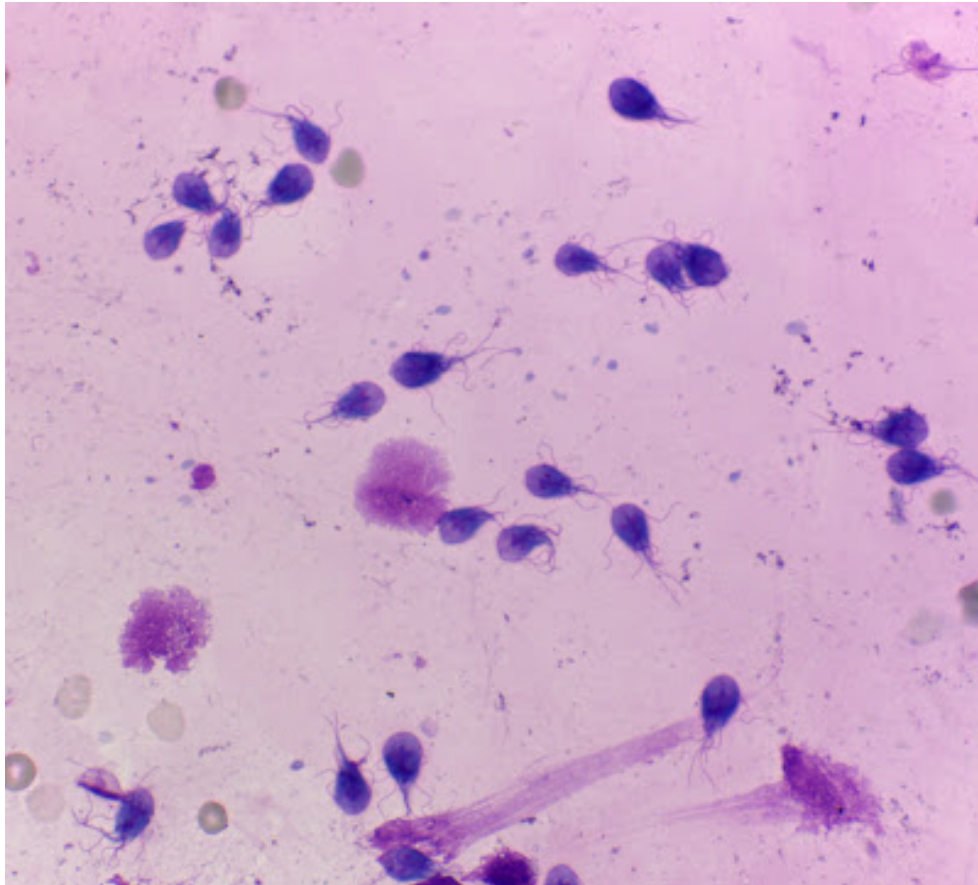




Universidad
Zaragoza



Evaluación del gen *tpi* como
herramienta para la caracterización
epidemiológica de *Giardia duodenalis*

Autora: Epifanía Arango

Directoras: Dra. M^a Pilar Goñi Cepero y María Benito Fernández

Grado en Biotecnología- Facultad de Ciencias

2016

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el trato que me ha brindado el grupo emergente DGA-FSE "Parasitología, Autocuidados y Salud Ambiental" B124. Gracias a Joanna Cieloszyk por cederme las secuencias utilizadas en el presente trabajo y permitirme continuar el estudio.

Pero sobre todo, este trabajo no habría sido posible sin el apoyo y la comprensión constante de mis directoras: la Dra. M^a Pilar Goñi Cepero y María Benito Fernández. Gracias por enseñarme a pensar científicamente y por los buenos momentos que hemos pasado juntas.

Gracias a todo el personal del departamento por su ayuda incondicional.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

bg: *β-giardina*

Cl₂Mg: cloruro de magnesio

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ghd: glutamato deshidrogenasa

H₂O: agua

M: molar

min: minutos

mg: miligramos

mL: mililitros

mM: milimolar

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

rRNA: ácido ribonucleico ribosómico

Ss: sitios segregantes

TBE: tris, borato y EDTA

tpi: triosa fosfato isomerasa

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

μl: microlitros

μm: micrómetros

π: diversidad nucleotídica

θ: parámetro de neutralidad

ÍNDICE

1. Resumen/Abstract.....	1
2. Introducción.....	2
2. 1 Características generales de <i>Giardia duodenalis</i>	2
2. 2 Mecanismo de patogenicidad y Giardiosis.....	3
2. 3 Patología y tratamientos.....	4
2. 4 Distribución.....	4
2. 5 Clasificación.....	5
2. 6 Epidemiología molecular.....	5
2. 7 Variabilidad genética asociada al gen <i>tpi</i>	6
3. Objetivos.....	8
4. Materiales y métodos.....	8
4. 1 Muestras y secuencias.....	8
4. 2 Gradiente de sacarosa.....	8
4. 3 Extracción de ADN genómico.....	8
4. 4 PCR (Polymerase Chain Reaction) del gen <i>tpi</i>	9
4. 5 Electroforesis en gel de agarosa.....	9
4. 6 Purificación de ADN.....	10
4. 7 Clonación.....	10
4. 7.1 Reacción de ligación.....	11
4. 7.2 Transformación de células competentes.....	12
4. 7.3 Caracterización de los clones obtenidos.....	12
4. 8 PCR de colonia.....	13
4. 9 Secuenciación.....	13
4. 10 Análisis de las secuencias.....	14
5. Resultados.....	15
5. 1 Secuencias del gen <i>tpi</i> y β - <i>giardina</i> procedentes de los pacientes.....	15
5. 2 Análisis individual del gen <i>tpi</i>	16
5. 3 Análisis por pacientes del gen <i>tpi</i>	17
5. 4 Análisis de los clones obtenidos.....	18
6. Discusión.....	20
7. Futuras recomendaciones.....	21
8. Conclusiones/Conclusions.....	22
9. Bibliografía.....	23

1. RESUMEN/ ABSTRACT

La giardiosis es una enfermedad causada por *Giardia duodenalis* en una gran variedad de vertebrados. Este protozoo es el flagelado más frecuentemente aislado como causa de diarrea, tanto en países desarrollados como en aquellos países de baja renta, siendo más notable su presencia en estos últimos debido a las condiciones higiénicas. Los síntomas en humanos son variables, siendo los más comunes la diarrea y la mala absorción asociados a las anomalías de las microvellosidades intestinales donde se fija el parásito. Para el estudio de la epidemiología de *Giardia* se utilizan técnicas moleculares que incluyen la caracterización de un fragmento del gen que codifica la *triosa fosfato isomerasa* y otros genes como la β -*giardina*, llevando a cabo estudios multilocus. Considerando las discrepancias que se obtienen en los estudios realizados con el gen *tpi*, este estudio tiene como objetivo describir la diversidad asociada al gen *tpi*. Para ello, se ha realizado la clonación de muestras procedentes de las muestras de un paciente y estudiando la variabilidad de los fragmentos obtenidos utilizando programas informáticos de análisis genético. Los resultados obtenidos muestran una gran variabilidad que pone en duda la utilidad de este gen como marcador.

Giardiasis is a disease caused by Giardia duodenalis in a wide variety of vertebrates. This protozoan is the flagella most frequently isolated as a cause of diarrhea, both developed and developing countries, having more relevance in the latter one due to the hygienic conditions. Symptoms in humans are variable, the most common are diarrhea and intestinal malabsorption associated with abnormalities in the intestinal microvilli due to the fixation of the parasite in the intestine. Molecular techniques are used for the study of the Giardia epidemiology that include the characterization of a fragment of the gene that codes the triose phosphate isomerase and other genes as β -giardine, carrying out a multilocus study. Considering the discrepancies obtained in studies with the tpi gene, this study aims to describe the diversity associated with the tpi gene. For this purpose, it has performed cloning samples from a patient samples and study the variability of the fragments obtained using genetic analysis software. The results show a large variability that questions the usefulness of this gene as a marker.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Características generales de *Giardia duodenalis*

Giardia duodenalis, también conocida como *Giardia lamblia* o *intestinalis*, es un parásito flagelado eucariota unicelular causante de *giardiosis* en un amplio rango de vertebrados. Pertenece al *phylum Metamonadina* y fue identificada por primera vez en el año 1600 por Antonie van Leeuwenhoek mientras observaba al microscopio muestras fecales con diarrea (Dobell, 1920). En la actualidad, es el flagelado intestinal más frecuentemente aislado, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Aunque se observa una mayor prevalencia en países tropicales y subtropicales (Tellez. *et al.*, 2007), en países desarrollados se sigue encontrando una gran incidencia de la infección. Los datos apuntan a una posible relación entre el retraso del crecimiento a largo plazo y la giardiosis crónica. (Fraser *et al.*, 2000)

Se trata de un organismo con dos núcleos cuya carga genética es idéntica, se replican y transcriben aproximadamente al mismo tiempo (Cacciò *et al.*, 2010). *Giardia* se presenta bajo dos estadios morfológicos: trofozoito y quiste, siendo el primero la forma vegetativa y el segundo la forma infectante y de resistencia. Los trofozoitos de *Giardia* tienen forma piriforme y una longitud aproximada de 12-15 μm por 5-9 μm de ancho. En el citoplasma encontramos diferentes orgánulos: los dos núcleos carentes de nucleolos, un micronúcleo con ADN genómico que no se transcribe, un cuerpo mediano formado por microtúbulos, lisosomas, ribosomas y gránulos de glucógeno. A diferencia del resto de los eucariotas, *Giardia* carece de ciertos orgánulos ubicuos como las mitocondrias, los peroxisomas, el retículo endoplasmático liso o los nucleolos. En la parte ventral anterior aparece una estructura llamada disco adhesivo o disco de succión formado por microtúbulos que actúa como una ventosa gracias al anillo periférico. El trofozoito posee cuatro pares de flagelos (anteriores, caudales, posteriores y ventrales) que nacen de los cuerpos basales situados entre ambos núcleos destinados a la movilidad del parásito (Ramesh *et al.*, 2005).

