVFVFDKGEVENDSPSHLIDN
* * . * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_ PESFFSRLVAKCEDAEELYQKAYAKGSKTNSDPERAS-----
>EHI_178050_ATP-binding_cass ENTIFNHLVQSGCADELKRVAKKTTIFGSNFRNRILNESTKSSEGND
: : * : * * . * : * : * * : * : * : * : * : * : * :

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_ -----
>EHI_178050_ATP-binding_cass LKPELELNLNNSNATPVHFEETSDRNGSERHLLSPVVVASNENDLSSP

>GL50803_17132_MRP-like_ABC_ -----
>EHI_178050_ATP-binding_cass SESSSSQ

```

Fig 34. Alineamiento en ClustalW entre la proteína “ABC transporters” de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_17132 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.


```

>GL50803_115052_Multidrug_re MSASETLSSGAVQDGGKQAAGHVRKGCCTKNYPPPSDFDKANFSTKRPL
>EHI_178050_ATP-binding_cass MSLSKSIIEPKIEIELEGEDTTS-----SDDGIFETDDVVVKYDKS
** .. .. :*: : : . . *: : . .

>GL50803_115052_Multidrug_re QSLYCSSLNPFPTFMSPIIKRSRQGTLYLSDLHPPVDRHCQIAATDFV
>EHI_178050_ATP-binding_cass PNSVVKFFRTLFFRTSMPQLLKGRKGNLRVSDLCPIPKTLILEGYEAELEK
. . .:.* * .**:*:* ** * . : : :

>GL50803_115052_Multidrug_re REWNKKVYKQKQPSIILSVIRASMGRFITACIMILFFVAAQMVAPFTIQR
>EHI_178050_ATP-binding_cass ENWEKEALS-KHPSLFLTIFKKEWYHFLFSYILVSIYELFSLAFLECYQ
.:*:*: . . *:*:*: : : : . : : * : : : . . . * : *

>GL50803_115052_Multidrug_re ISNHLITTVPGSIGQKNTWDAIVAVLQITYPYILAVFFGQLIYALSDSI
>EHI_178050_ATP-binding_cass IVKWLNKENP-----PTYMAAVFICLAIIVFQLIVCFQSQEF
* : * . * : : : * : . . * : * : * : * : * : *

>GL50803_115052_Multidrug_re LWYLLSDMVSRLFGLTLDILYNKMLSLSDITRQNSAAGNLVNLFFADTMR
>EHI_178050_ATP-binding_cass GKKWIFVVSALRIRNGLTGLIYDKALKLNASGIEE--PGRLVNLMANDASV
: . * : * : : * : * : * : : * : * : * : * : *

>GL50803_115052_Multidrug_re ISNFMLLLIFVMTMPLMFVICYLYMAIEIDPKGIGGLIALFIILPIVGLI
>EHI_178050_ATP-binding_cass FIGNIEYAVFGLASPMFIVLFLVIYIYMG-KWVYIPLIVFVFNIIINFG
: . : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

>GL50803_115052_Multidrug_re LFAFTRLLFS-LLSMTDLRVKKISEVLNGMKVVKLFGMEDVQEARVMNIR
>EHI_178050_ATP-binding_cass FGFLSGFLYNKFKVHVKDKRVSFNGEILHNIKFIKYNWKEPKMKRIWVLR
: : : : * : : : : * : * : : * : * : : * : * : : * : *

>GL50803_115052_Multidrug_re NKEIGMIFRFGIILSGFGLVVNGAAPLMSLFGFL-FFMTSSSFDVANAYT
>EHI_178050_ATP-binding_cass IIEEIWLVGVFVRSSFYITITIEIGAILSLSMFVTMVLSEAEQLLANVIT
* : : : * : * : * : . . : : * : * : : : : : * : *

>GL50803_115052_Multidrug_re AVFVYNMLGLVVFVFMPLMMSGISESKISSKRILFTITLPQPDYGVVTRER
>EHI_178050_ATP-binding_cass TISLFNSIRIPIRTIGMAATCISSINVS LGRIKRFLLKP-----
: : : * : : : : : : : * : * : * : * : *

>GL50803_115052_Multidrug_re SYTLTKGETVPYAIKTSNQPSFCWGLREDSIIPPLDPMFKDNMKKQRQV
>EHI_178050_ATP-binding_cass -----

>GL50803_115052_Multidrug_re LQLYPRFKKHYEKKVKEYKAWKTKNPSVSVDATEEDILLNRFDSIDVTDK
>EHI_178050_ATP-binding_cass -----ELQPIQVVK
: : : * : * : *

>GL50803_115052_Multidrug_re EADAMRYIDSWVIEFGLLPDKVTSFGAYIPQAYQASPDONPYQVLKKTFF
>EHI_178050_ATP-binding_cass ESENAIEMN----DVNYIFPDGETAF-----
*: : : : : : : * : * : *

>GL50803_115052_Multidrug_re LHRIVVRGLYDLAAEQNVSRDLKRYKDPARCKQIIDAQLDKNPNHVDL
>EHI_178050_ATP-binding_cass -----

>GL50803_115052_Multidrug_re PPRIKNLDLSIPKGYLVGICGPGVAGKTTLFSALLGELRLVREQRALDLS
>EHI_178050_ATP-binding_cass ---ACDELKIKKGE LVCVLGVS GSKSSFL LALLNELEKKKGE-----
: * : * * * : * : * : * : : : * : * : * : :

>GL50803_115052_Multidrug_re YKFNMLEIKFDYQTLPTPTS FVEKYSTEDPRFDPQIPHVHIYGSVAYFA
>EHI_178050_ATP-binding_cass -----SYLNGKITYS
: : * : * : *

>GL50803_115052_Multidrug_re QSSCIFSGTLRDNI VFYRPFDRARYEKVLDICCLIPDLKLFKAGDLTEIG
>EHI_178050_ATP-binding_cass QSAWLMNATVRENICFLAPYNKEKYKQAIKDACTSDIDNLVGGDQYVIA
** : : : * : * : * * : : : : : * : * : * : * : *

>GL50803_115052_Multidrug_re EKGVSLSGGQKARVALARAVYSGCDILLLDDPLSAVDSHVGRQLWNEVIC
>EHI_178050_ATP-binding_cass EKGNSLSGGQRRIALARSLYNSQDIMLLDDPLSAVDFHVGTYIFENAIK
** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

```

```

>GL50803_115052_Multidrug_re      GFP LKEQGT TLVLIASHQTYFFGNC D LVIRI EDGEIVHS DTP DNLMNK GIDF
>EHI_178050_ATP-binding_cass     KSLG--GKTRIIVTNQTYFFIEKADR I IVIDDONK LAFNGSL EELKNS SLEA
      * . * : * : * * : : : * : * : * : : : * * : : : * * : :
>GL50803_115052_Multidrug_re      GFSRTT SVASGL NNAGRI E SVAS Q LV IPT Q TDEE KRRDLALVT DDGNEAK
>EHI_178050_ATP-binding_cass     SQFIK T L S SK S ENNEENGEV ISGDSYNT K T REEGK-----
      . . * . : . : * * . * * . * : * * :
>GL50803_115052_Multidrug_re      GKLM LAEFA Q QG S V S GTFYKRW F R S G S R C S L L C Y L V F L L W Q G S T Q Y Q G
>EHI_178050_ATP-binding_cass     -----ELGRV SFK V V W E Y I K A G L V F L G A A C I V F L S A R I V A L Y F Y N
      : * * * . . * . : : : * . : : : * : : : :
>GL50803_115052_Multidrug_re      VLI NHWVKD QYHFK L S D T K S Y N Y K Y I G I Y A G M T V S T M L M A Y L S S V F L V S
>EHI_178050_ATP-binding_cass     T F L T K W G R --- S I R P K L G L P Q G N R E E F N K F C Y T F I A D F V G V Y L T E I F I I F
      : : : * : : : : . : . * : : : . : : : : * : : * :
>GL50803_115052_Multidrug_re      F I N S A A R A L F K K M L R S I F R S P M S F F D T T P T G R I L N R F S K D T D S H D I Q V M R
>EHI_178050_ATP-binding_cass     F C I T S S H N I H K M V K V M N A K L G F F D I T P I G R I L N C F S R D F Q N I D Y A L A M
      * : : : . : * * : : : : : : * * * * * * * : * : . : * :
>GL50803_115052_Multidrug_re      F I N Q A L G N G A S L V G M L V M I C V L W P A L I V V I P T I I L Y A V I F F M F R R V A P Q
>EHI_178050_ATP-binding_cass     F T E P L I V M V S T I V I V A I T I K A S I Y L V L V L V I V I F V A F Y I F T S K P V I E
      * : : * : * * : : * : : : * : * : : : : : : : : : :
>GL50803_115052_Multidrug_re      V K R L E S I T K S P V I N I C T E S L G A L P S I R A Y S F E S H F I A K A R E Q I T I N S S A Y
>EHI_178050_ATP-binding_cass     I Q R L E G V R S P I F V H F D Q T L M G L S T I R V S N G Q N E F K T L I D K I K N N T M A F
      : * * * : : * * : : : * * . * : * * . : . . * : * : * : * :
>GL50803_115052_Multidrug_re      W M Q I S L P R W L S F R L N V I G A F F C G F I A L I S C V I A P V N I G G I Q F I Q Y A G L I L
>EHI_178050_ATP-binding_cass     Y T C K M A K L W Y L Q R M D W I G A F I I V I T T T V I C I T K - I N K G - M D P S T A G T A L
      : : * * * : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * :
>GL50803_115052_Multidrug_re      S Y S F N I Q M I L S Q F V T A W V Q A E A E V T S I E R V M E Y G D L P A E D L S D R A N K I I E
>EHI_178050_ATP-binding_cass     T N L T N I P S T I T L G L A I L E I E T I M Q S T E R I F Q L N K V R N E E S --- E R V K E
      : * * : : : * : : * : : * * * : : . : : * :
>GL50803_115052_Multidrug_re      S C T L A S E L W P R A P E A G I K V K N L N F R Y R P D L D L T L R D C N F E I L P G E H G V V
>EHI_178050_ATP-binding_cass     N Y E Q P P D E W P -- S K G E V K F K D Y K F R Y R R G L P L V L K G I N A S I E D K E K I G V
      . . . : * * . : . : * : : * * * : * * * : * . * : * : * : * : * * :
>GL50803_115052_Multidrug_re      G R T G A G K S S L T V A F F R L A E P D A G S S I V I D N V N L L A D V G L H Q A R Q A I A I I P
>EHI_178050_ATP-binding_cass     G R T G S G K S T L M A G L F R I E E P A G G - K I L V D G I D I T K V P - L H I L R N R M C I L P
      * * * : * * * : * . . : * * : * * . * : * : * : : : * * * : : * * : : . * * :
>GL50803_115052_Multidrug_re      Q E P F L F S G T L R Q S L C A Y S A S V A E G L Q P G P G V E K V P D E K L W R V L E Q V R M R E
>EHI_178050_ATP-binding_cass     Q E A T M F S G T V R D N L D P ----- T K Q T S O E M K R V L K L V N S --
      * * . : * * * : * . * : : : : : : : * * * : * : * * :
>GL50803_115052_Multidrug_re      Y F E K Q P G G L D A K I A A N G D N L S A G Q R Q L V C V A R A L V R E P R C V V L D E A T A Q V
>EHI_178050_ATP-binding_cass     -----V N E L D D V V L E N G D N F S L G Q R Q I I C L A R A L L K K S K I L I M D E A T A N I
      . * * : * * * : * * * : * * * : : : : : * * * : :
>GL50803_115052_Multidrug_re      D R E N D R L I Q D A I R E N L A D T T I F S I A H R L D T I I D F D R I L V V D A G R I A E Y D T
>EHI_178050_ATP-binding_cass     D I Q T D K T I Q E M V R K N F N E C T V I T V A H R L Q S I N D A N K V F V F D K G E L V E N D S
      * : . * : * * : * : * : : : : * * * : * : * : * : * * :
>GL50803_115052_Multidrug_re      P A N L L R R E N S I F S H L V A K T G -----
>EHI_178050_ATP-binding_cass     P S H L I D N E N T I F N H L V Q Q S G C A D E L K R V A K K T T I F G S N F N R N I L N E S T K
      * : * : . * * : * * * : * : *
>GL50803_115052_Multidrug_re      -----E E T A G K L R A A A F L A E Q Q R A K G E
>EHI_178050_ATP-binding_cass     S S E G N D E L K P E L E N L L N N S N N A T P V H F E E T S D R N G S E R H L L S P V V V A S N
      * * * : . : : * . . . .
>GL50803_115052_Multidrug_re      K V D I S A Y F -----
>EHI_178050_ATP-binding_cass     E N D L S S P S E S S S S Q
      : * : * :

```

Fig 35. Alineamiento en ClustalW entre la proteína “ABC transporters” de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_115052 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_28379_Multidrug_res      ---MGIRPRVYPPPPDNAQEFKLEAGERLAERYPRFMFYTLAWFYPVIR
>EHI_178050_ATP-binding_cass     MSLKSIIEPKIEIELEGEDTSSDDGIFETDDVVKYDKSPNSVVKFFRTLFF
      .*.*:      ::: . . . . * : . : * : :
>GL50803_28379_Multidrug_res      TASKQGALYN--CDVYALEKGMTTEESIAQYLSAEAKLARHSNEGKKFPN
>EHI_178050_ATP-binding_cass     RTSMPQLLKGRKGNLRVSDLCPIPKTLILEGYEAELENWEKEALSHPNS
      :*  * .  : : . : . : * : .** *  .. : .*.*
>GL50803_28379_Multidrug_res      IIRLSLQMNLRDFLLCIFSAMIYKLASLCTPITVNFVLSILSPENVRAIR
>EHI_178050_ATP-binding_cass     LFLTIFKKEWYHFLFSYILVSIYELFSLAFPLECQYIVKWLKNEP----
      : : : .**.: . **:* ** * : : : * . **
>GL50803_28379_Multidrug_res      TNLLLDQGVSGVTTPAVLSVLFRRQSAVWLVVVVARLVYFFTSITFLTA
>EHI_178050_ATP-binding_cass     -----PTYMAAVFICLAIIVFQLIVCFSSQEFG
      . : . * . : * : : : : .
>GL50803_28379_Multidrug_res      RKILFKTQMALQDRLFTKLLTVSELTKSSVLS--GSIINFLFTDQNTLI
>EHI_178050_ATP-binding_cass     KKWIFVSAALRIRNGLTGLIYDKALKLNASGIEEPGRVLNLMANDASVFIG
      :* :* : : : : * : : : : * . * : * : : * . . :
>GL50803_28379_Multidrug_res      VIIWLPILVELLIAVIYSAIYLSLFTHPAAMMGLIAFAIAMPLSFYITSM
>EHI_178050_ATP-binding_cass     NIEYAVFGLASPVMFIVLFLVIYIYMGKWVYIPLIVFVFNIIINFGFGL
      * : : : : . * : : : : . : **.* : : * : :
>GL50803_28379_Multidrug_res      QGRITSLYLMNSDSRIRIASEILKGIKVIKFFGQEDIHTVRLGYARKKEL
>EHI_178050_ATP-binding_cass     SGFLYNKFFVHVKDKRVSFMGEILHNIKFIKYNNEKPKMKRIWLR----
      .* : . : : .*.* : : .***:.*.*: . * . * : : *
>GL50803_28379_Multidrug_res      RYLQKLLMNEAFVYICGEVCLPMMMLFGFAALASYGLLTDAAAGYSASLVF
>EHI_178050_ATP-binding_cass     -----IIEEIWLIIVGFVRRSSFYITIEIG-----AI
      : : : * . ** . : * : : . : .
>GL50803_28379_Multidrug_res      VLLAEGISFIPTALNSLIVSIISGKRINAFSLPDVADNLAAGSAIGSAK
>EHI_178050_ATP-binding_cass     LSLSMFVTMVLSEAEQLANWITTISLNFNSIRIPIRTIGMAATCISSINV
      * : : : : : : : : : * : : : * : : * .
>GL50803_28379_Multidrug_res      SLSGHRGTVIQREPLGSDVAVHIKGTFTWGFAKHLQKPEILDVSYAENRA
>EHI_178050_ATP-binding_cass     SLG-----RIKRFLLKPELQPIQVNVN---
      ** . : : * ** : : . :
>GL50803_28379_Multidrug_res      SIKRIAHNAVKAQKAYESLLTMLGISYAHKNKNEKLNKNETLSLLGSEAKE
>EHI_178050_ATP-binding_cass     -----KESENAIEMNDVNYIFP-----
      * * . : * . : * .
>GL50803_28379_Multidrug_res      SLLCSFTPQQIVDLMHRPTHQGETADHFALQLRIALPSKIEIPANIIEGD
>EHI_178050_ATP-binding_cass     -----
>GL50803_28379_Multidrug_res      YLSTNDESLVNKLRIVVQLATTYKFIDPETLRKYEVQKAIIDSSPVLGCV
>EHI_178050_ATP-binding_cass     -----DGETAFAC
      * . . . . :
>GL50803_28379_Multidrug_res      DFSVRKGGELVGFVAVGSGKTALHMALLGELTSTDKISHG-GTVAYYSQV
>EHI_178050_ATP-binding_cass     ELKIKKGGELVCGVSGVSGKSSFLALLNLEKKGESYLNKGITYSSQS
      : : : : * * * * : * : * * * : : : * * * * . . . * : * : * * *
>GL50803_28379_Multidrug_res      PCVMSGTIISNIIFHKPLDEQKLAKVISLCLLDKDLAVLPSGINTVEGER
>EHI_178050_ATP-binding_cass     AWLMNATVRENICFLAPYNKEKYQAIKDACLTSDIDNLVGGDQYVIAEK
      . : * . * : . ** * * : : * : . * . ** * : * * : : * :
>GL50803_28379_Multidrug_res      GTSLSGGQKARIALARAVYADSDIYLLDDPLSAVDAHVARRLWENCILGY
>EHI_178050_ATP-binding_cass     GSNLSGGQRQRIALARSLYNSQDIMLDDPLSAVDFHVGTYIFENAIIKKS
      * : * * * * : * * * * * : * . . ** * * * * * * * * . : * * *
>GL50803_28379_Multidrug_res      LIRQKQKTVLISSHQTQFFGSCDRVYEIQDKKPVERRKDDLKRNIIISVP
>EHI_178050_ATP-binding_cass     LGG---KTRIIIVNTQTYFIEKADRIIVIDNKLAFNGSLEELKNSSLEAS
      * . . . . * : * * * * : * : * * : * : * * . . . : * * . . . .