El quiste tiene una forma oval de 8 a 12 μm de longitud por 7 a 10 μm de ancho. Cuenta con dos o cuatro núcleos que suelen situarse en uno de los extremos. Tiene cuerpos medianos, fragmentos de microtúbulos del disco ventral y numerosas vacuolas y ribosomas (Adam, 1991). La pared del quiste tiene 0,3 μm de grosor y está compuesta por una capa filamentosa externa y dos membranas internas. Su composición mayoritaria está constituida por cuatro proteínas principales y galactosaminas en forma de N-acetilgalactosamina. Este azúcar solo aparece en el quiste, lo que permite la detección de los mismos midiendo los niveles de UDP-GlcNAc-4-epimerasa. Mediante este método se puede detectar el desenquistamiento del parásito. La forma quística de *Giardia* es resistente a cambios de temperatura y a las concentraciones de cloro utilizadas en la potabilización; además es capaz de permanecer viable hasta 16 días a 4°C y los quistes se destruyen a 50°C (Clavel *et al.*, 1990).

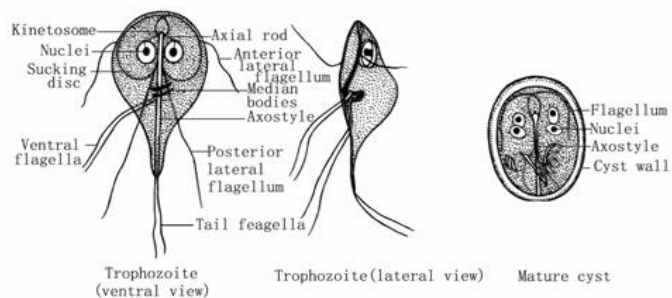


Figura 1: Morfología de *Giardia duodenalis* en estado de trofozoito y de quiste maduro (Hallen *et al.*, 2004)

2.2 Mecanismo de patogenicidad y Giardiosis

Durante su ciclo vital, *Giardia* cuenta con los dos estadios morfológicos anteriormente citados; trofozoito y quiste. La infección de un hospedador comienza con la ingesta de quistes presentes en agua contaminada, alimentos contaminados o contacto directo feco-oral. Para que la infección ocurra son necesarias dos condiciones: encontrar un hospedador adecuado y la ingestión de un número suficiente de quistes viables. La dosis de ingestión de quistes considerada como infectante es muy baja, de 10 a 100 quistes (Rendtorff, 1954). Después de la exposición al ambiente ácido del estómago y a la actividad de las proteasas pancreáticas, se produce el desenquistamiento y la formación de dos trofozoitos por quiste en el intestino delgado proximal (Boucher *et al.*, 1990). Los dos trofozoitos hijos, formados por fisión binaria, se liberan por uno de los polos, los flagelos salen y los trofozoitos emergen de la parte posterior. Inicialmente tienen una forma redondeada, que a medida que pasa el tiempo, adquiere su apariencia característica (Buchel *et al.*, 1987). El trofozoito usa sus flagelos para dirigirse a las microvellosidades y adherirse al epitelio intestinal. Las fuerzas mecánicas generadas por las proteínas contráctiles de la cresta lateral del disco ventral y de la lectina de superficie, permiten esta adhesión que se activa por las secreciones del duodeno. Se multiplican en el intestino delgado, su hábitat, y es allí donde causa los síntomas.

La colonización se da en el duodeno distal y el yeyuno proximal, allí los trofozoitos pueden permanecer durante largos periodos de tiempo favorecidos por ciertos efectos como las sales biliares que ofrecen los lípidos necesarios para su crecimiento, los carbohidratos y la baja presión parcial de oxígeno que existe en la luz del intestino delgado (Rodney, 2001).

Los trofozoitos pueden estar fijados al intestino como se ha explicado anteriormente o liberarse. En este caso al no estar fijados son capaces de dividirse por fisión binaria o pueden ser arrastrados hasta las partes bajas del intestino. Allí la exposición a la bilis produce su enquistamiento y pasan a las heces, permitiendo comenzar de nuevo el ciclo de transmisión en un nuevo hospedador (Rodney *et al.*, 2001).

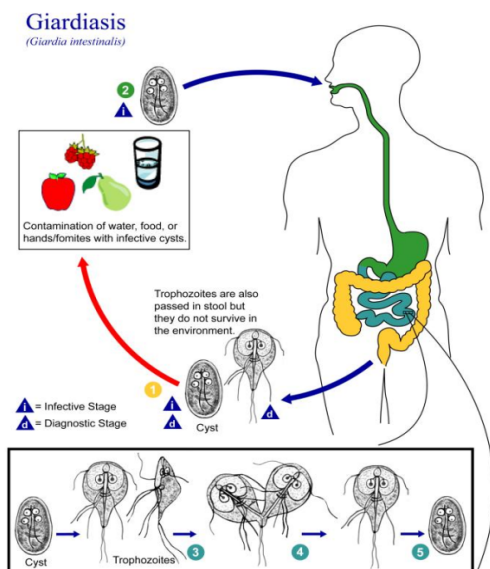


Figura 2: Ciclo infeccioso de *Giardia duodenalis*. Imagen procedente de Public Health Image Library

2.3 Patología y tratamientos

La patogenicidad de *Giardia* implica anomalías estructurales en la mucosa del intestino delgado (Yardley *et al.*, 1964). En humanos, la giardiosis está asociada a un amplio repertorio de anomalías en las microvellosidades intestinales. La mayoría de los individuos sufren un acortamiento de las microvellosidades, asociado al aumento de la profundidad de las criptas donde se aloja el patógeno. Aunque solo el 20 -25% de los casos de giardiosis no presentan estas anomalías (Farthing *et al.* 1997). Hay estudios que sugieren que la extensión del daño en la mucosa está relacionada con la severidad de la diarrea (Wright *et al.*, 1977; Duncombe *et al.*, 1978). El mecanismo por el cual *Giardia* causa diarrea y malabsorción intestinal sigue siendo un tema controvertido. Algunos sugieren que los trofozoitos actúan como barrera mecánica a la absorción de los nutrientes (Katelaris *et al.*, 1992). Esta hipótesis es cada vez más dudosa por la presencia de una reserva importante de nutrientes en el intestino y la pequeña masa metabólica que representa el parásito. Hay evidencias de que *Giardia* puede producir grados variables de daño en la mucosa y al mismo tiempo influenciar las condiciones de la luz intestinal perjudicando la absorción y la digestión de nutrientes. Esto junto con la captación de sales biliares por el parásito pueden ser las causantes de los síntomas descritos (Farthing *et al.* 1997).

Los síntomas derivados son muy variables, entre ellos se destacan diarrea persistente, dolor abdominal y rápida pérdida de peso (Thompson *et al.*, 1993). Las razones de esta variabilidad se atribuyen a factores inherentes al parásito debido a sus diferentes genotipos y/o hospedador cuya edad, estado inmunitario y estado nutricional jugarán un papel crucial. La sintomatología de giardiosis puede llegar a ser confundida con la celiaquía (Poirier *et al.*, 2012). Los síntomas oscilan desde pacientes asintomáticos a trastornos intestinales leves o cuadros de larga evolución con mala absorción (Stevens, 1985).

Dependiendo del país, la disponibilidad y las preferencias del médico, se usan diferentes fármacos para el tratamiento de la giardiosis que consisten generalmente en el uso de nitroimidazoles (Metronidazol, Trinitazol y Ornidazol) y benzimidazoles (Albendazol, Mebendazol). También se pueden usar derivados de acridina (Quinacrina) y furazolidona (Pareja, 2006).

2.4 Distribución

La giardiosis es una enfermedad cosmopolita que afecta a humanos en todo el mundo. Se trata de la primera causa de parasitosis intestinal humana en países desarrollados (Thompson, 2004). En algunas zonas geográficas es endémica, afectando a la población infantil con frecuentes reinfecciones, pudiendo ser epidémica. En Asia, África y Latinoamérica unos 200 millones de personas tienen giardiosis sintomática con unos 500.000 nuevos casos declarados cada año (WHO, 1996). La tasa de incidencia varía en función de las condiciones socio-sanitarias de la zona a estudio, contando con una mayor incidencia aquellos países de baja renta cuyas condiciones higiénicas y sanitarias son más bajas.

Estudios recientes sobre las tasas de infección en países desarrollados registran tasas del 4% en Bélgica, 1,5% en Alemania, del 0,4% al 6,2% en Italia, 3,7% en Portugal, 5,4% en España, 1,3% en Reino Unido o 1,4% en Estados Unidos entre otros países. Los ensayos fueron llevados a cabo con muestras procedentes de niños asintomáticos, estimándose que la incidencia de giardiosis en niños con diarrea sería probablemente mayor. Aunque *Giardia* no es considerado un patógeno oportunista, en pacientes inmunocomprometidos la tasa de giardiosis en pacientes infectados por VIH aumenta de forma significativa en todos los países donde se han llevado a cabo este tipo de estudios (Feng *et al.*, 2011).

El principal reservorio y fuente de infección es el hombre, siendo las personas más susceptibles, debido a sus hábitos higiénicos, los niños, facilitando su transmisión a familiares y cuidadores, los viajeros a zonas endémicas y personas inmunodeprimidas

(Pareja, 2006). La eliminación fecal del parásito y la resistencia de los quistes a agentes externos posibilita su transmisión por la vía hídrica y por el consumo de alimentos de consumo fresco contaminados. Los vertidos urbanos o de animales resultan en la introducción de los quistes en el sistema hídrico.

En un estudio realizado en España por la red de laboratorios clínicos que cubre un cuarto de la población fueron confirmados 859 casos por año, lo que sugiere que los casos de giardiosis son más altos de lo que muestran las estadísticas oficiales. Incluso a pesar de esta supuesta subestimación de la incidencia, los estudios epidemiológicos señalan una alta prevalencia en España (8,4% Santiago de Compostela, 4,4% en Salamanca, un 20% en Teruel y más del 30% en Cuenca y Albacete) (De Lucio *et al.*, 2015). No sólo su elevada prevalencia es preocupante, sino también la alta proporción de portadores sanos que actúan como reservorio. Un estudio reciente realizado en una guardería de Madrid, muestra que entre un 15,5% de los aislamientos dan positivos para *Giardia* (Mateo *et al.*, 2014).