```



```

>GL50803_28379_Multidrug_res SKLSLAASSQNDICTEASSVDPPTNTDEANKTKNIVDEQHSKGKALSKEK
>EHI_178050_ATP-binding_cass QFIKTLSSKSENNENGEVIGDSYNTKTR-----EEGKELGRVSFKV
. . : * : : : * : : . . : : * : . * : * : :

>GL50803_28379_Multidrug_res YISWIKYGGIGKFLVCLVLYIITQLIQFMNVFIDSNS---TNRYGMPSH
>EHI_178050_ATP-binding_cass YWEYIKAGLVFLGAACIVFLSARIVALFYNTFLTKWGRSIRPKLGLPQG
* : * * * : . * : * : : * * * : * . : * : * .

>GL50803_28379_Multidrug_res FYPLLYTAALVLLIGMIIVMR--YLTINFISISATTKAHKSMANAILHTRM
>EHI_178050_ATP-binding_cass NREEFNKFCYTFIADFVGVYLTEIFIIFFCITSSHNIHKMKVKKVMNAKL
: . . : : : * : : * * : * : : * * : * : : : : : :

>GL50803_28379_Multidrug_res SFFETNPMGRILNRLSSDVRECDRDVYDVTMTPLCELLISVSVSSLTSMIF
>EHI_178050_ATP-binding_cass GFFDITPIGRILNCFSRDFQNIIDYALAMFTEPLIVNVSTIVIVAITITKA
.* : * : * * * * * * * : * : * * : : : : *

>GL50803_28379_Multidrug_res AWPTIFAFPLVGIIFILLRRYRMITPQVKRLSNMVTSPVITLVEEVSSN
>EHI_178050_ATP-binding_cass SIYLVILVIVVIFVAFYIFTSKPVIEIQRLLEGVSRSPIFVHFDQTLMG
: : : * : : * * : : . : : * * : * * : : : .

>GL50803_28379_Multidrug_res LPLVRASGMQADIQNIHRKNLSRKYAVEWMMYCCNRWASFNYSICISVLLS
>EHI_178050_ATP-binding_cass LSTIRVSNQNEFKTKLIDKIKNNTMAFYTCMAKMLWYLRQMDWIGAFII
* : * : * * : : : . : : : : . : : * : . * : : :

>GL50803_28379_Multidrug_res LALSIGVIIIAAYGDVAR-YVGVLLNGFEVIELLSVLIYSILFERSFA
>EHI_178050_ATP-binding_cass VITTTVICITKINKGMDPSTAGTALTNLTNIPSTITTLGLAILEIETIMQ
: : : * : : . : * * * * : : . : : : : : : :

>GL50803_28379_Multidrug_res SFERVHEYSKLSPEEADAPAQDVEGSRARPSEGEYVQISRMSFRHRKELP
>EHI_178050_ATP-binding_cass STERIFQLNKRNEESERVKENYEQPPDEWPSKGEVKFKDYKFRYRRGLP
* * : : * : * * : : * : . . . * : * : * * * *

>GL50803_28379_Multidrug_res CTLINVNLAFRKGERIGIVGRTGAGKSSLVAALFRLAEPERAETDSPPSR
>EHI_178050_ATP-binding_cass LVLKGINASIEDKEKIGVVGRGSGKSTLMAGLFRIEAPAGGK-----
.* : * : * : : * : * * * * * * * * * * * *

>GL50803_28379_Multidrug_res QYDKPLISIDGYPIDRLPLKDARSFLTIIIPQDPFVFEGLRSSLCPYSHM
>EHI_178050_ATP-binding_cass -----ILVDGIDITKIVPLHILNRNMCILPQEATMFGTVRDNLDPKTQT
* : * * : : * * : * : * * : * : * * * * * * *

>GL50803_28379_Multidrug_res LAEKIPVGEIPKTVRRHTDMLWSALEKVCLDRDFESQLEGLAEPITSCG
>EHI_178050_ATP-binding_cass SDEEMKR--VLKLVN-----SVNELDDVVLNG
* : : : * * . : : * : : : *

>GL50803_28379_Multidrug_res DNLSAGQRQLVCVARALLRNAPVILDEATAQVDRENDAIQSTIRTALA
>EHI_178050_ATP-binding_cass DNFSLQQRQIICLARALLKSKILIMDEATANIDIQTDKTIQEMVRKNFN
* * : * * * * * * * * * * : : * * * * * * * * * *

>GL50803_28379_Multidrug_res DRVVIAIAHRINTIIDFDRIIVMDAGEVKEFDTPRALLSNPESLFSKLVLA
>EHI_178050_ATP-binding_cass ECTVITVAHRLQSIMDANKVVFVFKGELVENDSPSHLIDNENTIFNHLVQ
: * * * * * * * * * * : : * * * * * * * * * * * *

>GL50803_28379_Multidrug_res ECEDAEELAGIARARSE-----
>EHI_178050_ATP-binding_cass QSGCADELKRVAKKKTIFGNSFNRNILNESTKSSSEGNDELKPELELNL
. . * : * * : * : :

>GL50803_28379_Multidrug_res -----
>EHI_178050_ATP-binding_cass NNSNNATPVHFEETSDRNGSERHLLSPVVVASNENDLSSPSESSSSQ

```

Fig 36. Alineamiento en ClustalW entre la proteína “ABC transporters” de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_28379 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_221689_ABC_transpor -NLVSNIPRMIAVP-----LKLLMIVLFL
>EHI_178050_ATP-binding_cass MSLKSIIEPKIEIELEGEDTSSDDGIFETDQVVKYDKSPNSVVKFFRRTLFF
      . * * * : * : : : : ** :

>GL50803_221689_ABC_transpor VFQIDRSALAGFGGILVT--LPFISLLTLYNLFLEKRYAAARDVRARHVT
>EHI_178050_ATP-binding_cass RTSMPQLLKGRKGNLRVSDLCPKPTLILEGYEALKENWEKEALSHPKS
      . : : . * : * : * : . * * . * : : : : * :

>GL50803_221689_ABC_transpor EVIAGLR-----VIKAYNYQELCR-----SRMHPRRRQELIY
>EHI_178050_ATP-binding_cass LFLTIFKKKEYHFLFSYILVSIYELFSLAFPLECQYIVKWLKKNPPTYM
      . : : : : : : * : * . : : :

>GL50803_221689_ABC_transpor VGRMTLARSCIHVGYHTWPAMLLCAFLSMLKAGFTTANAYTAAYLFN-
>EHI_178050_ATP-binding_cass AAVFICLAIVFLIVCFSQEFGKKWIFVSALRIRNGLTGLIYDKALKLNA
      . . : : : * : : : * * * : . * . * * * : *

>GL50803_221689_ABC_transpor -----IFARVIIDLPLYLSSLSAIVSCHRARQFLTLPEGD--YCGK
>EHI_178050_ATP-binding_cass SGIEEPGRLVNLMANDASVFIGNIEYAVFGLASPMFIVLFLVIYIYMGK
      . : . * . * : . . * : . . * : * *

>GL50803_221689_ABC_transpor LHEKNDSTAAQFVIWTVGNPSYS-----WGRQCHRHIP
>EHI_178050_ATP-binding_cass WVIYPLIVFVFNIIINFGFGFLSGFLYNKFVHVKDKRVSFMGEILHNIKF
      . . * * . * * * : * * *

>GL50803_221689_ABC_transpor SSFNSNEQSYKARNRRLLSMRARYSKLLG---AYNALAKRLPEDVLVGA
>EHI_178050_ATP-binding_cass IKYNNWEKPKMKRIWLRRIEIEIWLILVGFVRSSFYITITIEIGAILSLSM
      . * . * . * * * : . : * : * : : : : : : :

>GL50803_221689_ABC_transpor ELDGLIETPSLAATGSPRGDEPHAPDGLLLPKQPATPDASRCSQTDRL
>EHI_178050_ATP-binding_cass FVTMVLSEAEQLAMVITISLFNIRIPIRTIGMAATCISSINVSLGRI
      : : : . * : . . . . : : . * : * . . . * :

>GL50803_221689_ABC_transpor RKYYVELAAHRQITVLQS-----SVRELETECPVPLRSLQFSIPRGC
>EHI_178050_ATP-binding_cass KRFLCLKPELQPIQVVKESENAIEPMDVNYIFPDGETAFACDELKIKKGE
      : : : : * : . * * . : : . . . : : * : *

>GL50803_221689_ABC_transpor LVGVGGCVSGSKSSLLLAILEGEVALSTSSSSDSAHHSVGRYIYCSQVPS
>EHI_178050_ATP-binding_cass LVCVLGVSVSGSKSSFLALLNELEKKKGES-----YLNKITYSSQSAM
      * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

>GL50803_221689_ABC_transpor VLTGTIQFNIQLFLPYDEKMLATRLSCLDGLSELPGGLATLVGSRGV
>EHI_178050_ATP-binding_cass LMNATVRENICFLAPYNKEKYKQAIKDACTSDIDNLVGGDQYVIAEKGS
      : : . * : : * : : * : * : * : * * * : : : *

>GL50803_221689_ABC_transpor TLSGGQKARLSIARAIYSADIIYLFDDPFASLDHVKSLWSETIKGYLL
>EHI_178050_ATP-binding_cass NLSGGQRQRIALARSLYNSQDIMLDDPLSAVDFHVGTYIFENAIIKSLG
      . * * * * : * : * * * : * * * * * : * * * * *

>GL50803_221689_ABC_transpor ARGKTVVLTATNQMHYFRSCLKVLFIDAGTIKEVTPESVDIDCSPLVPAEV
>EHI_178050_ATP-binding_cass --GKTRIIVTNQTYFIEKADRIIVIDD-NKLAFNGSLEELKNSSLEASQF
      * * * : * * * : : : : * * . . . . : : * * : :

>GL50803_221689_ABC_transpor LSLTSIQAVEKHDSOYQVHR--MAAVLKEEKCTELGSVNSKYKLVFKAG
>EHI_178050_ATP-binding_cass IKTLSSKKSENNEENGEVVISGDSYNTKTREEGKELGRVSFKVYWEYIKAG
      . : * : * : : : * : . . * : * * * * : * *

>GL50803_221689_ABC_transpor GTWRVFIYVVMWFCILMLQLASLLINFWT---EQRRLGLSTGG--CIGLF
>EHI_178050_ATP-binding_cass LVFLGAACIVFLSARIVALYFYNTFLTKWGRSIRPKLGLPQGNREEFNKF
      . : . * : * : * : . : . * : * * * . * : :

>GL50803_221689_ABC_transpor LSFSAFAMVILFVGQLFYMLFTRKAAEKLYYSMEEGLINTSMSFYDAHPI
>EHI_178050_ATP-binding_cass CYTFIADFVGVYLTETIFFCITSSHHIHKMKVMKVMNAKLGFFDITPI
      : * : * : : : * : * : : : : * : : * : * : * *

>GL50803_221689_ABC_transpor GRILNRLIADTGTCDLTVKNGLAATCENSIFVLGSLLATLLMSWPSTFVL
>EHI_178050_ATP-binding_cass GRILNCFSRDFQNIQDIALAMFTEPLIVNVSTIVIVAITITKASIYLVILV
      * * * * : * . * : : . * : : : : * : : :

```

```

>GL50803_221689_ABC_transpor      VPLLGLFLWMFMGFRAVSPLLRRTTSLNNSHVCNFILDTYYNLAASLRAYR
>EHI_178050_ATP-binding_cass      LVIVVIFVAFYIFTSKPVIEIQRLGVSRSPIFVHFDQTLMGLSTIRVSN
                                   : : : * : : :           : * . : . : * . * : * .
                                   : : : * : : :           : * . : . : * . * : * .

>GL50803_221689_ABC_transpor      YEAQAASYARAVLAMEAAFWMQVSLYRWLHFTTLLSICVSAVVTVSTI
>EHI_178050_ATP-binding_cass      GQNEFKTKLIDKIKNNTMAFYCKMAKLWYLRQMDWIGAFIIVITTTVIC
                                   : : : :           : * :           * :           : : : * .
                                   : : : :           : * :           * :           : : : * .

>GL50803_221689_ABC_transpor      ITSS-FANGEIFSGTVLMNGFDVVMMLIDMCFGIVAMDLSMASVERVAEY
>EHI_178050_ATP-binding_cass      ITKINKGMDPSTAGTALTNLTNIPSTITTLGLAILEIETIMQSTERIFQL
                                   ** . . . : ** * * : : : : : * : : : * * ** : :
                                   : : : * : : :           : * :           * :           : : : * .

>GL50803_221689_ABC_transpor      ATLEPESTSAPHSPSSLPADSTLG---LIVQDLSLRYQQHLPVVLHGISF
>EHI_178050_ATP-binding_cass      NKVRNEESERVKENYEQPPDEWPSKGEVKFKDYKFRYRRGLPLVLKGINA
                                   . : . * . : . . * . * . . : : * . : * : * : * : * .
                                   : : : * : : :           : * :           * :           : : : * .

>GL50803_221689_ABC_transpor      TAAKGERVAIIGKGTGSGKSLVNAILRLVEPEAGSEILLNGLNLLKMGHLH
>EHI_178050_ATP-binding_cass      SIEDKEKIGVVGRGTGSGKSTLMAGLFRIEPPAGG-KILVDGIDITKIVPLH
                                   : . * : : : * : * * * * * : : * : * * . * : * : * : : : * : *
                                   : : : * : : :           : * :           * :           : : : * .

>GL50803_221689_ABC_transpor      QARSKVTLIPQDPFIFSGTLRAYLSGDRRFSDLELWRVLEKTHLREYFAA
>EHI_178050_ATP-binding_cass      ILNRNRCILPQEATMFSGTVRDNLDPKQTSDEEMKRVLKLKLVNS-----
                                   * : : : * : : : * : * * * * * * . : : * : * : * : * : :
                                   : : : * : : :           : * :           * :           : : : * .

>GL50803_221689_ABC_transpor      QSKQLDYHLFDNGSNLSLGQRQLLCVAHALLRDTEVILLDEVTAHVDSAA
>EHI_178050_ATP-binding_cass      -VNELDDVVLENGDNFSLGQRQIICLARALLKSKILIMDEATANIDIQT
                                   : : * : : : * : * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : *
                                   : : : * : : :           : * :           * :           : : : * .

>GL50803_221689_ABC_transpor      EAAIQDALGAYKEQKIIITIAHRLRTVCNQDRVIMAGGQIVEQGPPRVL
>EHI_178050_ATP-binding_cass      DKTIQEMVRKNFNECTVITVAHRLQSIMDANKVVFVFDKGELVENDSPSHL
                                   : * : : : : : : : * : * * * * : : : * : * : * : * : *
                                   : : : * : : :           : * :           * :           : : : * .

>GL50803_221689_ABC_transpor      FHKPDSIFANMVRCSDSEDLVDFLTSM-----
>EHI_178050_ATP-binding_cass      IDNENTIFNHLVQSGCADELKRVAKKKTIFGNSFNRNILNESTKSSSEG
                                   : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
                                   : : : * : : :           : * :           * :           : : : * .

>GL50803_221689_ABC_transpor      -----
>EHI_178050_ATP-binding_cass      NDELKPELELNLLNNSNATPVHFEETSDRNGSERHLLSPVVVASNENDL

>GL50803_221689_ABC_transpor      -----
>EHI_178050_ATP-binding_cass      SSPSESSSSQ

```

Fig 37. Alineamiento en ClustalW entre la proteína “ABC transporters” de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_221689 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.


```

>GL50803_3470_ABC_transporter
>EHI_178050_ATP-binding_cass
-----MVANSLDRGFVL
MSLKSIEPKIEIEGEDTSSDDGIFETDDVVKYDKSPNSVVKFFRTLFF
. . : * : :

>GL50803_3470_ABC_transporter
>EHI_178050_ATP-binding_cass
RRARPRRQ-----FVGVFCKN-----
RTSMPQLLKGRKGNLRVSDLCPIPKTLILEGYEAELENKEKEALS KHP S
* : * : * : *

>GL50803_3470_ABC_transporter
>EHI_178050_ATP-binding_cass
--IDLLQRSWYGLVIVVGV-----AILMGVVIKVVHYFYLAQDKTAV
LFLTIFKKEWYHFLFSYILVSIYELFSLAFPLECQYVVKWLNKENPPTYM
: : : : * * : : * : : * : : : * :
: : : : * * : : * : : * : : : * :

>GL50803_3470_ABC_transporter
>EHI_178050_ATP-binding_cass
DPNAQIVTENHDLIPSASAHKDANYNFLFKREGVDLGSLSYDSTVENTG
AAVFICLAIVFQLIVCFSEQEFGKKWIFVSALRIRNGLTGLIYDKALKLNA
. : : : * * . * . . : : * : * . * * * : : . .

>GL50803_3470_ABC_transporter
>EHI_178050_ATP-binding_cass
-----YLG-----FMGMKYPVGYEYKAGLRTVSDSV
SGIEEPGRVLNLMANDASVFIGNIEYAVFGLASPVMFIVLFLVIYIYMGK
: : * : : * : * : * : * : .

>GL50803_3470_ABC_transporter
>EHI_178050_ATP-binding_cass
WDG-LYRIITYPYFTDMKRYLSNYDYDRDLDLPGGAADID-----
WVYIPLIVFVFNINIFGFGFLSGFLYKFKVHVKDKRVSMGEILHNKIF
** * : : : : . : * * : * : . . .

>GL50803_3470_ABC_transporter
>EHI_178050_ATP-binding_cass
-----VSATQAADQVFVEAIHSSPLPITVQPGSVVSTDY
IKYNNWEKPKKRIVWLRIIEEIVLILVGFVRSFFYITITIEIGAILSLSM
: : : : * : * * * * : * : * : .

>GL50803_3470_ABC_transporter
>EHI_178050_ATP-binding_cass
DDKRIDHLPETIRRLFTHATRTEAYRANMMVNEQVKKGFMLHDIPLLAV
FVTMVLSEAEQLANVITITISLFNISIRIPIRTIGMAATCISSINWVSLGRI
. : . * . : : * . . . : : * :

>GL50803_3470_ABC_transporter
>EHI_178050_ATP-binding_cass
D--ISKQPRPMQVTGTNAADTVVTISSGYSVYG---YKKQTFVFSQND
KRFLKPELQPIQVVKKESENAIEMNDVNYIFPDGETAFACDELKIKKGE
. : * : * * : : : : . * . . : : : : : :

>GL50803_3470_ABC_transporter
>EHI_178050_ATP-binding_cass
YLRLLNLQYMMFSSINIRALINQIYSIPTSLPAENIYAP-----
LVCVLGVSVSGSKSSFLALLLNELEKKKGE SYLNGKITYSQSASAWLMNATV
: : * . * : * * : : . * : * .

>GL50803_3470_ABC_transporter
>EHI_178050_ATP-binding_cass
-----LYAPVIDGNVYKQFWRNVNAN-----DIGPDMYTPMYMCFILP---
RENICFLAPYKNEKYKQAIKDACTSDIDNLVGGDQVYIAEKGSNLSGGQ
: * * . : * * : : . : * * * . *

>GL50803_3470_ABC_transporter
>EHI_178050_ATP-binding_cass
-FCFFILTPLSYRLSQEKGEGINHLHYMMG----LRYIYRWLGDVFVYQL
RQRIALARSLYNSQDIMLLDDPLSAVD FHVGYTYIFENAIKKS LGGKTRII
: : . * : : . : : : : * . * : * . . :

>GL50803_3470_ABC_transporter
>EHI_178050_ATP-binding_cass
VITSIVALICVFSSFLGGLNGLKLNTPVAWVP-TILLTIILMIPVFS----
VTNQT YFIEKADRIIVIDNKLAFNGSLEELKNSSLEASQFIKTLSSKKS
* . . : . : . * * * * : : : * : * : * *

>GL50803_3470_ABC_transporter
>EHI_178050_ATP-binding_cass
-----AFVAFFETGRNSSLVCVTLAIVVSVIGLLYG-----
ENNEENGEVISGDSYNTKTR EEGKELGRVSKVYWEYIKAGLVFLGAACI
: : : * * : : . * . . : * * :

>GL50803_3470_ABC_transporter
>EHI_178050_ATP-binding_cass
----IKYSDLTIIDRSINKW-----YALIPVFG
VFLSARIVALYFYNTFLT K WGRSIRPKLGLPQGNREEFNKFCYTFIADFV
: * : : : * * * * * * *

>GL50803_3470_ABC_transporter
>EHI_178050_ATP-binding_cass
-----PVSILTQLQALAMLQTDTL YLAAHHLRFSRRGDLSPDFVG
GVYLTEIFIIFFCITSSHHIHKMKVKKVMNAKLGFFDITPIGRILNCFSR
. * : : : : : : : : * : *

>GL50803_3470_ABC_transporter
>EHI_178050_ATP-binding_cass
ESVLSLIFTVISTLVMLVVGMYIDL VMPKRKG-IPNHWLFLLFPVIVYA
DFQNIYALAMFTEPLIVNVSTIVIVAITITKASIYLVILVIVVIFVA
: . : : : : : * . : : . * . * * : : : *

```

```

>GL50803_3470_ABC_transporte      DKIR--RKYTKHLTTRVILKSVIWAIFHPDLMCR---KVSNEPGLLQSSS
>EHI_178050_ATP-binding_cass      FYIFTSKPVIEIQRLGVSRSPIFVHFDQTLMGLSTIRVSNQGNEFKTKL
      *  :  :  .  :  :  *  :  .  *  .  **  :  ***  .  :  :  .

>GL50803_3470_ABC_transporte      MSWKG---AQSPCELSKLTQNYMDQNCTDASTLDLPHDCSADGDERYF
>EHI_178050_ATP-binding_cass      IDKIKNNTMAFYTCMAKLLWYLQRMWIGAFIIVITTTVICITKINKGMD
      :  .  *  .  *  :  :  :  :  **  :  **  :  .  :  .  *  :  .  :  :

>GL50803_3470_ABC_transporte      DIDTGKHIGGLKRP-----VDSQVIQEHIACEGFSQYNKERVPLIR
>EHI_178050_ATP-binding_cass      PSTAGTALTNLNIPSTITTLGLAILEIETIMQSTERIFQLNKVRNEESE
      :  *  .  :  *  .  .  :  :  :  :  *  :  :  :  *  :  *  *  *  .