Entre el 25% y el 50% de los viajeros procedentes de países desarrollados, experimentan diarrea al viajar a países tropicales (De las Casas *et al.*, 1999). *Giardia* es el principal candidato como causante de la diarrea en viajeros, inmigrantes o adopciones internacionales sobre todo en personas procedentes de regiones endémicas como India o África. Con el continuo incremento de los viajeros internacionales y el número de refugiados e inmigrantes procedentes de países endémicos, la epidemiología de la giardiosis en muchos países occidentales está cambiando (Ekdahl *et al.*, 2005). La giardiosis fue incluida en el año 2004 en la iniciativa de enfermedades olvidadas de la OMS y en el año 2015 la lista de enfermedades de declaración obligatoria en España.

2.5 Clasificación

Disponer de una clasificación apropiada para *Giardia* spp. es fundamental para comprender la patogenicidad y la epidemiología de la infección que produce este parásito. Los miembros de este género no se distinguen por características morfológicas notables, lo que dió lugar a una primera clasificación dudosa basada en la medida de las dimensiones de los quistes por microscopía, que subestimaban el número de especies, ya que los diferentes grupos estaban basados en medidas que se solapaban. Hasta la fecha se han descrito 11 especies de *Giardia* basándose en las características morfológicas de los trofozoítos. Seis de ellas (*G. aguilis*, *G. ardeae*, *G. psittaci*, *G. muris*, *G. microti* y *G. duodenalis*) se han clasificado teniendo en cuenta la morfología del trofozoíto y el cuerpo mediano, utilizando la microscopía óptica y electrónica (Plutzer *et al.*, 2010).

También se intentó la clasificación de *Giardia* en función de su hospedador, pero la inherente variabilidad en las especies de *Giardia* que afectan a mamíferos, hacía a este tipo clasificación ineficaz. Este sistema además supuso la sobreestimación del número de especies.

2.6 Epidemiología molecular

De todas las especies anteriormente mencionadas, la única que se ha encontrado afectando al hombre es *Giardia duodenalis* y es a la que, a partir de ahora, hará referencia el trabajo. Dicha especie parasita al hombre y también a otros mamíferos. Con la reciente aparición de las técnicas moleculares se intenta construir una clasificación dentro de la especie *duodenalis*, con el objetivo de poder profundizar en su biología, sus vías de transmisión y otras características como la relación entre genotipo y sintomatología o resistencia a los tratamientos.

La clasificación genética del parásito se basa en polimorfismos de proteínas y ADN. Los genes más usados para la caracterización molecular son la subunidad pequeña ribosomal (*ssu-rRNA*), β -giardina (*bg*), glutamato deshidrogenasa (*gdh*), factor de elongación 1-alfa(*ef-1*), triosa fosfato isomerasa (*tpi*), GLORF-C4 (*C4*) y recientemente la región

espaciadora intergénica rRNA (Cieloszyk, 2016). Los genotipos obtenidos para *G. duodenalis* fueron agrupados en 7 ensamblajes (A-G) que a su vez se dividen en subensamblajes, encontrándose en humanos únicamente los ensamblajes A y B. De estos dos, el ensamblaje A de *Giardia* se divide a su vez en dos subgrupos, I y II. El ensamblaje AI ha sido detectado en heces de ganado, gatos, perros, castores, conejillos de indias y slow lorises, mientras que el ensamblaje AII parece ser específico para humanos. La separación de estos dos grupos fue hecha inicialmente por análisis de aloenzimas y confirmada por análisis filogenéticos de las secuencias del ensamblaje A en el locus *gdh*. Se sabe de la existencia de numerosos subtipos relacionados con los subgrupos AI y AII, pero esta separación no se hace de forma tan clara y obvia si se tiene en cuenta otros genes como *tpi* o *bg*. Recientemente un tercer subgrupo del ensamblaje A ha sido identificado, el subgrupo AIII. Cuenta con diferencias significativas con respecto al ensamblaje AI y AII en los loci que han sido examinados hasta el momento (Breathnach *et al.*, 2010).

El ensamblaje B, a su vez, también ha sido subdividido en BIII y BIV (Torres-Romero *et al.*, 2014) y tiene un amplio rango de hospedadores desde perros, castores, ratas, slow lorises, chinchillas y siamangs.

La distribución de los ensamblajes A y B parece deberse a un componente geográfico. El ensamblaje B es más común que el ensamblaje A tanto en países desarrollados como en los países en vías de desarrollo. También se ha observado que el subgrupo AII es ligeramente más frecuente en humanos que el subgrupo AI (Feng *et al.*, 2011). Cada vez se encuentran más genotipos capaces de infectar a personas, como es el caso del ensamblaje E, inicialmente descrito como infectante únicamente de ganado (Forona *et al.*, 2008).

Sin embargo, la división genotípica que se ha establecido para *Giardia* parece ser mucho más compleja de lo que se creyó. La aparición de bandas múltiples en los cromatogramas que se obtienen en las secuencias, así como la resolución de algunos aislamientos en diferentes ensamblajes según el gen utilizado y la ausencia de criterios estandarizados para determinar la asociación epidemiológica de los aislamientos, complican el estudio del parásito.

2.7 Variabilidad genética asociada al gen *tpi*

Los loci *tpi*, *gdh* y *bg* son usados de forma común como marcadores genotípicos. Pero es frecuente que entre los diferentes loci aparezcan resultados inconsistentes en el genotipado. El gen *tpi* es el que presenta el mayor grado de polimorfismos. En diferentes estudios se ha observado esta gran variabilidad en la secuenciación de este gen que presenta frecuentes desapareamientos, picos múltiples y discordancia dentro del mismo ensamblaje (Bonhomme *et al.*, 2011). Diferentes hipótesis explican dicha variabilidad: la existencia de infecciones mixtas inter e intra-genotipo, el intercambio genético entre diferentes especies, una posible reproducción sexual o simplemente el gen *tpi* no es adecuado para la caracterización genotípica de *Giardia*, en cuyo caso, también se debería estudiar el porqué de este hecho.

La epidemiología de la giardiasis humana parece ser más complicada de lo que se pensó si partimos de estas premisas. Actualmente la presencia de infecciones mixtas, no solo es una hipótesis, sino que cuenta con un amplio número de estudios que lo corroboran. Por ejemplo, una investigación en la cual a partir de aislamientos procedentes de humanos y animales, utilizando dos o más loci, 13 de cada 100 infecciones eran infecciones mixtas. Más casos de infecciones mixtas han sido detectados en perros, gatos, cabras, ovejas, cerdos y animales salvajes donde aparecen frecuentemente especies de *Giardia* de los ensamblajes A y E (Sprong *et al.*, 2009).

Ciertos estudios hablan ya de una posibilidad real de la existencia de un intercambio genético entre especies del assemblage A o incluso entre especies de los assemblages A y B (Teodorovic *et al.*, 2007).

También existen estudios que sostienen la hipótesis de que *Giardia* pueda tener una reproducción sexual o un intercambio meiótico. *Giardia* supuestamente cuenta con una población clonal cuya proliferación se basa en un mecanismo asexual y hasta el momento no hay evidencias de intercambio genético sexual. La reproducción sexual es un rasgo común en los eucariotas, llegando incluso a considerarse una norma. Sin embargo, para muchos protistas no ha sido posible conseguir la certeza de una reproducción sexual, siendo definidos como asexuales. En el caso de *Giardia* se ha detectado la presencia de genes homólogos a aquellos utilizados para la recombinación meiótica en el resto de eucariotas sexuales, lo que hace dudar de su reproducción asexual. Sin embargo, no se sabe si realmente estos genes están involucrados en una recombinación meiótica, ya que podrían tener otras funciones como la reparación del ADN, situando así a *Giardia* como un eslabón entre eucariotas y procariotas. Incluso en el caso de que la reproducción sexual de *Giardia* fuera una realidad, es posible que sean episodios aislados difíciles de identificar (Ramesh *et al.*, 2005). La hipótesis de la reproducción sexual además ayudaría a dilucidar otro dilema: el bajo nivel de heterocigosis alélica. Cuando los organismos asexuales presentan ploidía de más de un cromosoma, uno de sus cromosomas homólogos diverge, como ocurre en el caso de los rotíferos *Bdelloidea* que se reproducen de forma asexual desde hace más de 40 millones de años. Pero *Giardia* se conforma de forma diferente, pues homogeniza la carga genética de sus cromosomas a diferencia del resto de organismos asexuales. La heterocigosidad en las secuencias es menor del 0,002% lo que podría ser explicado con la existencia de recombinación meiótica (Cooper *et al.*, 2007).

El uso del gen *tpi* para la genotipificación de las muestras de *Giardia* está en duda por su inherente variabilidad, aunque ciertos autores apuestan por el desarrollo de nuevos cebadores específicos para el assemblage A o B será útil para la detección de los especímenes en infecciones mixtas (Alonso *et al.*, 2010). Estos datos podrían mejorar el entendimiento del espectro clínico de la giardiosis, la intensidad en su endemidad de giardiosis, el rastreo de fuentes de infección, y la identificación y diferenciación de brotes de giardiosis.

Es posible que sean necesarios nuevos marcadores genéticos para subtipificar las especies de *Giardia* en el assemblage A, generando así herramientas de uso común para diferenciar correctamente los subassemblages AI, AII y AIII e incluso crear nuevas categorías. Además de la necesidad de nuevas estrategias para el tipificado del assemblage B, ya que debido a su alta heterogeneidad genética, en la mayor parte de los marcadores se observan diferencias en algún loci (Feng *et al.*, 2011). La variabilidad genética de *Giardia* genera la necesidad de encontrar marcadores multilocus que sean estables para genotipificación, pero a su vez suficientemente variables para la correcta caracterización de las especies. De igual manera, también es necesario definir si existe variabilidad generacional y estandarizar unos criterios que permitan la interpretación uniforme de los resultados.