>GL50803_3470_ABC_transporte      AIDLTKTYPATRLSPE-----KHAVRGVSFTVAEGECLG
>EHI_178050_ATP-binding_cass      RVKENYEQPPDEWPSKGEVKFKDYKFRYRRGLPLVLKGINASIEDKEKIG
      :  .  .  *  .  .  .  :  :  :  :  :  :  :  :  :  *  :  :  :  *  *

>GL50803_3470_ABC_transporte      LLGPNGAAKTTTINILTMLHRATTGEAYINGLDLTDPOMKASIQNITGIC
>EHI_178050_ATP-binding_cass      VVGRITGSGKSTLMAGLFRIEEPAGGKILVDGIDITKVPLHILRNRMCILP
      :  :  *  .  *  .  *  *  :  *  :  :  :  :  *  :  :  *  :  *  .  :  :  :  :

>GL50803_3470_ABC_transporte      PQFDIQYPTLTCRQHLNYFCRLKRIHRSQEKQHVSDLLKAVGLAEKANTP
>EHI_178050_ATP-binding_cass      -----QEATMFGTVRDNLDPKQTSDEEMKRVLLKLVNSVNELDDVLEN
      *  .  *  :  .  :  :  :  *  :  .  :  *  :  .  :  .  .  *  :  .

>GL50803_3470_ABC_transporte      SKSLSGGMRRRLSVAIALTGSPSVLYLDEPSTGLDPESKRQLWNVILRVR
>EHI_178050_ATP-binding_cass      GDNFSLGQRQIICLARALLKKSILIMDEATANIDIQTDKTIQEMVRKNF
      :  :  :  *  *  *  :  :  :  *  **  :  :  :  *  :  :  :  :  :  :  :  :  :

>GL50803_3470_ABC_transporte      SNRAILLTTHAMDEAEALCNRISIMVAGQLKCICTCSYLQQKFGNGYELV
>EHI_178050_ATP-binding_cass      NECTVITVAHRLQSIMDAN-KVVFVDKGLVENDSPSHLIONENTIFNHL
      .  :  :  :  *  *  :  .  :  :  :  *  *  .  :  :  *  *  :  .  :  :  :

>GL50803_3470_ABC_transporte      FTVKNDDFSKNSKIDQTEHLLHGLDSEGNSLPETMAIGELTLNLSREVC
>EHI_178050_ATP-binding_cass      VQSGCADELKR--VAKKTTIFGSMFNRIINLNESTKSSSEGNDELKPELE
      .  .  .  *  .  .  :  :  :  :  *  :  :  :  *  *  *  :  .  *  .  .  .  *  :

>GL50803_3470_ABC_transporte      GHLLVNSYISSSLQLIRVFSGRITYKLPDSIPISQIFMAIDQLIQMKPGV
>EHI_178050_ATP-binding_cass      LNLLNNSNATPVHFEETSD----RNGSERHLLSPVVVASNENDLSSP--
      :  **  *  *  :  :  :  :  .  .  :  :  :  :  *  :  :  *  :  :  .  *

>GL50803_3470_ABC_transporte      ITDWCLSRISLDDVFFKVVLT
>EHI_178050_ATP-binding_cass      -----SESSSSQ-----
      *  :  *  .  :

```

Fig 38. Alineamiento en ClustalW entre la proteína “ABC transporters” de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_3470 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_16575_ABC_transport -----
>EHI_178050_ATP-binding_cass MSLKSIEPKEIELEGEDTSSDDGIFETDDVVKYDKSPNSVVKFFRRLF

>GL50803_16575_ABC_transport -----MVLGEDSPLAK-----SRRNR
>EHI_178050_ATP-binding_cass RTSMPQLLKGKGNLRVSDLCPIPKTLILEGYEAE LKENWEKEALS KHP S
                               :: * :: * :      * ::

>GL50803_16575_ABC_transport QMLGVFLKNTLFCAS-----F
>EHI_178050_ATP-binding_cass LFLTI FKKEWYHFLFSYILVSIYELFSLAFPLECQYIVKWLKNKPPTYM
                               :* : * * : * * * :
                               :

>GL50803_16575_ABC_transport GGFSLV LVLTFVLM LCIILLHRYLNSVSTASLKYDVT-----
>EHI_178050_ATP-binding_cass AAVFICLAI VQLIVCF SQEFGKKWIFVSALRIRNGLTGLIYDKALKLNA
                               ... : * . : * * : * : .      * : : : *

>GL50803_16575_ABC_transport -----GGPSGDSSNDSNIVVGNWISNPYPSLAPTNI FN IHYLSHF DLGS
>EHI_178050_ATP-binding_cass SGIEEPGR L VNLMANDASVFI GNIEYAVFGLASPVMFIVL FVL IYIYMGK
                               * . : * : . : * * : : * . : : . * : : * .

>GL50803_16575_ABC_transport LLYS-----NTLGQSKGYLS-----
>EHI_178050_ATP-binding_cass WVYIPLIVFVVFNI INFGFGLSGFLY NK FVHVKDKRV SFMGEILHN IKF
                               : *      * : . . * : * *

>GL50803_16575_ABC_transport ----ALEKPFNDISLGLALRTEYGTTSVIRTPAHELVS DSTQNYLALKA
>EHI_178050_ATP-binding_cass IKYNNWEKPKMKRIWLR IEEIWLILVGFVRSSFYITIEIGAILSLSM
                               * * : * : * : * . . . . : : . * : * .

>GL50803_16575_ABC_transport KVPYYTNFTSYDN-----YLYMNF TGP GVEYSKAPDNI TAAGVSNEDK
>EHI_178050_ATP-binding_cass FVTW LSEALQLANVIT TISL FNSIR IPIRTIGMAATC ISSIN VSLGRI
                               * . . : .      * : : * . * . * : : * *

>GL50803_16575_ABC_transport LFYHAKRTSELYRDAVSNTSNPIYYNDG-----IVGIKVNE
>EHI_178050_ATP-binding_cass KRFL LKPELQPIQVVK ESENAIEMNDVNYIFPDGETAFACDELKIKKGE
                               : * : : : . . . : * * * *      : * * *

>GL50803_16575_ABC_transport IPSFGIRFGQAVSPSPIRIARESDGVLSIDYSYDTFFYSKMQAYYIDQT
>EHI_178050_ATP-binding_cass LVCVLG SVGSGKSSFL LALLNELE -KKKGE SYLNGK I TYS SQAHLMMAT
                               : . . * . . * . : : * : . . . * . . . : * * . * : : *

>GL50803_16575_ABC_transport DMRLL EIQVLHFH-----LCLRNMVNQIYG-----VSTS
>EHI_178050_ATP-binding_cass VRENICFL APY NKEKYKQAIKDACTSDIDNLVGGDQYVIAEKGSNLSSGG
                               : : : : : .      * * . : : : *      : * .

>GL50803_16575_ABC_transport ATGSVEVDGPL IIGKNAPFWR-----STGDFLGPDGMTPLLLG----
>EHI_178050_ATP-binding_cass QRR IALARS L YNSQD IMLLDDPLSAVDFHVGTYIFENAIKKS LGGKTRI
                               : : : * . : : :      * : : : : . . *

>GL50803_16575_ABC_transport LVIPLLMFIVSPLMIFALVEEKSSGMVHLHSMG-----QRYTNRW
>EHI_178050_ATP-binding_cass IVTNQTYFIEKADRIIVIDONK LAFNGSLEELKNS SLEASQFIKTLSSKK
                               : *      * * . . * : : : * :      * . . . .      : : :

>GL50803_16575_ABC_transport LADFTYNFILSFCVAVLLVIMCYAGDLNGIR MWNTFAAWLPMFLLFS--AN
>EHI_178050_ATP-binding_cass SENNEENGEVISGD SYNTKTREEGKELGRV SFKVYWEYIKAGLVFLGAAC
                               : * : : :      * : . : : : : : : : * * *

>GL50803_16575_ABC_transport VAIFSAFIAAFFESGRI AALLAVVIA--FGYAVGGFLGTANFASTTIIDR
>EHI_178050_ATP-binding_cass IVFLSARIVALYFYNTFLT KWGRSIRPKLGLPQGNREEFNKFCYTFIADF
                               : : : * * * : : . : : . * : * . * .      : * . * * *

>GL50803_16575_ABC_transport SISPW FALIPFFGPI SVHSQ LQSLAILQ TDSL YLHITDLR-----FYVVD
>EHI_178050_ATP-binding_cass VGVYLTEIF IIFFCITSSHN IHKMVKKVMNAKLGFFDITPIGRILNCF S
                               : : * * : : : . : : . * : * :      : : :

>GL50803_16575_ABC_transport SLLSRAYVQGSVSI LILSVISTVLMALLSMYIDL VMPKKTGIPNHWLF
>EHI_178050_ATP-binding_cass RDFQNI DIALAMFTEPLIVNVSTIVIVAITITKASYLV LVLVIVVIFV
                               : . . . : : . : : * * : : . : : : : : * .

```



```

>GL50803_16575_ABC_transport      LLPVVKVDKLRGRRTKHITTSICKAVTWALVHPDRMCCSQRRN----T
>EHI_178050_ATP-binding_cass     AFYIFTSKPVIEIQRLEGVSRSPIFVHFDQTLMGLSTIRVSNGQNEFKTK
      : :...  : : * : : : ..* . : * : : : * : : * .

>GL50803_16575_ABC_transport      HISLMDSTDFKPYIPESER----SKEEHVPGHLLSTAVDPLSPNGGRFES
>EHI_178050_ATP-binding_cass     LIDKIKNNTMAFYTKMAKLWYLRMDWIGAFIIVITTTVICITKINKGM
      * . :... : * : : : : : : : : : : : : : .

>GL50803_16575_ABC_transport      STQVTSNAMS-IDHLKTIKSTTHIDCISESDVSAESKRAKCATKGFNERP
>EHI_178050_ATP-binding_cass     DPSTAGTALTNLNIPSTITTLGLAILEIETIMQSTERIFQLNKVRNEES
      .....* : : : : : * : : : . . . : : * . * **..

>GL50803_16575_ABC_transport      VLIRAIIDLTL-----KTYPATRLSPEKHAVRGVSFTVAEGECL
>EHI_178050_ATP-binding_cass     ERVKENYEQPPDEWPSKGEVKFDYKFRYRRGLPLVLKGINASIEDKEKI
      : : : : : * * : : : : : : : : * :

>GL50803_16575_ABC_transport      GLLGPNGAAKTTTINILTMLHRATTGEAYVLDKSLVDPYNKAYIQSVTGI
>EHI_178050_ATP-binding_cass     GVVGRTGSGKSTLMAGLFRIEEPAGGKILVDGIDITKVP-LHILRNRMCI
      * : * . * : * * : * : : : : * : * . :... : : . *

>GL50803_16575_ABC_transport      CPQFDILYPTLTCRQHLKYSCRLKNIAKEDEKTHIDELLESVGLVEKANS
>EHI_178050_ATP-binding_cass     LPQEATMFSG-TVRDNLDP---TKQTSDEEMKRVLKLVNSVNELDOVVLE
      ** : : . * * : * . * : : * * * : : . * : . .

>GL50803_16575_ABC_transport      KVKSLSGGQKRRLSVAIALTGSPSVLYLDEPSTGLDPVSKRLLWNIILRI
>EHI_178050_ATP-binding_cass     NGDNFSLGQRQIICLARALLKKSILIMDEATANIDIQTOKTIQEMVRKN
      : .. : * ** : : : * ** ... : * ** : : : * : : : : :

>GL50803_16575_ABC_transport      RSHRAILLTTHAMDEAQALCNRIAIMDRGLLKCIGKCTYLQERYGGALQI
>EHI_178050_ATP-binding_cass     FNECTVITVAHRLQSIMDAN-KVFVFDKGELVENDSPSHLIDNENTIFNH
      .. : : : * : : . : : : * * * .. : : * : . . : :

>GL50803_16575_ABC_transport      MVEVTHDSKPGSGVTVNGVSLNYELEEMGHKLMEETFGSSVLLRNNVVAGT
>EHI_178050_ATP-binding_cass     LVQQSGCADELKRVAKKTTI-FGSNFNRNILNESTKSSEGNDELKPELE
      : * : : . . * : : : : : : : : * * * . * . :

>GL50803_16575_ABC_transport      LTYDVSDKLTAPHAFIEMAKLARTQKKVICDWSLLQASLDRVFFNVILSS
>EHI_178050_ATP-binding_cass     LNLNNSNNATPVHFEETSDRNGSERHLLSPVVASNENDLSSPSESSSS
      * . . : : * * * : . : : : : . . . * . . **

>GL50803_16575_ABC_transport      -
>EHI_178050_ATP-binding_cass     Q