En la tesis doctoral de Johanna Cieloszyk (2016) entre otros objetivos, se intentó avanzar en la caracterización molecular de *Giardia duodenalis* utilizando como marcadores los genes *tpi* y β -giardina, para determinar esos criterios que permitan estudiar la identidad de aislamientos o su relación epidemiológica. Los resultados obtenidos muestran una elevada variabilidad para el fragmento estudiado del gen *tpi*, cuando se analizan aislamientos de *Giardia* del mismo paciente tomadas en días sucesivos, cuando en principio se debería encontrar identidad o una estrecha relación epidemiológica. Esta variabilidad, más alta con el assemblage B que en el A, pone en duda la utilidad de este gen como diana para estudiar

la epidemiología de *Giardia duodenalis*, a la vez que avala la presencia de infecciones mixtas inter e intragenotipo en la mayoría de los casos de giardiosis.

3. OBJETIVOS

Este estudio es la continuación de la tesis doctoral de Joanna Cieloszyk y persigue clarificar la problemática variabilidad del gen *tpi*. El *objetivo general* es determinar la viabilidad del uso del gen *tpi* como marcador molecular para la tipificación de *Giardia duodenalis*. Para ellos se plantean los siguientes objetivos:

- Identificar la presencia de infecciones mixtas
- Esclarecer la posibilidad de una reproducción sexual

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Muestras y secuencias

Las muestra analizadas son proporcionadas por dos hospitales: el Complejo Asistencial de León y el Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” y proceden de 26 pacientes diagnosticados con giardiosis mediante observación al microscopio óptico de muestras de heces previamente concentradas. Se tienen un total de 35 muestras tomadas en días alternos entre los años 2010 y 2011 que son previamente secuenciadas en la tesis de Joanna Cieloszyk. En el presente trabajo se llevó a cabo la clonación y análisis de dos muestras (521 y 525) correspondientes a un mismo paciente (paciente 1).

4.2 Gradiente de sacarosa

La flotación en gradiente de sacarosa permite la purificación y concentración de los quiste de *Giardia* en un medio inocuo para ellas. Las heces se diluyeron en un volumen de entre 5 y 10 mL de agua y posteriormente fueron homogeneizadas con un vórtex. Posteriormente la disolución puede ser filtrada. A continuación, se hicieron resbalar 5 mL de la suspensión por las paredes de un tubo Falcon y se depositaron alrededor 10 mL de sacarosa 1 M fría. Este mismo tubo se centrifugó a 450 xg por 5 minutos. La interfase resultante se recogió con una pipeta pasteur en un nuevo tubo, sobre el que se añadieron 40-50 mL de agua esterilizada, centrifugando de nuevo bajo las condiciones citadas anteriormente. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado formado en 2,5 mL de agua destilada estéril. Esta suspensión se despositó sobre 10 mL de sacarosa 500 mM, y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores.

El sedimento formado se recogió en un nuevo tubo, donde se lava con 40 mL de agua destilada estéril y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se añadió 1 mL de agua destilada estéril. Tras la mezcla de los mismos, se transfirieron a un tubo eppendorf de 1,5 mL. Para la comprobación de la correcta realización del protocolo se observó una gota al microscopio y después la muestra se almacenó -20°C.

4.3 Extracción del ADN genómico

A partir de las muestra concentradas procedentes de heces, se realizó una extracción de ADN con el kit de extracción ADN IBIAN® DNA Stool Kit o el NORGEN BIOTEC DNA Isolation Kit. Se siguió el protocolo del fabricante que en los dos casos son similares y se basan en los mismos principios:

- Se tomaron 200-400 mg de muestra sobre los que se añade 1,1-1,2 mL de la solución de lisis (Lysis Buffer) en función del kit. Se homogeneizó con un vórtex para dar lugar a la rotura de los quistes.

- Se añadieron 200 μL de la solución bloqueante de pH 5 (Binding Buffer) cuya función es neutralizar el pH básico generado durante el proceso anterior. La mezcla se añadió en una columna con membrana donde el ADN se fija.
- La membrana fue lavada para eliminar impurezas y restos celulares con las soluciones de lavado (wash buffer) I y II (600 μL en total).
- El ADN se desprendió de la membrana con 100 μL del tampón de elución y se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.4 PCR (Polymerase Chain Reaction) del gen *tpi*

La amplificación del gen *tpi* fue realizada gracias a la reacción en cadena de la polimerasa, en concreto se realizó con una PCR anidada. Los experimentos se desarrollaron en un volumen final de 50,3 μL con 3 U de DFS-Taq ADN polimerasa (BIORON) utilizando la siguiente mezcla de reacción para las dos PCRs:

Tabla 1: Reactivos y volumen correspondientes a la reacción de amplificación del gen *tpi*.

Reactivo	Volumen (μL)
Buffer 10x	5
Cl_2Mg (100 mM)	1,5
dNTPs (25 mM)	0,4
Cebador directo(5 μM)	2
Cebador inverso (5 μM)	2
Taq Go	0,3
H_2O	34,1
ADN	5

La diferencia entre la primera y la segunda PCR radica en los cebadores que se describen en la siguiente tabla:

Tabla 2: Cebadores para la PCR anidada

PCR1	PCR2
AL3543 (5'-AAATIATGCCTGCTCGTCG-3')	AL 3544 (5'-CCCTTCATCGGTGGTAACTT-3')
AL3546 (5'-CAAACCTTITCCGCAAACC-3')	AL3545 (5'-GTGGVVACCACICCCGTGCC-3')

Las dos reacciones se llevaron a cabo en tubos de 200 μl para PCR en los termocicladores MiniCyclerTM MJ Research y Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler. El programa empleado consiste en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación de 45 s a 94°C , 45 s a 50°C y 1 min a 72°C y por último una extensión final a 72°C durante 10 min. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa para confirmar la presencia del amplicón.

4.5 Electroforesis en gel de agarosa

Para la correcta visualización de los fragmentos de ADN, estos se separaron en función de un gradiente de potencial que impulsa el transporte de las partículas cargadas, como es el

caso del ADN (carga negativa). La concentración de agarosa utilizada fue del 1,5%. La cantidad de agarosa (Agar Gel Tupe IME, Linus) se pesó y se disolvió en TBE x 0,5 (Tris 0,045 M, ácido bórico 0,045 M, EDTA 0,001 M, pH 8) con bromuro de etidio (Sigma, Mo, USA) a una concentración final de 5 mg/mL, que se intercala entre las hebras del ADN, produciendo una coloración anaranjada cuando se visualiza con luz UV. Esta disolución se calentó hasta que la muestra estaba completamente homogeneizada. La disolución se vertió sobre una bandeja electroforética previamente sellada con un molde que forma los pocillos. Tras el enfriamiento y solidificación del gel, se retiró el molde y se instaló en una cubeta electroforética con tampón TBE x0,5.

La muestra (5 μ L) a cargar debe ser previamente mezclada con 2 μ L del tampón de carga (1% SDS, 50 % glicerol, 0,05 % azul de bromofenol). En cada gel debe haber al menos un marcador de peso molecular cuya preparación es la misma que la de las muestras corrientes. El marcador utilizado fue el ADN del Fago λ *Pst*I (116 μ g/mL, Tampón Multi-core 1x, enzima *Pst*I 200 U (Promega Corporation, USA), agua miliQ estéril 240 μ L- Incubar 24 horas a 37°C en el baño termostatizado).

La electroforesis tuvo lugar a 100 V de forma constante y durante un tiempo que varía entre 45 min y hora y media en función de la cubeta utilizada o las muestras a analizar. El gel se visualizó en un transiluminador con luz ultravioleta a 340 nm.

4.6 Purificación de ADN

Después de la visualización de las muestras en el gel de agarosa para confirmar su correcta amplificación. Todo el volumen de las muestras se dispuso en otro gel de agarosa, que se preparó siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente, pero con ciertas peculiaridades: un mayor grosor del gel y un aumento en el tamaño de los pocillos. Tras la finalización de la electroforesis, el gel se visualizó en un transiluminador y las bandas de los genes deseados se cortaron con un bisturí. El fragmento de gel cortado fue almacenado en un tubo eppendorf, donde se procedió a su purificación gracias al Kit Speedtools PCR Clean-Up (Biotools). El protocolo seguido fue el aconsejado por el fabricante. El Kit se basa en los siguientes principios:

- Se añadió el buffer en una proporción 200 μ L buffer/100 mg gel, sobre la banda del gel de agarosa cortada, y se incubó a \approx 60°C hasta su lisis, tanto del gel como de las proteínas.
- La disolución se transfirió a una columna de sílice donde tras sucesivos lavados (\approx 600 μ L) se eliminan los contaminantes. El ADN se adhiere a la membrana.
- Un tampón de elución fue añadido (15-30 μ L) para romper la unión establecida entre el ADN y la membrana.
- El producto fue almacenado en un eppendorf de 1,5 mL a -20°C

4.7 Clonación

La clonación del gen *tpi*, que codifica para la triosa fosfato isomerasa, se realizó en el vector pGEM®-T Easy Vector (3015 pb). Este vector cuenta con una zona de policlonaje, donde se incorpora el inserto en mitad del gen *lac Z*, lo que permitió la identificación posterior de las colonias y además tiene sitios de restricción únicos. En este caso, el gen a insertar fue el fragmento del gen *tpi* procedente de la PCR realizada anteriormente. El vector utilizado posee un gen de resistencia a Ampicilina para seleccionar aquellos plásmidos que han incorporado el vector.