```

Fig 39. Alineamiento en ClustalW entre la proteína “ABC transporters” de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_16575 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

```

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      MKTTLFDP----LPGQDLFRHOGHSGSCGLYSDQNKSFSSASKVFSEVIG
>EHI_178050_ATP-binding_cass      MSLKSIEPKIEIELEGEDTSSDDGIFETDDVVKYDKSPNSVVKFFRTLFF
                                     * . . ::* * *:* * . . . :** .*. *.* :
                                     :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      NGSFAASSVHKD---VRELHDSAYFGVDDMGMPVESHVKTVPAGSS-
>EHI_178050_ATP-binding_cass      RTSMPQLLKGRKGNLRVSDLCPIPKTLILEGYEAELENKEALSKHPS
                                     . *:. . . *:* . : :. . * . * . : .
                                     :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      -----SLQPDGAVILPIKKPRVSFSRRKRGPKPHK
>EHI_178050_ATP-binding_cass      LFLTIFKKEWYHFLFSYILVSIYELFSLAFPLECQYIVKWLNKENPPTYM
                                     *: . : :*: : . *..* .:
                                     :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      DAASSAVELSDQVNLQIRVDNWRTLFSRQIKV-----
>EHI_178050_ATP-binding_cass      AAVFICLAIVFQLIVCFSEQFGKKWIFVSALRIRNGLTGLIYDKALKLNA
                                     * . . : : : : : . : : * : : :
                                     :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      -----LLIKNIVLIR-----HPILLALLLIP-----
>EHI_178050_ATP-binding_cass      SGIEEPGRLVNLMANDASVFIENIEYAVFGLASPVMFIVLFLVIYIYMGK
                                     * : : *:* * : : : * : :
                                     :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      -----PLSVFIITGPSYQVKVPTVWHDVVDIG-----
>EHI_178050_ATP-binding_cass      WVYIPLIVFVFNIIINFGGFLSGFLYNKFWVHKDKRVSFMGEILHNIK
                                     : ** * . . . : : . * :
                                     :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      -----QFDMTKRLAYYPLADPTMAAFVKYLKEAFDPPLDDQVIGFENE
>EHI_178050_ATP-binding_cass      IKYNNWEKPMKKRIWLRITIEEILVGVFVRSSFYITITIEIGAILSLSM
                                     : * .** : : : : * : : : * . : : . * .
                                     :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      LACALNVSAEPDKYHASFTFELRN----PKVDNISLFYVWRVSDYFKKV
>EHI_178050_ATP-binding_cass      FVTMVLSEAEQLANVITISLFNISIRIPRTIGMAATCISSINVSLGRI
                                     : . : .** : : . *:* * . . : : : : :
                                     :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      YADPLDPSYFDPYRAQRLTEHAITRYLLENIFISKIEGFTSDDLKY----
>EHI_178050_ATP-binding_cass      KRFLKPELQPIQVVKESENAIEMNDVNYIFPDGETAFACDELKIKKGE
                                     *.* . . : : *:* : : ** . *:*:*
                                     :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      -----ATAIKNGRVRYDND----MSIQW
>EHI_178050_ATP-binding_cass      LVCVLGSGVSGKSSFLALLNELEKKGESYLNKITYSSQSAWLMNATV
                                     . : ** : : * . :
                                     :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      LPDLEYTDDDFSNKISTLAAPILGTSTVLFYVFMYLVAEKETKLRQS
>EHI_178050_ATP-binding_cass      RENICFLAPYNKEKYKQAIKDACLTSDIDNLVGGDQYVIAEKGSNLSGGQ
                                     : : : : : : : : * . * . * : : . .
                                     :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      LHTIGMLDSAYWLSNIVIG-----VALSALLSVLVNVA-----L
>EHI_178050_ATP-binding_cass      RQRIALARSLYNSQDIMLLDDPLSAVDFHVGTYIFENAIAKSLGGKTRII
                                     : * : * * .*: : * . : . : : * : :
                                     :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      LSKATYWINSPWIINFVIIWLLYFG-----AVSFSFVMAS---
>EHI_178050_ATP-binding_cass      VTNQTYFIEKADRIIVIDDNKLAFNGSLEELKNSSLEASQFIKTLSSKKS
                                     : : *:*:*.. * . : * * . * . * . : : *
                                     :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      --LLHHAQAVGFTAFLMVIVLAGLGLMTSTHRVMYPENGG---FSGFWL
>EHI_178050_ATP-binding_cass      ENNEENGEVIGDSYNTKTREEGKELGRVSFKVYWEYIKAGLVFLGAACI
                                     . : . : . : : * * : : * : . : . :
                                     :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      FFPTHAFQAMFLISLKTVPFALNNMPSVPL-----KFTLRDVAKFT
>EHI_178050_ATP-binding_cass      VFLSARIVALYFYNTFLTKWGRSIRPKLGLPQGNREEFNKFCYTFIADFV
                                     .* : : * : : . . : . * : * ** : * . *
                                     :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      G-----ACVSAST--ASVQMDKVAETGGFY-----CGPE
>EHI_178050_ATP-binding_cass      GVYLTEIFIIFFCITSSHNIHKMKVMNAKLGFFDITPIGRILNCFSR
                                     * * : : * . : : ** : . ** : * .
                                     :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      AYDCGHTVLFAILMQLAICVAQCFLAAYIDLILPAAHGASMHLWAPFTLN
>EHI_178050_ATP-binding_cass      DFQNIIDYALAMFTEPLIVNVSTIVIVAITITKASIYLVILVLVIVIFVA
                                     : : . * : * : * : . : * . : : : :
                                     :

```



```

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      FWGFIRTPPPDSSHKPGYRRPQPLEGWDKDVLKQYKYVLSPPGTAEYNKV
>EHI_178050_ATP-binding_cass     FYIFTSKPVIEIQRLEGVSRSPIFVHFQDTLMGLSTIRVSN-GQNEFKTK
* : * . * . : : * * . : : : : : . : * * * * : :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      RTSSILYDLNVTYSKFCGIKWLPKHAVKNLSLSIPR-----NTIYGLL
>EHI_178050_ATP-binding_cass     LIDKIKNNTMAFYTCMAKWLWYLRMDWIGAFIIVITTTVICITKINKGM
..* . : . . * : : : * . : : : : * . : : : : * . : :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      GPNGAGKSTTLSVLTGTLKPTSGYVTIEGYSIVHQKQKVSQIIGYAP---
>EHI_178050_ATP-binding_cass     DPSTAGTALNLTNIPSTITTLGLAILEIETIMQSTERIFQLNKVRNEES
.* ** : * . : . * * . : * : * : : : : : : : * *

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      -----QFDILWPDLTPAEHIKFFCNMR-----
>EHI_178050_ATP-binding_cass     ERVKENYEQPPDEWPSKGEVKFKDYKFRYRRGLPLVLKGINASIEDKEKI
* * * . : . : : . *

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      -----GVNYAEDLEELQRAREIVSKAGLVSSLERGK-----
>EHI_178050_ATP-binding_cass     GVVGRGTSGSKSTLMAGLFRIEEPAGGKILVDGIDITKVLHILRNRCIL
* . : : * * * . : : * * : : *

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      -----VALETKKKNHKKWKPGEKELIFERLIDVSLQESANFPS-RSL
>EHI_178050_ATP-binding_cass     PQEATMFSGTVRDNLDPKQTSDEEMKRVLKLNVSNLEDDVVLENGDNF
: : . : * : . * : : : : * . : : . : . :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      SGGMKRRRLIALACVGNPRVIFMDEPTSGLDPISRRKVWDAIQKYKLNRL
>EHI_178050_ATP-binding_cass     SLGQRQIICLARALLKSKILIMDEATANIDIQTDKTIQEMVRKN-FNEC
* * : : : * * : : : : : * * : : * : : : : * * : *

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      IILTSHCMEETDVLSDRIGIIAKGVLRCSNSSHLKKKYGTGYRLDMDVD
>EHI_178050_ATP-binding_cass     TVITVAHRLQSMDANKVVFVFDKGLVENDSPSHLIDNENTIFNHLVQQS
: * : : : : : : * * * . . . * * : . * . : : .

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      -----EGDVLVRDELINTYYPQAVLVGKAGGHLTLAVPKTSDSQAMCTF
>EHI_178050_ATP-binding_cass     GCADELKRVAKKKTTIFGSNFRNRI LN--ESTKSSEGNDLKP E L N L L
* : : : : : : * . : : . : . : :

>GL50803_8227_ATP-binding_ca      LQKIEGSAFIREWSIRQTTLEEVFLSIARVAERMDSVAGRS-----
>EHI_178050_ATP-binding_cass     NNSNNATPVHFEETSDRNGSERHLLSPVVASNENDLSSPSESSSSQ
. : . : . * : : . * : * * . * * . : : : . *

```

Fig 40. Alineamiento en ClustalW entre la proteína “ABC transporters” de *E. histolytica* y la secuencia GL50803_8227 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

C. Estructuras tallo-burbuja en el ARNm de genes que codifican proteínas que participan en el metabolismo del parásito

En protozoarios evolutivamente cercanos como *T. vaginalis* y *E. histolytica*, nuestro grupo ha reportado evidencia del mecanismo IRE/IRP (Soto-Castro y col, 2017; León-Sicairos y col, 2017 *en revisión*; Calla-Choque y col, 2014; Torres-Romero y Arroyo, 2009; Solano-González y col, 2007) por lo tanto para buscar los elementos de respuesta al hierro (IRE) que participan en este mecanismo de regulación partimos de un análisis bioinformático sobre el genoma de *G. duodenalis*. Por lo tanto, se determinó la presencia de elementos en cis (estructuras tallo-burbuja tipo IRE) de algunos ARNm de ortólogos que participan en el metabolismo del hierro. Para ello, se obtuvieron las secuencias y se delimitaron las regiones no traducidas de ambos extremos (5' y 3'-UTR) de acuerdo a la presencia de los elementos reportados para cada región (Tolba y col, 2013).

Por lo tanto, analizamos dieciseis ARNm (Cuadro 6), en los cuales se encontraron veintinueve estructuras tallo-burbuja debido a que en trece ARNm se encontraron estructuras en ambos extremos. De las veintinueve estructuras tallo-burbuja (Figura 41), nueve presentaron el motivo GUU/UUG el cual es específico para estructuras tipo IRE de protozoarios (Torres-Romero y Arroyo, 2009); siete estructuras presentaron el motivo GUU/UUG en la burbuja las cuales están anotadas como: "Dipeptidyl peptidase III" (GL50803_3822), "Cysteine protease" (GL50803_113656), "Cysteine protease" (GL50803_112831), "Cysteine protease" (GL50803_114915), "Cysteine protease" (GL50803_114773), "Glucosamine 6 phosphate deaminase" (GL50803_10829), "Pyruvate flavodoxin oxireductase" (GL50803_114609), y dos estructuras presentaron este motivo en el tallo las cuales están anotadas como: "VSP-150" (GL50803_135831) y "Thioredoxin reductase" (GL50803_9827). La estructura tallo-burbuja de la secuencia anotada como "Proprotein convertase subtilisin kexin type 5 precursor" (GL50803_114625) presentó la secuencia GCCACA en el tallo similar a la secuencia GGCACA encontrada en la cisteín proteinasa 4 (*tvcp4*) en la región 5' traducida en *T. vaginalis* (Solano-González y col, 2007), la estructura tallo-burbuja de la "VSP-

150" (GL50803_135831) presentó la secuencia 5'-CAUGAC-3' en el tallo, de igual forma la estructura anotada como "Actin related protein" (GL50803_40817) presentó la secuencia 5'-UGUGAA-3' en la burbuja y la estructura anotada como "Cytochrome B5 outer mitochondrial" (GL50803_9089) presentó la secuencia 5'-CAGUGA-3' en el tallo similares a la secuencia consenso 5'-CAGUGN-3' de humano pero en el sentido contrario las dos primeras estructuras (Hentze y Kuhn, 1996), cuatro estructuras tallo-burbuja presentaron el motivo AUU en la burbuja las cuales están anotadas como: "Dipeptidyl peptidase III" (GL50803_3822), "VSP-5" (GL50803_113797), "VSP-277" (GL50803_14307), "Cytochrome B5 outer mitochondrial" (GL50803_9089) y una estructura presentó el motivo CUU/C en el tallo, anotada como: "Dipeptidyl peptidase III" (GL50803_33689), los cuales pudieran ser específicos para Giardia o una variante del motivo GUU/UUG el cual es específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo, 2009).

Cuadro 6. Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas del metabolismo en *G. duodenalis*

Nombre común	Gene ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5 precursor</i>	GL50803_114625	3'UTR	tacaccaagatgaatggttcTGAcacggccacatgtgtcgacgcgtctggctgtggcgatggata ctatgcggatccagaagagctccagtggtccacatGTGGAAttgagagc[t]gtcaag
<i>Dipeptidyl-peptidase III</i>	GL50803_3822	5'UTR/CR	aggggggaataaa[a]ttccATGctgacctgagaagtatattgcccgcacagatggaccggttct
<i>Dipeptidyl-peptidase III</i>	GL50803_3822	3'UTR	ggaaaTAAatg cgacgttgaagttg attgtaataactgcttagatcacatctattctaggggaG GT AAAgatgg[t]atgg
<i>Dipeptidyl-peptidase III</i>	GL50803_33689	5'CR	tttactgtgaattattcaattt[t]tctaATGcctaacgaatgcccatctggagctttcacggccaacctg
<i>Dipeptidyl-peptidase III</i>	GL50803_33689	3'UTR	catcctgtttcctctgctaacTGActatacagtgctctatattctcgaGCTTAAtcagcaa[c]tgcttgt
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_113656	5'UTR/CR	ctaacctacccgcggcccaa[a]aaaggaccggATGttgctgcttacttctctctgcgcg
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_113656	3'CR/UTR	cctcaacctgaacctccgcacaaagggcgtgTAGcgcctagcgCCCGAActcctcg[t]cgtag
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_112831	5'UTR/CR	aacctacccgcggcccaa[a]aaaggaccggATGttgctgcttacttctctctctgcgcgga
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_112831	3'CR/UTR	tacatcttccacagcccgtcaacctgaacctccgcacaaagggcgtgTAGcgcctagcg CCC GAActccccg[t]cgtaga
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_114915	5'UTR/CR	cggctaacctatccgcggcccaa[a]aaaggatcggATGttgctgcttacttctctctctgcg
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_114915	3'CR/UTR	tacatcttccacagcccgtcaacctgaacctccgcacaaagggcgtgTAGcgcctagcg CCC GAActccccg[t]cgtaga
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_114773	5'UTR/CR	cggctaacctacccgcagcccaa[a]aaaggaccggATGttgctgcttacttctctctctgcg
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_114773	3'CR/UTR	cgcatcgccgagc cctcaacctgaacctccgcacaaagggcgtgTAGcgcctagcgCCCGAActcccc[g]tcgtag aggggtgtagtagatg
<i>Variant-Specific Surface Protein 5 (VSP-5)</i>	GL50803_113797	5'UTR	ccccgggcttgcgttgaagcgcca[c]ccagcaggtcggcggcctaATGttcggcagattttct
<i>Variant-Specific Surface Protein 5 (VSP-5)</i>	GL50803_113797	3'UTR	cgcatcgcatcc tgctggtggttctctgtagggggaagggcTAGatgtacttagatAGTAAAccgtca[t]cgatgg gtctgctcgggtctg

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

Continuación

Nombre común	Gene ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Variant-Specific Surface Protein 150 (VSP-150)</i>	GL50803_135831	5'CR	ctcaagggtact[t]cttatacATGaatggctgttacaaggtt gggtcaagaaccagg tagtcatatgtg
<i>Variant-Specific Surface Protein 150 (VSP-150)</i>	GL50803_135831	3'UTR	ggttcatatgtagaggggaagg caTGActcaggtAGTGA Atgcta[t]acaatgtgtgataatgggt
<i>Variant-Specific Surface Protein 277 (VSP-277)</i>	GL50803_14307	5'UTR/CR	cctgcgacgcatcggtgc[g]gcaac gacggcagcATGctctctactgttca aagtggttggcg
<i>Variant-Specific Surface Protein 277 (VSP-277)</i>	GL50803_14307	3'UTR	cctctgctggtggttcgtgtgtagaggggaaggcg TGActtaggtAGTGA Atgctg[t]gcagtggtgatagtggtgat
<i>Glucosamine-6-phosphate deaminase</i>	GL50803_10829	5'UTR/CR	aaatctctggtaaa[t]aaaagattgattta gcaaaATGactgtgtgttctcaggcggagcgt ggtg cgctcag
<i>Actin related protein</i>	GL50803_40817	3'CR/UTR	aaacc gtaagtgtgTGTGA Acacctatcaa[c]gcctt
<i>Cytochrome B5, outer mitochondrial membrane</i>	GL50803_9089	5'CR	ccaaagtcacaggaatttcaccataa[t]ttaa ATGagtgaa catcatggtcgcccatcggagtggtg
<i>Cytochrome B5, outer mitochondrial membrane</i>	GL50803_9089	3'CR/UTR	aagaggggtcgcc ggccTAAttttttagagct cctgggcgagaa AGTAA Acaatc[a]gactttg
<i>Thioredoxin reductase</i>	GL50803_9827	5'CR	acgagcatt[t]ttaaATGtccactcagcgcacgtcaggatcggaatcatcggcg gaggccctgca ggcctc actgc
<i>Thioredoxin reductase</i>	GL50803_9827	3'CR/UTR	cgccgagcgtg gcttgccatgcaggagTAA GTAAAtggcagcgggcctgtggc[t]ccagtt
<i>Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase</i>	GL50803_114609	5'CR	aggccacaaaat[t]aaaatATGacgaccgcccctgcctctcaggag gcagctgtgcatcgacggc gcgactg cgacgt
<i>Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase</i>	GL50803_114609	3'CR	aaggccatcgacgtgcccacgg accgattgtttcgggTAA aaa AGTGA Aatcatct[c]gcat
<i>Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase</i>	GL50803_17063	5'CR	aaattacaacattttgccccataaa[t]taa ATGtctgtgtccacgcgctatagac ggctgtcac
<i>Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase</i>	GL50803_17063	3'CR	agtacagcgaatgcaggcgc accgccaaggcgg agTAAgc AGTGA Acttca[t]ttcatgtct
<i>Variant-Specific Surface Protein 150 (VSP-150)</i>	GL50803_135831	5'CR	tgtgctcaagggtact[t]cttatacATGaatggctgttacaaggtt gggtcaagaaccagg tagtcatat

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

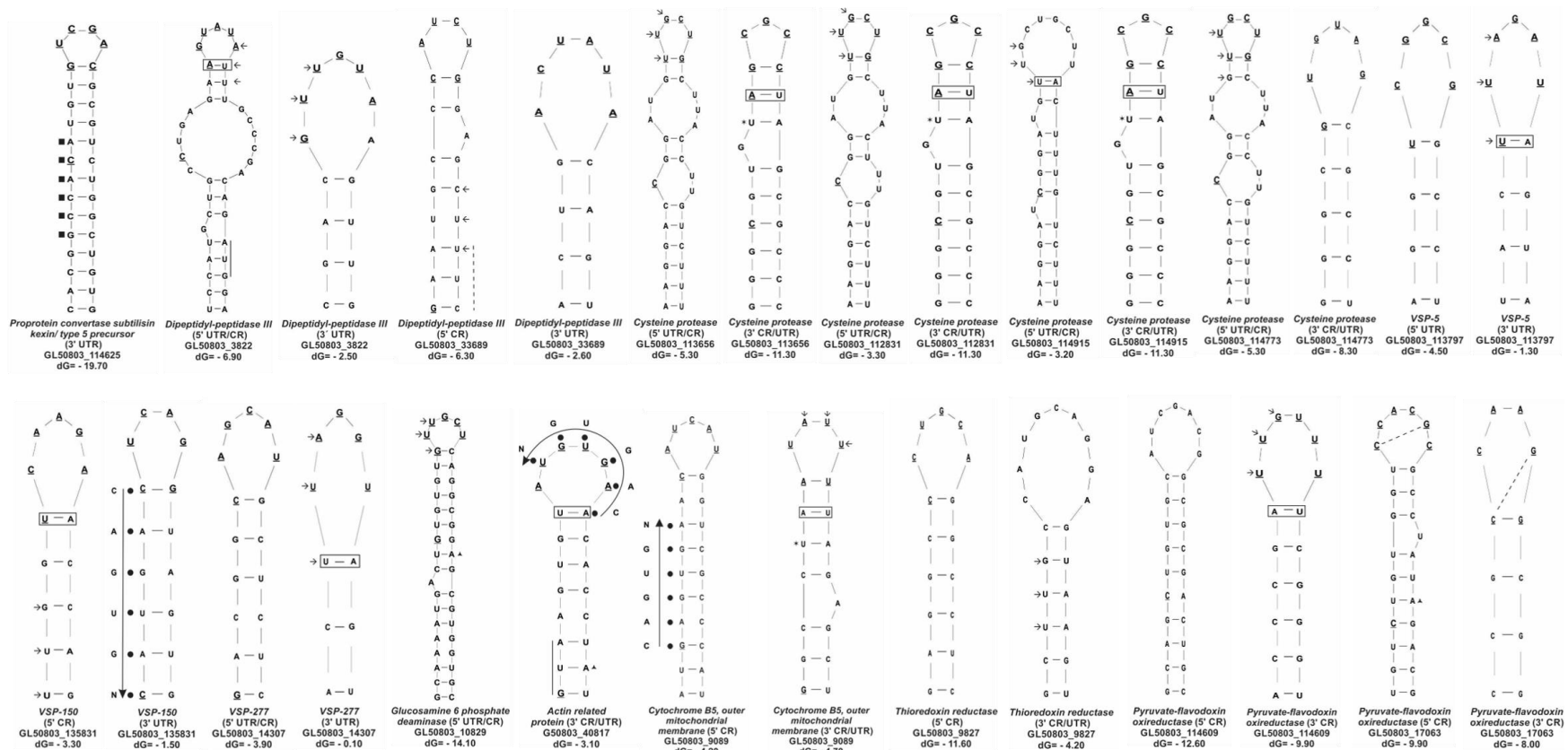


Fig 41. Estructuras tallo-burbuja en ARNm's que codifican posibles proteínas del metabolismo. Con flechas se indica el motivo CUUU/C específico para *G. duodenalis*, el motivo AUU (posible variante del motivo GUU) y el motivo GUU/UUG específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo; 2009). Con cuadros la secuencia GCCACA similar a la secuencia GGCACA encontrada en la *tvcp4* en *T. vaginalis* (Solano-González y col, 2007). Con círculos la secuencia similar a la secuencia consenso 5'-CAGUGN-3' de humano (Hentze y Kuhn, 1996).

D Expresión diferencial por hierro de ARNm de *G. duodenalis* con estructuras IRE-like en sus extremos UTR.

Para llevar a cabo los análisis de RT-PCR tomamos como modelo de estudio dos ARNm con estructuras tallo-burbuja, debido a que participan en la formación de la pared celular del quiste (*Actina*), así como en el metabolismo (*Glucosamina-6-fosfato desaminasa*) del parásito protozoario *G. duodenalis* (Knodler y col, 1999). Respecto a la expresión diferencial analizada en diferentes genes de *G. duodenalis* observamos que la *Glucosamina 6 fosfato desaminasa* (Figura 42) se regula positivamente por hierro, la cual posee estructura tipo IRE en el extremo 5' UTR, esto concuerda con lo reportado por Solano-González y col. en el 2007 para el gen de la *Cistein proteasa 4* de *T. vaginalis*. Por su parte, el gen de *Actina*, el cual posee un IRE en su extremo 3' UTR mostró una mayor expresión en los cultivos de *G. duodenalis* crecidos en bajas condiciones de hierro como se esperaba de acuerdo a la localización del IRE (Figura 43), esto concuerda con los resultados de Leon-Sicairos (*en revisión*, 2017) para el gen de la *Cistein proteasa 12* de *T. vaginalis*, la cual muestra una mayor expresión en parásitos cultivados en condiciones de depleción de este catión. Además, nuestros resultados concuerdan con lo reportado para el mecanismo IRE/IRP en eucariontes superiores (Pérez y col, 2005). Por otro lado, describimos el posible modelo de regulación donde se muestra a *Actina* y *Glucosamina 6 fosfato desaminasa* como ejemplos de regulación negativa y positiva por hierro, respectivamente (Figura 44). Probablemente, el hecho de que *G. duodenalis* regule varios genes de acuerdo a las condiciones de hierro represente un mecanismo de regulación tipo IRE/IRP primitivo, en sus primeras etapas de la evolución. Este mecanismo posiblemente lo pudiera utilizar para regular diferentes genes, en este caso, para adaptarse a los cambios de hierro y poder sobrevivir, así como para su patogenicidad. Este mecanismo no solo participa en el metabolismo del hierro, como se sabe hoy para eucariontes superiores, lo cual representa una especialización en este sistema de regulación de la homeostasis del hierro. Nuestros resultados sugieren que *G. duodenalis* el cual es

evolutivamente cercano a *T. vaginalis* y *E. histolytica*, puede presentar también un mecanismo de regulación por hierro tipo IRE/IRP.

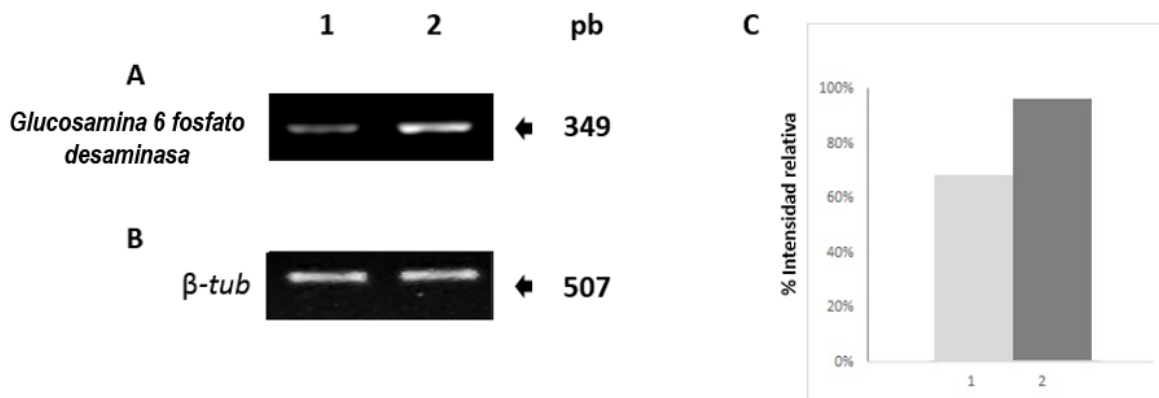


Fig 42. Efecto del hierro en la expresión del gen *Glucosamina 6 fosfato desaminasa* de *G. duodenalis*: A) RT-PCR con oligonucleótidos específicos para el gen *Glucosamina 6 fosfato desaminasa* de *G. duodenalis* usando ARNm de los parásitos cultivados en bajo (1) y alto hierro (2), para obtener un producto de 349 pb. B) RT-PCR de control de calidad con oligonucleótidos específicos para el gen de β -*tubulina*, para obtener un producto de 507 pb. C) Análisis densitométrico de los productos RT-PCR realizado con el programa Quantity one normalizando con la intensidad de pixeles de cada amplicón con respecto a β -*tubulina*.

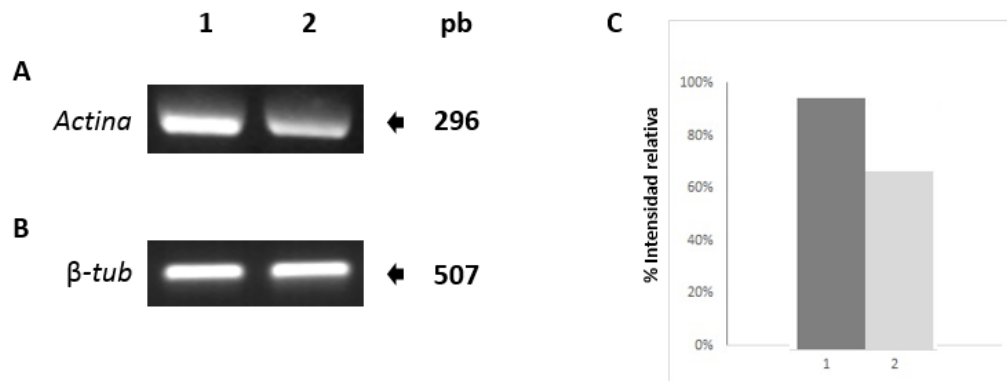


Fig 43. Efecto del hierro en la expresión del gen *Actina* de *G. duodenalis*: A) RT-PCR con oligonucleótidos específicos para el gen *Actina* de *G. duodenalis* usando ARNm de los parásitos cultivados en bajo (1) y alto hierro (2), para obtener un producto de 296 pb. B) RT-PCR de control de calidad con oligonucleótidos específicos para el gen β -*tubulina*, para obtener un producto de 507 pb. C) Análisis densitométrico de los productos RT-PCR realizado con el programa Quantity one normalizando con la intensidad de pixeles de cada amplicón con respecto a β -*tubulina*.