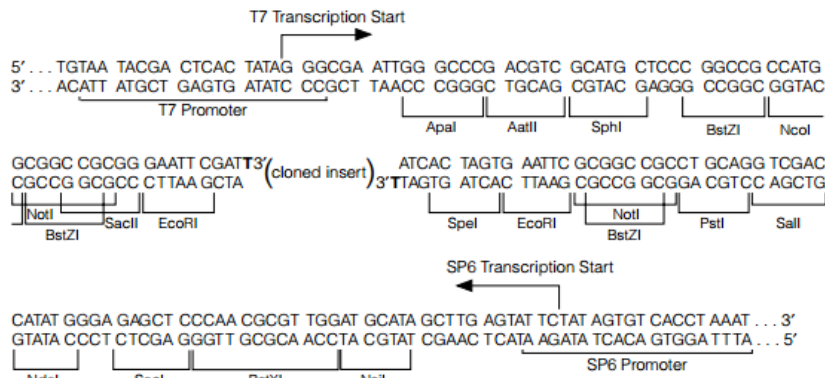
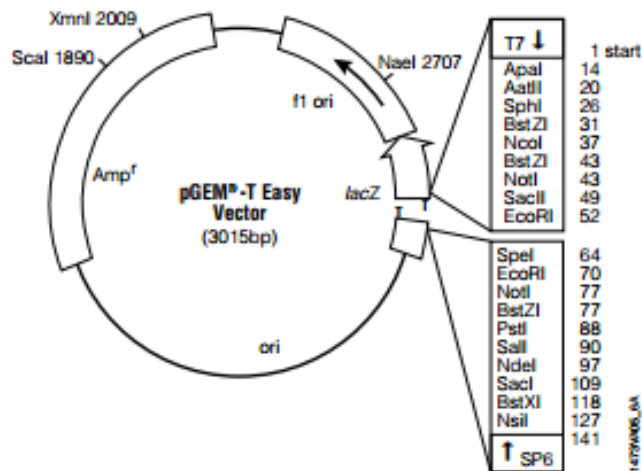


Figura 3: Mapa genético del vector pGEM®-T Easy Vector (3015 pb)

4.7.1 Reacción de ligación

La proporción entre el vector y ADN problema debe ser 1:3, por lo que previamente se realizó una electroforesis con un marcador de cuantificación (EasyLadder I, Bolinee Ltd, Reino Unido) para determinar la cantidad de ADN presente en la muestra. Las cantidades establecidas para la reacción fueron las siguientes:

Tabla 3: Reactivos y volumen correspondientes de la MIX de clonación.

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer de ligación 2x	5
pGEM®-T Easy Vector (50 ng)	1
producto de PCR	/
T4 DNA ligasa	1
Agua desionizada hasta un volumen final de	10

Las reacciones se homogenizaron con la pipeta y se incubaron durante una noche a 4°C. Al día siguiente, se dejaron a temperatura ambiente durante al menos una hora. Se sabe que la temperatura idónea para que ocurra la reacción de ligación está en algún lugar entre 4°C y temperatura ambiente.

4.7.2 Transformación de las células competentes

Las células competentes se almacenaron a -80°C y se descongelaron en hielo. La cepa utilizada para la transformación fue la JM 09. El genotipo de JM109 es *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (*rK-*, *mK+*), *relA1*, *supE44*, $\Delta(\text{lac-proAB})$, [*F'*, *traD36*, *proAB*, *lacIqZ* Δ M15]. En primer lugar, se preparon placas de agar MacConkey (CULTIMED) con ampicilina siguiendo las especificaciones del fabricante para seleccionar las bacterias que han integrado el vector.

El agar MacConkey se compone de lactosa, peptona, sales biliares, peptona de gelatina, rojo neutro, cloruro de sodio, cristal de violeta y agar en concentraciones 10g/L, 3g/L, 1,5 g/L, 17 g/L, 0,003 g/L, 5 g/L, 0,001 g/L, 13,5 g/L respectivamente a un pH de $7,1 \pm 0,2$. La ampicilina se añadió a una concentración de 0,1 mg/mL.

La reacción de ligación se centrifugó brevemente y se añadieron 5 μL de cada reacción de ligación en un tubo eppendorf estéril de 1,5 mL. A este tubo se añadieron 50 μL de las células competentes para su mezcla, se agitó el tubo y posteriormente se incubó en hielo durante 20 minutos.

Para la realización del choque térmico, se introdujo la mezcla en un baño de agua a 42°C durante 45-50 segundos. Es de especial importancia no agitar el tubo durante la realización de este paso y volver a introducir los tubos, de manera inmediata, en hielo durante dos minutos. Después, se añadieron 950 μL de medio SOC a temperatura ambiente que favorece la expresión y se incubó 1,5 horas a 37°C . Los componentes de este medio son triptona, extracto de levadura, sulfato de magnesio, dextrosa, cloruro de sodio y cloruro de potasio a una concentración de 20 g/L, 5 g/L, 4,8 g/L, 3,603 g/L, 0,5 g/L, 9,186 g/L respectivamente.

Pasado este periodo de incubación, los cultivos se dividieron en alícuotas de 300 μL , que se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se inoculó el pellet en una de las placas agar MacConkey 0,1 mg/mL Amp preparadas anteriormente. Las placas se incubaron 24h a 37°C .

4.7.3 Caracterización de los clones obtenidos

Después del periodo de crecimiento se pudo discernir con facilidad entre las colonias que han integrado el vector con el inserto de las que no. Aquellas que no han integrado el gen de interés (en este caso *tpi*) serán Lac + ya que la secuencia *Lac Z* no se habrá visto interrumpida por el gen. Estas bacterias utilizan la lactosa del medio, generando una acidez que se verá reflejada en una coloración rosada. Las bacterias que han sido transformadas correctamente (Lac -), no tienen el gen de la beta lactamasa, impidiendo así la hidrólisis de lactosa. En lugar de utilizar la lactosa como fuente de energía, utilizarán peptona también presente en el medio. La peptona da lugar a amoniaco que aumenta el pH del medio, generando así colonias blancas o incoloras (Figura 4). Las colonias blancas se seleccionaron e inocularon en una nueva placa de agar McConkey + Amp (cada una de forma individual) que se incubó a 37°C durante 24 h.

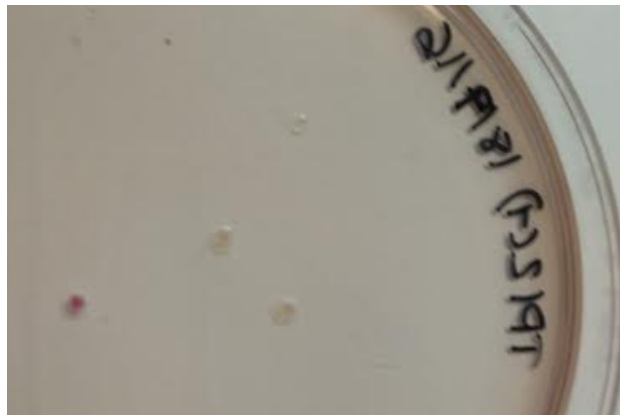


Figura 4: Caracterización visual de las colonias transformadas con el vector pGEM®-T Easy Vector que ha integrado el inserto con el gen *tpi*. Las colonias blancas (Lac -) corresponden con aquellas que han sido transformadas correctamente siendo las rosadas Lac +, estas han integrado un vector que no ha integrado el gen *tpi*.

4.8 PCR de colonia

A partir de la placa donde crecieron las colonias seleccionadas como positivas, se escogieron aquellas que seguían presentando una coloración blanquecina para su posterior análisis.

Cada una de las colonias se resuspendió en 50 μ L de agua destilada estéril un tubo eppendorf de 200 μ L. Las células se hirvieron a 100 °C durante 10 minutos, centrifugando suavemente para que las células se depositen, y utilizar así el sobrenadante que contiene el ADN. En un tubo eppendorf de 200 μ L se añadieron 25 μ L de esta solución junto con otros 25 μ L de la mezcla de reacción de PCR cuya composición se detalla en la tabla 4.

Tabla 4: Reactivos y volumen correspondientes a la reacción de amplificación del inserto M13

Reactivo	Volumen (μ L)
Buffer 10x	5
Cl ₂ Mg (100 mM)	1,25
dNTPs (25 mM)	0,5
Cebador directo(5 μ M)	5
Cebador inverso (5 μ M)	5
Taq Go	0,3
H ₂ O	8,25
ADN	25

El vector dispone, a ambos lados del inserto, de dos lugares cuya secuencia se puede utilizar como cebador para la secuenciación. Dichos lugares se denominan pUC/M13 y la secuencia correspondiente a los cebadores es la siguiente:

- pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site 161-177
- pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site 2941-2957

La reacción se llevó a cabo en tubos de 200 μ l para PCR en los termocicladores MiniCycler™ MJ Research y Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler. El programa usado

consistía en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación de 40 s a 94°C, 40 s a 50°C y 1,5 min a 72°C y por último una extensión final a 72°C durante 10 min. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa para confirmar la presencia del amplicón. Finalmente, se realizó de nuevo el protocolo de purificación de ADN descrito en el apartado 4.6 y se envió a secuenciar el producto de ADN purificado que se obtuvo.

4.9 Secuenciación

Las secuencias obtenidas fueron enviadas al CAGT (Centro de secuenciación y análisis genéticos de Zaragoza) donde fueron sometidas a secuenciación directa en ambas direcciones. Las secuencias se analizaron con el programa BioEdit v7.2.5 y se compararon con las secuencias registradas en el GenBank utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool del National Center for Biotechnology Information, NCBI). Además, después del análisis las secuencias fueron registradas en la plataforma GenBank cuyos números de acceso son los siguientes: KX668286- KX668287- KX668288- KX668289- KX668290- KX668290- KX668291- KX668292- KX668293- KX668294-KX668295- KX668296- KX668297- KX668298- KX668299- KX668300- KX668301- KX668302- KX668303- KX668304- KX668305- KX668306- KX668307- KX668308- KX668309- KX668310- KX668311- KX668312- KX668313- KX668314- KX668315- KX668316- KX668317- KX668318- KX668319- KX668320- KX668321- KX668322- KX668323- KX668324- KX668325- KX668326- KX668327- KX668328- KX668329- KX668330- KX668331- KX668331- KX668332- KX668333- KX668334- KX668335- KX668336- KX668337- KX668338- KX668339- KX668340- KX668341- KX668342- KX668343- KX668344- KX668345- KX668346- KX668347- BKX668348- KX668349- KX668350- KX668351- KX668352- KX668353- KX668354- KX668355- KX668356- KX668357- KX668358- KX668359- KX668360- KX668361.

4.10 Análisis de las secuencias

A partir de las secuencias obtenidas con BioEdit v7.2.5, se realizó un análisis de la diversidad genética utilizando DnaSP versión 5.0 (<http://www.ub.edu/dnasp/>). Gracias a este programa se calcularon tres medidas de la diversidad nucleotídica por sitio (π , θ y k). Estas medidas siguen las premisas del Modelo mutacional de sitios infinitos (Kimura, 1983), en el que el parámetro de neutralidad $\theta=4N\mu$ (donde N es el tamaño efectivo de la población y μ la tasa de mutación por nucleótido) se estima a partir del número de sitios segregantes, el parámetro π representa el número promedio de diferencias por sitio entre secuencias tomadas a pares y k simboliza el número medio de mutaciones del conjunto de secuencias. Se utilizó el programa MEGA 7.0.18 para obtener una matriz que representa las distancias filogenéticas de las secuencias para generar un árbol filogenético que se basa en el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Para la comparación estructural de las secuencias de proteínas se utilizó el programa PyMOL. Se entiende como mutación con sentido una mutación no sinónima que produce un cambio en un nucleótido, provocando la aparición de un codón que codifica para un aminoácido diferente.

5. RESULTADOS

5.1 Secuencias del gen *tpi* y β -giardina de *Giardia* de las muestras originales

Joanna Cieloszyk en su tesis doctoral obtuvo 35 secuencias del gen *tpi* de *Giardia duodenalis* procedentes de las muestras de heces correspondientes a 26 pacientes. Así mismo, obtuvo 20 secuencias del gen *bg* correspondientes a 11 pacientes. En el presente trabajo se aplicó el programa DnaSP versión 5.0 para el estudio de la variabilidad de estas secuencias.

El análisis de la matriz de identidad de las secuencias del gen de la β -giardina (figura 8, Anexo) dio lugar a la obtención de valores comprendidos entre un 100% de homología y un 93,2% mientras que en la caso del gen *tpi* la homología varía desde un 100% a un 77,4%.

La tabla 5 muestra la diversidad genética presente en *Giardia duodenalis* para genes *tpi* y β -giardina.

Tabla 5: Parámetros descriptores de la diversidad genética encontrada en las secuencias aisladas de pacientes de *Giardia duodenalis* para los genes *tpi* y β -giardina.

Locus	Nº de secuencias	Nº de haplotipos	Ss ¹	π ²	k ³	Θ ⁴	Mutaciones con sentido	Afectan al centro activo
<i>Tpi</i>	35	23	106	0,06174	24,88	0,0687	31	4
<i>B-giardina</i>	20	11	34	0,03401	14,59	0,0223	4	/ ⁵

¹Número de sitios segregantes

²Número medio de diferencias por sitio entre secuencias tomadas a pares

³Número medio de mutaciones del conjunto de secuencias

⁴ Parámetro de neutralidad

⁵Proteína con función estructural cuya estructura no ha sido resuelta

Los datos muestran una elevada divergencia entre las secuencias del gen *tpi*, en comparación con aquellas pertenecientes a la β -giardina que permanece de forma más estable. Los marcadores de divergencia genética del gen *tpi* corresponden a una elevada variabilidad. Cuatro de estas mutaciones con sentido afectan al centro activo, siendo las sustituciones de valina (no polar) a isoleucina (polar de mayor tamaño), histidina (carga positiva) a tirosina (aromático), treonina (polar) a valina (no polar) y isoleucina a valina. Es importante resaltar el hecho de que muchas de estas secuencias analizadas mostraban picos dobles o incluso múltiples en el cromatograma que dificultan la interpretación de las secuencias.

A partir de estas secuencias se construyeron dos árboles filogenéticos (figura 5) que no sólo sirven para reflejar el proceso genealógico, sino también la estructura genética de las secuencias. En los dos árboles, se observa una notable segregación entre los genotipos pertenecientes al assemblage A y aquellos pertenecientes al B, siendo este último el que aparece con mayor frecuencia. Aquellas secuencias agrupadas bajo una línea recta se asumen que son iguales. Algunas de las secuencias procedentes de muestras de un mismo paciente tomadas en días alternos (en este caso para el gen *tpi*), como es el caso de la muestra 589 y 587 pertenecientes al paciente 7, no sólo no son iguales sino que están alejadas en el árbol filogenético. Otra situación particular, es el aislamiento 563, procedente del paciente número 5, que al amplificar el gen *tpi* pertenece al Assemblage B mientras que amplificando el gen de la β -giardina pertenece al Assemblage A.

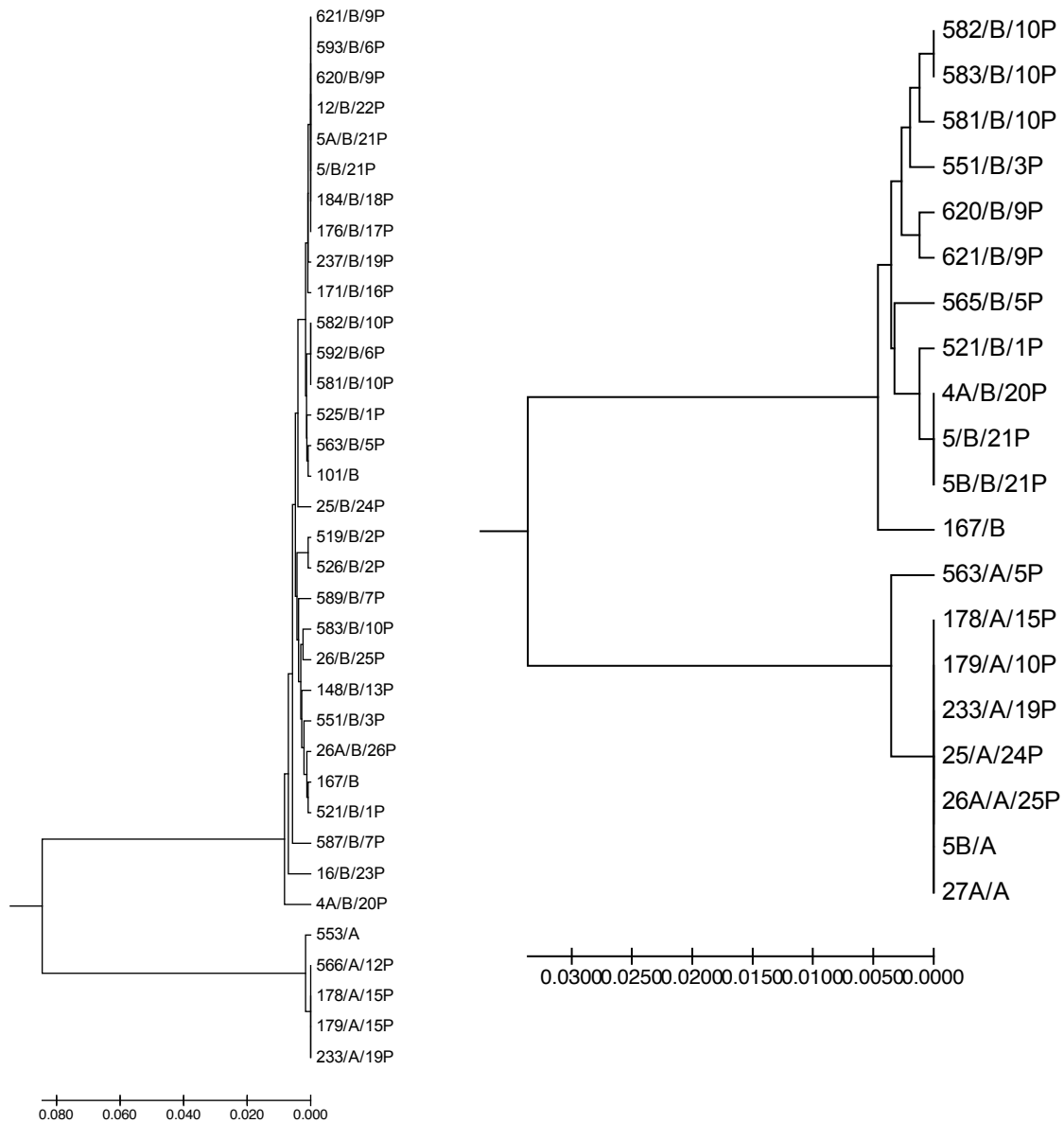


Figura 5: Árboles filogenéticos de los genes *tpi* y β -*giardina* procedentes de las muestras de los pacientes

5.2 Análisis individual del gen *tpi*

A la vista de la divergencia estructural de las secuencias que pertenecen a cada tipo de Assemblage se decidió analizar cada grupo por separado. En el caso del Assemblage A las secuencias están más conservadas y muestran una homología que oscila entre valores de un 100% a un 99,5%, todas presentan diferencias muy pequeñas. Sin embargo, al analizar el Assemblage B se observa una mayor diversidad con unos valores de homología que varían desde un 100% a un 89,1%. Existe una sustitución en el centro activo: una treonina por una histidina en el Assemblage B. Al analizar por separado los dos Assemblages (tabla 6), la diversidad genética se reduce debido a que ya no contamos como mutaciones algunos de los rasgos característicos de cada grupo. Se confirma lo observado en los árboles filogenético y las matrices, el Assemblage A está más conservado.

Tabla 6: Parámetros descriptores de la diversidad genética en las secuencias del gen *tpi* separados por Assemblages

<i>Tpi</i>	Nº secuencias	Nº de haplotipos	Ss ¹	π^2	k ³	Θ^4	Mutaciones con sentido	Afectan al centro activo
Assemblage A	5	3	3	0,00271	1,200	0,00325	1	No
Assemblage B	30	21	38	0,01236	4,981	0,02443	16	1

¹Número de sitios segregantes

²Número medio de diferencias por sitio entre secuencias tomadas a pares

³Número medio de mutaciones del conjunto de secuencias

⁴ Parámetro de neutralidad

5.3 Análisis por pacientes del gen *tpi*

Para una mejor comprensión de la divergencia genética de los clones obtenidos, se decidió analizar esta misma diversidad para cada paciente en el caso de que se hayan podido tomar al menos 2 muestras (tabla 7). Los estimadores de diversidad genética confirman la alta variabilidad existente en las secuencias del gen *tpi* ya que, sin encontrar siquiera secuencias homólogas entre muestras del mismo paciente. Merece especial atención el caso del paciente 19, cada una de las secuencias pertenece a un Assemblage diferente y la variabilidad entre las dos secuencias es notable. Entre las muestras procedentes del paciente 2 y 19 aparecen mutaciones en el centro activo. En el caso del paciente 2 se sustituye una treonina por una histidina y en el paciente 19 una isoleucina por una valina, una valina por una isoleucina y una valina por una treonina.