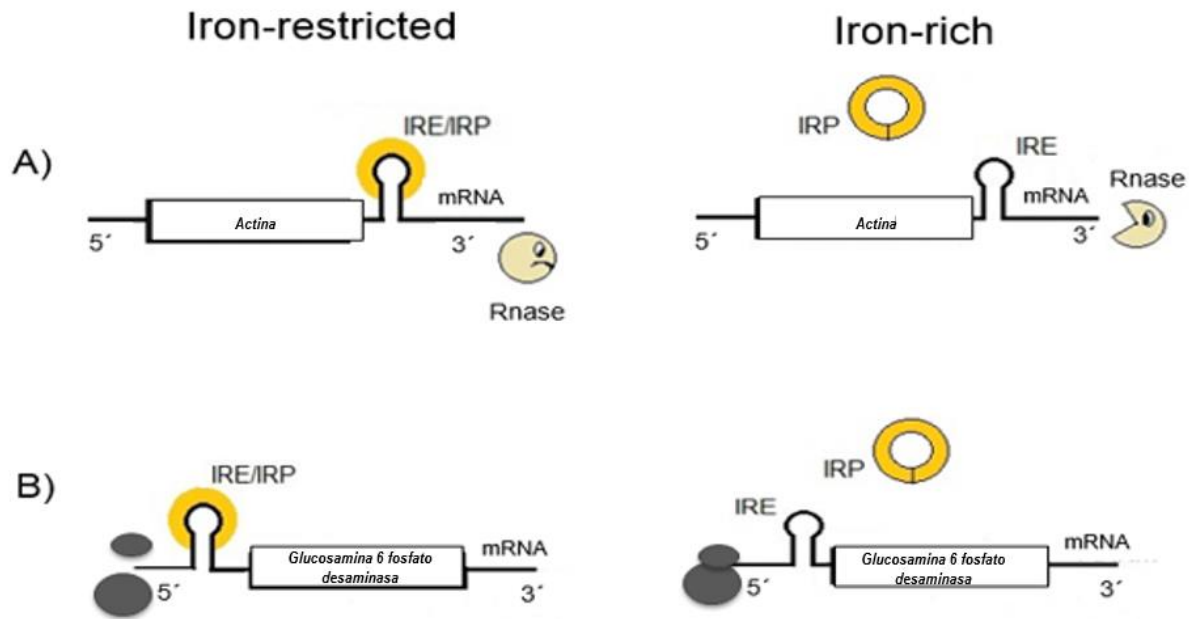


Fig 44. Posible mecanismo de regulación tipo IRE/IRP en *G. duodenalis*: A) Regulación postranscripcional por hierro de *Actina*, la cual posee un IRE en su extremo 3' UTR. En bajas concentraciones de hierro la conformación que adopta la IRP permite unirse al IRE del transcrito de *Actina* estabilizándolo y permitiendo su traducción. En altas concentraciones de hierro la conformación que adopta la IRP no le permite unirse al IRE del ARNm, exponiéndolo a la acción de RNAasas degrandando el ARNm. B) Regulación postranscripcional por hierro de *Glucosamina 6 fosfato desaminasa*, la cual posee un IRE en su extremo 5' UTR. En bajas concentraciones la conformación que adopta la IRP le permite acoplarse al IRE del transcrito impidiendo en ensamblaje de la maquinaria ribosomal y consecuentemente bloqueando su traducción. En altas concentraciones de hierro la IRP no puede acoplarse al IRE del transcrito, permitiendo que el transcrito se una al ribosoma y lo traduzca.

IX CONCLUSIONES

El efecto del hierro en el crecimiento del parásito, las secuencias aminoacídicas de proteínas que participan en la adquisición y metabolismo del hierro obtenidas del proteoma de *G. duodenalis*, las estructuras tallo-burbuja encontradas en ARNm de este parásito, así como la modulación por hierro que concuerda con la localización de los IRE de *Glucosamina 6 fosfato desaminasa* y *Actina* apoyan fuertemente la presencia de un mecanismo de regulación postranscripcional por hierro tipo IRE/IRP en este protozoario.

X BIBLIOGRAFIA

- Abul A, Andrew L y Shiv P. (2008). Inmunologia Celular y Molecular. España. ELSEVIER SAUNDERS.
- Adam RD (2001). Biology of *Giardia lamblia*. Clinical Microbiology Review; 14: 447-475.
- Aisen P y Listowsky I. (1980). Iron transport and storage proteins. Annual Review of Biochemistry; (49): 357-93.
- Al-Laham NA, Elyazji MS, Al-Haddad RJ y Ridwan FN. (2015). Possible hematological changes associated with acute gastroenteritis among Kindergarten children in Gaza. Annuals of medical and health sciences research; 5(4): 292-298.
- Al-Mekhlafi MS, Azlin M, NorAini U, Shaik A, Saiah A, Fatmah MS, Ismail MG, Ahmad Firdaus MS, Aisah MY, Rozlida AR y Norhayati M. (2005). Giardiasis as a predictor of childhood malnutrition in Orang Asli children in Malaysia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene; (9): 686-91.
- Ali SA y Hill DR. (2003). *Giardia intestinalis*. Current opinion in infectious diseases; 16 (5): 453-460.
- Álvarez-Sánchez ME, Avila-Gonzales L, Becerril-García C, Fattel-Facenda LV, Ortega-López J y Arroyo R. (2000). A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. Microbial Pathogenesis; (28): 193-202.
- Bagchi S, Oniku A, Topping K, Mamhoud ZN y Page TA. (2012). Programmed cell death in *G. duodenalis*. Parasitology; 139(7): 894-903.
- Bartelt LA, Roche J, Kolling G, Bolick D, Noronha F, Naylor C, Hoffman P, Warren C, Singer S y Guerrant R. (2013). Persisten *Giardia lamblia* impairs growth in a murine malnutrition model. Journal of Clinical Investigation; 123(6): 2672-84.
- Bartelt LA y Sartor RB. (2015). Advances in understanding *G. duodenalis*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. F1000Primer Reports; 7(62): 1-14.

- Beaver PC, Jung RC y Cupp EW. (1984). *Clinical Parasitology*. Seattle, USA. Philadelphia: Lea and Febiger.
- Brazzalotto X, Timmins P, Dupont Y y Moulis JM. (2002). Structural changes associated with switching activities of the human iron regulatory protein 1. *The Journal of Biological Chemistry*; (277): 11995-12000.
- Buret AG, Mitchell K, Muench DG y Scott KG. (2002). *Giardia lamblia* disrupt tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology*; 125(Pt 1): 11-9.
- Buret AG. (2007). Mechanism of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut*; 56(3): 316-7.
- Calla-Choque JS, Figueroa-Angulo EE, Ávila-González L y Arroyo R. 2014. α -Actinin TvACTN3 of *Trichomonas vaginalis* is an RNA-binding protein that could participate in its posttranscriptional iron regulatory mechanism. *Biomed Research International*; volume 2014: 1-20.
- Carpenter ML, Assaf ZJ, Gourguechon S y Cande WZ. (2012). Nuclear inheritance and genetic exchange without meiosis in the binucleate parasite *G. intestinalis*. *Journal of Cell Science*; 125(10): 2523-32.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2017). Parasites-Giardia. 30 de mayo del 2017. Disponible en web: www.cdc.gov/parasites/giardia/biology.html.
- Cecilia HC, Guadalupe AAM y Graciela CE. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*; 31(4): 137.
- Chávez B, Knaippe F, Gonzales-Mariscal L y Martínez-Palomo A. (1986). *Giardia lamblia*: electrophysiology and ultrastructure of cytopathology in cultured epithelial cells. *Experimental parasitology*; (3); 379-89.
- Chen N, Upcroft JA y Upcroft P. (1995). A *Giardia duodenalis* gene encoding a protein with multiple repeats of a toxin homologue. *Parasitology*; 111(94): 423-431.

- Choy SH, Mahdy MA, Al-Mekhlafi HM, Low VL y Surin J. (2015). Population expansion and gene flow in *Giardia duodenalis* as revealed by triosephosphate isomerase gene. *Parasites and vectors*; 8(1): 1-10.
- Crossley R y Holberton DV. (1983). Characterization of proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Journal of Cell Science*; (59): 81-103.
- Cruz-Castañeda A y Olivares-Trejo JJ. (2008). Ehhmbp45 is a novel hemoglobin-binding protein identified in *Entamoeba histolytica*. *FEBS Letters*; 582(18): 2806-10.
- Cruz-Castañeda A, Hernández-Sánchez J y Olivares-Trejo JJ. (2009). Cloning and identification of a gene coding for a 26-kDa hemoglobin-binding protein from *Entamoeba histolytica*. *Biochimie*; 91(3): 383-389.
- Cruz-Castañeda A, López-Casamichana M y Olivares-Trejo JJ. (2011). *Entamoeba histolytica* secretes two haem-binding proteins to scavenge haem. *Biochemical Journal*; 434(1): 105-111.
- Cotton JA, Beatty JK y Buret AG. (2011). Host parasite interactions and pathophysiology in *G. duodenalis* infections. *International Journal for Parasitology*; 41(9): 925-33.
- Cox FEG. (2002). History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Review*; 15: 595-612.
- Del Castillo-Rueda A y Khosravi-Shahi P. (2010). Papel del hierro en la interacción entre el huésped y el patógeno. *Medicina clínica*; 134(10): 452-456.
- Díaz E, Mondragon J, Ramirez E y Bernal R. (2003). Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in México. *The American journal of tropical medicine and hygiene*; 68(4): 384-385.
- Dolezal P, Smíd O, Rada P, Zubáková Z, Bursac D, Suták R y Tachezy J. (2005). *G. duodenalis* mitochondria and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 102(31): 10924-10929.

- Elmendorf H, Singer S, Pierce J, Cowan J y Nash T. (2000). Initiator and upstream elements in the alfa2-tubulin promoter of *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*; (113): 157-169.
- Franzén O, Jerlstrom-Hultqvist J, Einarsson E, Ankarklev J, Ferella M, Andersson B y Svard SG. (2013). Transcriptome profiling of *Giardia intestinalis* using strand-specific RNA-seq. *PLOS Computational Biology*; 9: e1003000.
- Gardner TB y Hill DR. (2001). Treatment of giardiasis. *Clinical microbiology reviews*; 14(1): 114-128.
- Garza-Padrón RA, Verde-star MJ, Morales-Rubio ME, Oranday-Cárdenas A, Rivas-Morales C, Núñez-González MA y Barrón-González MP. (2010). Actividad amebidida, antioxidantes y perfil fitoquímico de extractos metanólicos de *Astrophytum myriostigma* obtenidos de cultivo de callo y del cactus silvestre. *Polibotánica*; (30):111-121.
- Gascón J. (2006). Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. *Digestion*; Vol 73 Suppl 1:120-8.
- Gegout V, Schlegl J, Schlanger B, Hentze MW, Reinbolt J, Ehresmann B, Ehresmann C y Romby P. (1999). Ligand-induced structural alterations in human iron regulatory protein-1 revealed by protein footprinting. *The journal Biological Chemistry*; (274): 15052-15058.
- Gillon J. (1984). Giardiasis: review of epidemiology, pathogenetic mechanisms and host responses. *QJM: International Journal of Medicine*; 53(209): 29-39.
- Goforth JB, Anderson SA, Nizzi CP y Eisenstein RS. (2010). Multiple determinants within iron-responsive elements dictate iron regulatory protein binding and regulatory hierarchy. *RNA Journal*; 16(1): 152-69.
- Good MF, Powell LW y Halliday JW. (1988). Iron status and cellular immune competence. *Blood Reviews*; (1): 43-9.
- Goyal N, Rishi P y Shukla G. 2013. *Lactobacillus rhamnosus* GG antagonizes *Giardia intestinalis* induced oxidative stress y intestinal disaccharidases: an

experimental study. World Journal of Microbiology and Biotechnology; 29(6): 1049-57.

Gou B, Phillips JD, Yu Y y Leibold EA. (1995). Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. The Journal Biological Chemistry; (270): 21645-21651.

Gou F, Ortega-Pierres G, Argüello-García R, Zhang H y Zhu, G. (2015). *G. duodenalis* fatty acyl-CoA synthetases as potencial drug targets. Frontiers in microbiology; 6: 1-10.

Gutiérrez VER, Álvarez OE, Martínez JCC, Duque S, Arévalo A y Vallejo GA. (2015). Detección de parásito intestinalis en niños preescolares y animales domésticos del municipio de Ibagué (Tolima). Revista Colombiana de Ciencia Animal; 7: 1.

Hail DJ, Rouault TA, Harford JB, Kennedy MC, Blondin GA, Beinert H y Klausner RD. (1992). Cellular iron regulation of the iron-responsive element binding protein: disassembly of the cubane iron-sulfur cluster results in high affinity RNA binding. Proceeding of the National Academy of Sciences; (89): 11735-11739.

Halliday CEW, Clark C y Farthing MJG. (1988). *G. duodenalis* bile salt interactions *in vitro* and *in vivo*. Trasaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene; (82): 428-432.

Halliez MC y Buret AG. (2013). Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. World Journal of Gastroenterology; 19(47): 8974-85.

Hantke K. (2001). Iron and metal regulation in bacteria. Current Opinion in Microbiology; (4): 172-177.

Henderson B y Kuhn L. (1995). Differential modulation of the RNA binding proteins IRP1 and IRP2 in response to iron: IRP2 requires translation of another protein. The Journal Biological Chemistry; (270): 20509-20515.

Hentze M y Juhn L. (1996). Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide and oxidative stress. Proceedings of the National Academy of Sciences; 93: 8175-8182.

- Hentze MW, Muckenthaler MU y Andrews NC. (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *The Journal Cell*; (3):285-97.
- Hernández Y, Castillo C, Roychowdhury S, Hehl A, Aley SB y Das S. (2007). Clathrin-dependent pathways and the cytoskeleton network are involved in ceramide endocytosis by a parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology*; 37(1): 21-32.
- Hernández-Cuevas NA, Weber C, Hon CC y Guillen N. (2014). Gene expression profiling in *Entamoeba histolytica* identifies key components in iron uptake and metabolism. *PloS one*; 9(9): e107102.
- Hernández-Gutiérrez R, Avila-Gonzales L, Ortega-López J, Cruz-Talonia F, Gomez-Gutierrez G y Arroyo R. (2004). *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental Parasitology*; (107): 125-135.
- Hernández-Gutiérrez R, Ortega-López J y Arroyo R. (2003). A 39-kDa cysteine proteinase CP39 from *Trichomonas vaginalis*, which is negatively affected by iron may be involved in trichomonal cytotoxicity. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*; (50): 696-698.
- Herrera Amador C. (2015). Efecto del tratamiento con Hierro y Ácido Fólico sobre la concentración de Hemoglobina y los Índices Eritrocitarios Secundarios en niños con Anemia en Cartagena de Indias. Tesis de Maestría en Bioquímica Clínica. Departamento De Ciencias de la Salud. Universidad de San Buenaventura.
- Humen MA, Pérez PF y Moal LL. (2011). Lipid raft-dependent adhesion of *Giardia intestinalis* trophozoites to a cultured human enterocyte-like Caco-2/TC7 cell monolayer leads to cytoskeleton-dependent functional injuries. *Cellular microbiology*; 13(11):1683-1702.
- Iwai K, Klausner R y Rouault T. (1995). Requirements for iron-regulated degradation of the RNA binding proteins, iron regulatory protein 2. *European Molecular Biology Organization*; (21): 5350-5357.

- Jedelsky PL, Dolezal P, Rada P, Pyrih J, Smíd O, Hrdy I, Sedinová M, Marcincikava M, Voleman L, Perry AJ, Beltrán NC, Lithgow T y Tachezy J. (2011). The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. PLoS One; 6 (2): e17285.
- Jex AR, Koehler AV, Ansell BR, Baker L, Karunajeewa H y Gasser RB. (2013). Getting to the guts of the matter: the status and potential of 'omics' research of parasitic protists of the human gastrointestinal system. International journal for parasitology; 43(12): 971-982.
- Kaur H, Ghosh S, Samra H, Vinayak VK y Ganguly NK. (2001). Identification and characterization of an excretory secretory product from *Giardia lamblia*. Parasitology; 123 (Pt4): 347-356.
- Le Blanc S, Garrick MD y Arredondo M. (2012). Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. American Journal of Physiology-Cell Physiology; 302(12): 1780-1785.
- Lee J, Park SK y Yong TS. (2008). Effecto of iron on adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* to CHO cell monolayers. Korean Journal Parasitology; (46): 37-40.
- Lehker M, Arroyo R y Alderete JF. (1991). The regulation by iron the synthesis of adhesions and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. The Journal of Experimental Medicine; 174:311-318.
- Leipuviene R y Theil C. (2007). The family of iron responsive RNA structures regulated by changes in cellular iron and oxygen. Cellular and Molecular life Sciences; (64): 2945-2955.
- León-Sicairos CR, Gutiérrez-Escolano L, Solano-González E, Ortega-López y Arroyo R. (2017) (*en revisión*). The expression of the *Trichomonas vaginalis* TVCP12 cysteine proteinase is regulated by an IRE/IRP-like system.
- Loftus B, Anderson I, Davies R, Alsmark UCM, Samuelson J, Amedeo P y Nozaki T. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. Nature; 433 (7028): 865-868.

- Lovevky M, Mompoin F, Yikilmaz E, Altscgul SF, Madden T, Wootton JC, Kurantsin-Mills J, Kassim OO, Gordeuk VR y Rouault TA. (2003). Expression of a recombinant IRP-like *Plasmodium falciparum* protein that specifically binds putative IREs. *Molecular and Biochemical Parasitology*; (126): 231-38.
- Ludwig H, Evstatiev R, Kornek G, Aapro M, Bauernhofer T, Buxhofer-Ausch V, Fridrik M, Geissler K, Gisslinger H, Koller E, Kopetzky G, Lang A, Rumpold H, Steurer M, Kamali H y Link H. (2015). Iron metabolism and iron supplementation in cancer patients. *Wiener klinische Wochenschrift*; 127: 907–919.
- Luján HD. (2006). *Giardia* y giardiasis. *MEDICINA*; 66: 70-74.
- Malquori L, Carsetti L y Ruberti G. (2008). The 3' UTR of the human CTLA4 mRNA can regulate mRNA stability and translational efficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*; (1): 60-65.
- Mark-Carew MP, Adesiyun AA, Basu A, Georges KA, Pierre T, Tilitz S, Wade SE y Mohammed HO. (2013). Characterization of *Giardia duodenalis* infections in dogs in Trinidad y Tobago. *Veterinary Parasitology*; 196 (1-2):199-202.
- Maya JD. (2014). Capítulo Bioquímica de parásitos. *Parasitología humana*; 50: 1,7,13,50.
- Militello KT, Dodge M, Bethke L y Wirth DF. (2004). Identification of regulatory elements in the *Plasmodium falciparum* genome. *Molecular and Biochemical Parasitology*; 134 (1): 75-88.
- Mireya de la Garza, Sergio Vaca Pacheco y col (2010). *Lucha por el hierro Patógeno Vs hospedero*. México, DF. CINVESTAV.
- Monajemzadeh S y Monajemzadeh M. (2008). Comparison of iron and hematological indices in *Giardia lamblia* before and after treatment in 102 children in Ahwaz, Iran. *Medical Science Monitor*; (1): 19-23.
- Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamaneck NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS,

- Samuelson J, Svard SG y Sogin ML. (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*; 317(5846):1921-6.
- Müller N y Von Allmen N. (2005). Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *International Journal of Parasitology*; 35(13):1339-47.
- Olivares JL, Fernández R, Fleita J, Ruiz MY, Clavel A y Moreno LA. (2004). Iron deficiency in children with *Giardia lamblia* y *Enterobius vermicularis*. *Nutrition Research*; 24: 1-5.
- Ortega YR y Adam RD. (1997). *G. duodenalis*: Overview and Update. *Clinical Infection Disceases*; 25: 545-550.
- Ortega YR y Bonavia D. (2003). *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in ancient Peruvians. *Journal Parasitology*; 89: 635–636.
- Pantopoulos K. (2004). Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences*; (1012): 1-13.
- Pantopoulos K, Weiss G y Hentze MW. (1996). Nitric oxide and oxidative stress (H₂O₂) control mammalian iron metabolism by different pathways. *Molecular and Cellular Biology*; (16): 3781-3788.
- Park SJ, Lee SM, Lee J y Yong TS. (2001). Differential gene expression by iron-limitation in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*; (114): 257-260.
- Peattie DA. (1990). The giardins of *Giardia lamblia*: genes and proteins with promise. *Parasitology Today*; 6(2): 52-6.
- Pegado MG y de Souza W. (1994). Role of surface components in the process of interaction of *Giardia duodenalis* with epithelial cells in vitro. *Parasitology Research*; 80(4): 320-326.
- Pérez G, Vittori D, Pregi N, Garbossa G y Nesse A. (2005). Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*; 39(3): 301-314.

- Pierangeli NB, Giayetto AL, Manacorda AM, Barbieri LM, Soriano SV, Veronesi A y Basualdo JA. (2003). Estacionalidad de parásitos intestinales en suelos periurbanos de la ciudad de Neuquén, Patagonia, Argentina. *Tropical Medicine and International Health*; 8(3): 259-263.
- Piccinelli P y Samuelsson T. (2007). Evolution of the iron-responsive element. *RNA Society*; (13): 952-966.
- Plata-Guzmán LY. (2015). Efecto del hierro sobre el crecimiento de *G. duodenalis*, evidencias del mecanismo de regulación. Tesis de Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Ponka P, Beaumont C y Richardson DR. (1998). Function and regulation of transferrin and ferritin. *Seminars in Hematology*; (35): 135-154.
- Procop GW. (2001). Gastrointestinal Infections. *Infection Diseases Clinical North American*; 15: 1073-1108.
- Prucca CG y Lujan HD. (2009). Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cellular Microbiology*; 11: 1706-1715.
- Que X, Svard S, Meng T-C, Hetsko M, Aley S y Gillin F. (1996). Developmentally regulated transcripts and evidence of differential mRNA processing in *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*; (81): 101-110.
- Rascón Jr AA y McKerrow JH. (2013). Synthetic and Natural Protease Inhibitors Provide Insights into Parasite Development, Virulence and Pathogenesis. *Current Medical Chemistry*; (20): 3078-3102.
- Ringqvist E, Palm JE, Skarin H, Hehl AB, Weily M, Davids BJ, Reiner DS, Griffiths WJ, Eckmann L, Gillin FD y Svard SG. (2008). Release of metabolic enzymes by *G. duodenalis* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Molecular and Biochemical Parasitology*; 159(2): 85-91.
- Rouault T y Harford JB. (2000). Translational Control of ferritin synthesis. In translational control of gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory; (4): 655-670.

- Said DE, Elsamad LM y Gohar YM. (2012). Validity of silver, chitosan, and curcumin nanoparticles as anti-*Giardia* agents. *Parasitol Research*; 111(2): 545-554.
- Sánchez-Aviles J, Velázquez-Contreras CA, Astiazarán-García H, Rascón L y Sotelo-Cruz N. (2013). Estudio Exploratorio de Inmunoglobulinas Séricas en Pacientes Pediátricos con Infección por *Giardia lamblia*. *Boletín Clínico Hospital Infantil del Estado de Sonora*; 30(2): 63-67.
- Scott KG, Yu LC y Buret AG. (2004). Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infection and Immunity*; 72(6): 3536-42.
- Selezneva AI, Walden WE y Volz KW. (2013). Nucleotide-specific recognition of iron-responsive elements by iron regulatory protein 1. *Journal of Molecular Biology*; (425): 3301-10.
- Shant J, Ghosh S, Bhattacharyya S, Ganguly NK y Majumdar S. (2004). The alteration in signal transduction parameters induced by the excretory product from *Giardia lamblia*. *Parasitology*; 129(Pt 4): 421-30.
- Shiflett AM y Johnson PJ. (2010). Mitochondrion-related organelles in eukaryotic protists. *Annual Review of Microbiology*; 64: 409-29.
- Solano-González E, Burrola-Barraza V, León-Sicairos CR, Ávila-González L, Gutiérrez-Escolano L, Ortega-López J y Arroyo R. (2007). The trichomonad cysteine proteinase TVCP4 transcript contains an iron responsive element. *FEBS letters*; 581 (16): 2919-2928.
- Soto-Castro L, Plata-Guzmán LY, Figueroa-Angulo EE, Calla-Choque J, Reyes-Lopez M, De La Garza M, Leon-Sicairos N, Garzon-Tiznado JA, Arroyo R y Leon-Sicairos C. (2017). Iron Responsive-like Elements in the parasite *Entamoeba histolytica*. *Microbiology*; doi: 10.1099/mic.0.000431.
- Sousa MC y Poiars-da SJ. (2001). The cytotoxic effects of ciprofloxacin in *Giardia lamblia* trophozoites. *Toxicology in vitro Journal*; 15(4-5):297-301.
- SSA (Secretaría de Salud). (2017). Notificación Mensual Casos Nuevos de giardiasis. Disponible en web <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/>.
- Suchan P, Vyoral D, Petrak J, Sutak R, Rasoloson D, Noynkova E, Dolezal P y

- Tachezy J. (2003). Incorporation of iron into *Trichomonas foetus* cell compartments reveals ferredoxin as a major iron-binding protein in hydrogenosomes. *Microbiology*; (149): 1911-1921.
- Tandara L y Salamunic I. (2012). Iron metabolism: current facts and future directions. *Biochemical Medicine*; 22(3): 311-28.
- Tasca T, Bonan CD, De Carli GA, Sarkis JJ y Alderete JF. (2005). Heterogeneity in extracellular nucleotide hydrolysis among clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*; 131(1): 71-8.
- Tolba MEM, Kobayashi S, Imada M, Suzuki Y and Sugano S. (2013). *Giardia lamblia* Transcriptome Analysis Using TSS-Seq y RNA-Seq. *PLoS ONE* 8(10): e76184.
- Torres-Romero JC y Arroyo R. (2009). Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: Evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE-IRP-like system. *Infection, Genetics and Evolution*; (602): 1-10.
- Townson SM, Upcroft JA y Upcroft P. (1996). Characterisation and purification of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*; Volume 79, Issue 2: 183-193.
- Toxqui L, Piero AD, Courtois V, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ, y Vaquero M. (2010). Deficiencia y sobrecarga de hierro: implicaciones en el estado oxidativo y la salud cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*; 25(3): 350-365.
- Troeger H, Epple HJ, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard GD, Jelinek T, Zeitz M, Fromm M y Schulzke JD. (2007). Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut*; 56(3): 328-35.
- Vanacova S, Liston R, Tachezy J y Johnson P. (2003). Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*. *International Journal for Parasitology*; (33): 235-255.
- Vanderhoof JA. (1998). Chronic diarrhea. *Pediatrics in Review*; 19: 418-422.
- Wilkinson N y Pantopoulos K. 2014. The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. *Frontiers in Pharmacology*; 28(5): 176.

- Yichoy M, Duarte TT, De Chatterjee A, Mendez TL, Aguilera KY, Roy D, Roychowdhury S, Aley SB y Das S. (2011). Lipid metabolism in *G. duodenalis*: a post-genomic perspective. *Parasitology*; 138(3): 267-78.
- Yoshida N, Tyler KM y LlewellynMS. (2011). Invasión mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends in Parasitology*; 27(10): 459-66.
- Zuker M. (2003). Mfold web Server for nucleic acid holding y hibridization prediction. *Nucleic Acids Research*; 31(13): 3406-3415.