Tabla 7: Parámetros descriptores de la diversidad genética en las secuencias del gen *tpi* por pacientes

Paciente	Nºsecuencias	Nº haplotipos	Ss ¹	π^2	k ³	Θ^4	Mutaciones con sentido	Afectan al centro activo
1	2	2	6	0,01354	6	0,01354	3	No
2	2	2	1	0,00226	1	0,00226	1	1
5	2	2	8	0,04819	8	0,04819	2	No
6	2	2	2	0,00451	2	0,00451	0	No
7	2	2	8	0,01806	8	0,01806	1	No
9	2	1	0	0	0	0	0	No
10	3	2	6	0,00903	4	0,00903	2	No
15	2	1	0	0	0	0	0	No
19	2	2	94	0,21219	94	0,21219	19	3
21	2	1	0	0	0	0	0	No
25	2	2	3	0,00677	3	0,00677	2	No

¹Número de sitios segregantes

²Número medio de diferencias por sitio entre secuencias tomadas a pares

³Número medio de mutaciones del conjunto de secuencias

5.4 Análisis de los clones obtenidos

A la vista de esta gran variabilidad genética encontrada en el gen *tpi*, se decidió hacer un estudio más específico a partir de las muestras de un solo paciente (paciente 1). Partiendo del supuesto de que los aislamientos excretados por el mismo paciente deberían ser idénticos o presentar una alta homología, se tomaron las dos muestras del paciente 1 (521 y 525) tomadas en días alternos que, a la vista de los datos obtenidos son muy divergentes e incluso están alejadas la una de la otra en el árbol filogenético (figura 5) y se procedió a su clonación. Con ello se pretende el estudio de las poblaciones que dan lugar a los cromatogramas con picos múltiples en esas muestras. Se seleccionaron 10 clones de cada muestra, conteniendo el fragmento del gen *tpi*, que fueron secuenciados y posteriormente analizados. Dichas secuencias y sus polimorfismos se encuentran en el Anexo, figura 9. La matriz de homología de los clones proporciona valores entre un 100% y un 96,1% de homología. Para el caso de los clones de la muestra 521, la identidad oscila entre el 99,7% al 97,1%, no hay dos secuencias que sean idénticas entre sí. En el caso de los clones de la muestra 525 la homología de las secuencias oscila entre un 100% y un 96,4%.

Contrariamente a lo esperado, el análisis de sus secuencias (tabla 8) presenta una elevada variabilidad. El árbol filogenético (figura 6) nos proporciona información sobre la estructura y la distancia que hay entre los clones. Al analizar los clones obtenidos a partir de las dos muestras del paciente 1 (521 y 525), aparecen dos tipos de sustituciones en el centro activo: una treonina por una tirosina y una glicina por una valina.

Tabla 8: Parámetros descriptores de la diversidad genética en las secuencias de los clones de las muestras 521 y 525 del gen *tpi*

Clones	Nºsecuencias	Nº haplotipos	Ss ₁	π^2	k ³	Θ^4	Mutaciones con sentido	Afectan al centro activo
521 y 525	20	18	41	0,01299	6,378	0,02354	20	2
521 y 525 más secuencias consenso	22	20	41	0,01273	6,238	0,02295	20	2
521	10	10	24	0,01426	7,0	0,01728	8	1
521 y secuencia consenso	11	11	25	0,01348	6,618	0,01738	9	1
525	10	9	24	0,01020	5,111	0,01693	12	1
525 y secuencia consenso	11	10	28	0,01105	5,345	0,01912	16	1

¹Número de sitios segregantes

²Número medio de diferencias por sitio entre secuencias tomadas a pares

³Número medio de mutaciones del conjunto de secuencias

⁴ Parámetro de neutralidad

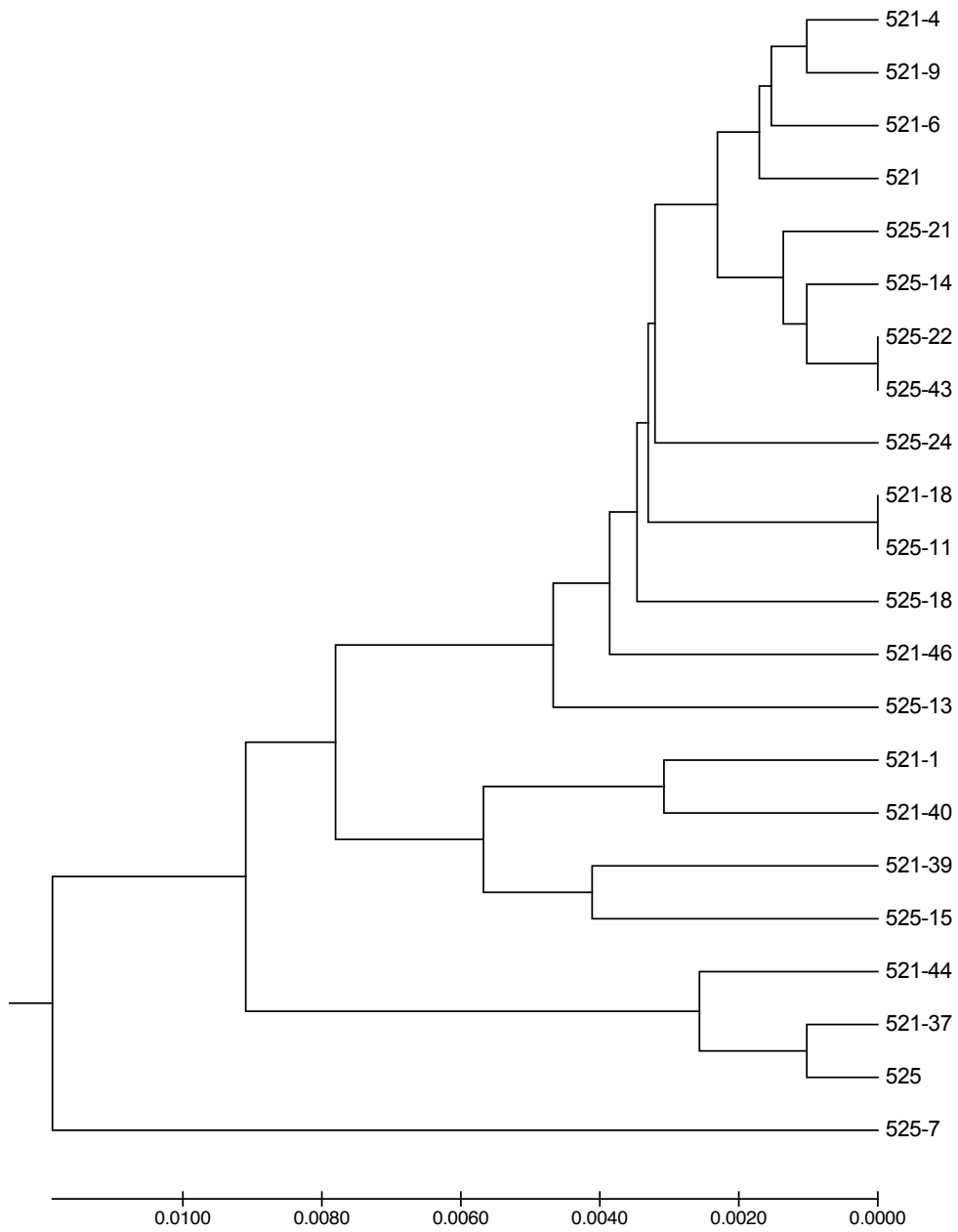


Figura 6: Árbol filogenético de los clones de las muestras 521 y 525 con sus respectivas secuencias consenso

6. DISCUSIÓN

Los genes *tpi* y β -*giardina* han sido utilizados desde el inicio de la epidemiología molecular para la genotipificación de *Giardia*, por la presencia de polimorfismos que han permitido ir agrupando los aislamientos. La genotipificación de los aislamientos es de suma importancia para el conocimiento y control de las vías de transmisión de la enfermedad. A causa de la alta variabilidad del gen *tpi* y las discordancias encontradas en muchos trabajos (Alonso *et al.*, 2010; Bonhomme *et al.*, 2011; Cieloszyk, 2016) es necesario establecer unos criterios de identidad en las secuencias que permita relacionar unos aislamientos con otros, estableciendo así una correcta relación entre el genotipo y el tipo de infección que permitiría progresar hacia un mejor tratamiento de la enfermedad. El análisis de la diversidad genética de las secuencias mostró una elevada variabilidad (tabla 5). En el caso del gen *tpi*, los 35 aislamientos estudiados presentan 23 genotipos diferentes y unos valores de π , k y Θ que se identifican con una gran cantidad de polimorfismos incluso entre las muestras que provienen del mismo paciente. Sin embargo, el gen de la β -*giardina* aparece más conservado y sus valores de diversidad genética son aproximadamente la mitad de lo que se encuentra para el gen *tpi*.

Las mutaciones registradas (sustituciones, deleciones o inserciones) generan en gran medida mutaciones que producen a su vez cambios en la secuencia aminoacídica de la enzima, incluso cambios por aminoácidos muy dispares que podría influir directamente en la actividad enzimática. La mayor parte de las mutaciones no ocurren en el centro activo, pero estas últimas podrían marcar una diferencia en la actividad catalítica, parámetro a tener en cuenta dado que la triosa fosfato isomerasa es objeto de estudio como posible diana farmacológica (Thompson *et al.*, 2015).

El estudio filogenético muestra una clara división entre los dos grupos principales (Assemblage A y B). Dentro de cada grupo se observa una estructura genética dispar, las secuencias muestran un alto grado de divergencia, incluso aquellas que proceden del mismo paciente. El estudio filogenético apoya las conclusiones de una alta diversidad genética. Como ya se ha mencionado en los resultados, existe un caso especialmente significativo en el que al analizar la muestra para el gen de la β -*giardina* el genotipo corresponde al Assemblage A mientras que si se analiza el gen *tpi* pertenece al Assemblage B. Estos resultados evidencian que, al menos uno de los genes no es un adecuado marcador para el estudio epidemiológico de *Giardia duodenalis*, ya que los resultados de todos los marcadores deberían dar idénticos genotipos. Sin embargo es posible que, ante una mezcla de genotipos, cada PCR amplifique prioritariamente a uno de ellos y de allí la divergencia de resultados.

Como ya se ha nombrado anteriormente el gen de la β -*giardina* presenta una alta conservación genética por lo que el estudio se orientó hacia el análisis del gen *tpi* y su elevada variabilidad, considerando además el hecho de que se decidió estudiar más el gen *tpi* por su variabilidad y el hecho de que otros autores ya han registrado problemas con la genotipificación a partir de este gen (Bonhomme *et al.*, 2011).

A la vista de la marcada separación en la estructura genética que existe entre el Assemblage A y el B se comenzó estudiando los dos grupos por separado. El análisis del Assemblage A confirmó lo observado en el árbol filogenético (figura 5), presenta una estructura más conservada y una menor variabilidad que el Assemblage B que es el que aparece con mayor frecuencia entre los pacientes.

Para completo entendimiento de la distribución que de la variabilidad en las secuencias, estas se analizaron tomando los marcadores de diversidad para cada paciente. Como se observa en la tabla 7 son pocos los pacientes cuyas muestras son idénticas (3 de 11) incluso en uno de los casos las dos muestras no son ni tan siquiera similares (paciente 19).

La elevada variabilidad del gen *tpi* supone un problema para la correcta genotipificación de *Giardia duodenalis*. Los datos conseguidos no son fiables y el diagnóstico asociado al mismo no es preciso. Es significativa la presencia de picos múltiples en los cromatogramas que se obtienen, indicando la posible presencia de una mezcla de subgenotipos. Para estudiar más a fondo esta cuestión, se decidió utilizar las dos muestras (521 y 525) de un solo paciente (paciente 1) para su posterior secuenciación. Estas secuencias fueron analizadas en el apartado 5.4. Todas las secuencias del paciente 1 pertenecen al Assemblage B pero la divergencia encontrada sigue siendo muy alta, como se observa en el árbol filogenético de los clones (figura 6) apenas cuatro de las veinte secuencias estudiadas son idénticas a pares entre sí. La secuencia consenso en ambos casos es la que más se aleja del resto, tanto la 521 como la 525, pues es la secuencia que integra al resto y la que presenta mayor número de picos múltiples; si observamos los indicadores de la diversidad genética cuando la incluimos en los análisis la diversidad aumenta. Sin incluir las secuencias consenso, la diversidad genética sigue siendo alta, encontrándose un resultado discordante con lo esperado.

Diferentes premisas, que ya fueron nombradas en la introducción, existen a cerca del por qué de las dificultades que aparecen al secuenciar el gen *tpi*. Entre ellas están la presencia de infecciones mixtas (Sprong *et al.*, 2009), la posibilidad de una reproducción sexual (Cooper *et al.*, 2007) o directamente la imposibilidad de utilizar el gen *tpi* como marcador. Los resultados obtenidos ratifican la presencia de infecciones mixtas, tanto en datos analizados con el gen *tpi* como en aquéllos en los que se utilizó el gen de la β -*giardina*. Este estudio ratifica la existencia de infecciones mixtas de forma habitual entre la giardiosis. Entre la literatura encontrada se asume ya como un hecho la factibilidad de este fenómeno, no solo se dice que es posible sino que es lo más común en las infecciones provocadas por el parásito (Riviera-Jacinto *et al.*, 2008).

Los resultados apuntan a la imposibilidad de usar *tpi* como un marcador fiable en la genotipificación de *Giardcies* demasiado variable como para establecer a partir de su análisis la clasificación de la especie. Induce a errores y no concuerda con el resto de marcadores utilizados (en este caso solo comparamos con el gen β -*giardina*).

7. FUTURAS RECOMENDACIONES

Para confirmar definitivamente la imposibilidad de usar el gen *tpi* como marcador genético para *Giardia duodenalis*, sería necesario establecer un estudio más amplio analizando a la vez todos los marcadores utilizados de forma más común en la genotipificación de *Giardia* y así comprobar la coincidencia entre ellos. En un futuro, es preciso estudiar si una posible reproducción sexual es la causante de la variabilidad del gen *tpi*.

8. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

En este trabajo se ha estudiado la variabilidad asociada al marcador genético *tpi* utilizado comúnmente para la tipificación de *Giardia duodenalis*. A partir de los resultados del análisis genético se obtienen las siguientes conclusiones:

1. El gen *tpi* muestra demasiada variabilidad como para poder ser usado como marcador genético para la tipificación de la especie, dado que esta variabilidad no permite establecer los criterios que determinen la relación genética entre aislamientos.
2. Las infecciones mixtas de *Giardia duodenalis* ocurren de forma común e incluso predominan entre los tipos de infecciones del parásito, habiendo encontrado un elevado número de subgenotipos en cada muestra.

In this study, the variability associated with the genetic marker tpi , used for the typification of Giardia duodenalis, has been analyzed. From the results of the genetic analysis, the following conclusions are obtained:

1. *The tpi gene shows too much variability to be able to be used as a genetic marker for the genotyping of the species. Such variability doesn't allow to establish the criteria that determines the genetic relation between the samples.*
2. *Mixed infections of Giardia duodenalis usually occur, a high number of sub genotypes have been found in each sample. Actually they prevail among the other types of infections.*

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adam RD (1991). The biology of *Giardia* sp. *Microbial Rev* 55(4): 706-732.
- Alonso JL., Amoros I, Cuesta G. (2010). LNA probes in a real-time TaqMan PCR assay for genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewaters. *J. Appl. Microbiol.* 108:1594-1601.
- Boucher SEM, Gillin FD (1990). Excystation of in vitro-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infect Immun.* 58: 3516- 3522.
- Breathnach AS, McHugh T, Butcher PD(2010). Prevalence and clinical correlations of genetic subtypes of *Giardia lamblia* in an urban setting. *Epidemiol. Infect.* 138:1459-1467.
- Buchel LA, Gorenflot A, Chochillon C, Savel J, Gubert JG (1987). In vitro excystation of *Giardia* from humans: a scanning electron microscopy study. *J Parasitol.* 73: 487-493.
- Cacciò SM, Sprong H (2010). *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implication taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol*, 124(1): 107-112.
- Cieloszyk J (2016). Caracterización molecular de especies, genotipos y subtipos de *Cryptosporidium* spp. aislados en humanos en España e identificación de *Giardia duodenalis* por técnicas moleculares. *Tesis doctoral*.
- Clavel A, Castillo FJ, Rubio MC, Gómez-Lus R (1990). Giardiasis. En: Cisterna JR, director. *Plan de formación de enfermedades infecciosas: Infecciones gastrointestinales*. Modulo V. Madrid: Glaxo, p 123-130.
- Cooper MA, Adam RD, Worobey M, Sterling CR (2007). Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. *Curr Biol.* 20;17(22):1984-8.
- Dobell C (1920). The discovery of intestinal protozoa of man. *Proc R Soc Med* 13 : 1-15.
- De Las Casas C, Adachi J, Dupont H (1999). Review article: travellers' diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* 13: 1373–1378.
- De Lucio A, Martínez-Ruiz R, Merino FJ, Bailo B, Aguilera M, Fuentes I (2015). Molecular genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from symptomatic individuals attending two major public hospitals in Madrid, Spain. *PLoS One*, 10 , p. e0143981.
- Duncombe VM, Bolin TD, Davis AE, Cummins AG, Crouch RL (1978). Histopathology in giardiasis: a correlation with diarrhoea. *Aust N Z J Med* ;8:392-6.
- Ekdahl K, Anderson Y (2005). Imported giardiasis: Impact of the international travel, immigration, and adoption. *Am J Trop Med Hyg.* 72: 825-830.
- Farthing MJG, Michael JG (1997). The molecular pathogenesis of giardiasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 24, 1: 79-88.
- Feng Y, Xia L (2011) Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 24(1): 110-140.
- Forona P, Bargues MD, Abreu-Acosta N, Periafo MV, Valero MA, Valladares B, Mas-Coma S (2008). Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. *Parasitos Res* 103: 1177-1181.
- Fraser, D., Bilenko N, Deckelbaum RJ, Dagan R, el-On J, and Naggan L (2000). *Giardia lamblia* carriage in Israeli Bedouin infants: risk factors and consequences. *Clin. Infect. Dis.* 30:419–424.
- Hotez, P.J., Bottazzi, M.E., Strych U, Chang, L.Y, Lim YAL., Goodenow MM., AbuBakar S. (2015). Neglected tropical diseases among the Association of

- Southeast Asian Nations (ASEAN): overview and update. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (4), e0003575.
- Bonhomme J, Le Goff L, Lemée V, Gargala G, Ballet JJ, Favennec J (2011). Limitations of *tpi* and *bg* genes sub-genotyping for characterization of human *Giardia duodenalis* isolates. *Parasitol. Int.*, 60 (2011), pp. 327–330.
 - Katelaris PH, Farthing MJG (1992). Diarrhoea and malabsorption in giardiasis: a multifactorial process. *Gut* ;33:295-7.
 - Kimura, M. (1983) The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge, England.
 - Mateo M, Mateo M, Montoya A, Bailo B, Saugar JM, Aguilera M, Fuentes I, Carmena D (2014). Detection and Molecular Characterization of *Giardia duodenalis* in Children Attending Day Care Centers in Majadahonda, Madrid, Central Spain. *Watkins. R, ed. Medicine*;93(15).
 - Plutzer J, Ongerth J, Karanis P (2010) *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and one questions. *Int J of Hyg and Environ Health* 213 (5): 321-333.
 - Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, Delbac F, El Alaoui H (2012). New Insights into *Blastocystis* spp.: A Potencial Link with Irritable Bowel Syndrome *PLoS Pathog* 8(3): e1002545.
 - Ramesh M.A., Malik SB., Logsdon JM (2005). A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Current Biology* 15, 185–191.
 - Rendtorff RC (1954). The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia Lamblia* cysts given in capsules. *Am J Hyg* 59 (2): 209-220.
 - Riviera-Jaciento M, López-Orbegoso J, Rodríguez-Ulloa C (2008). Enteroparasitosis infantil en guarderías de la zona rural de Cajamarca. *Rev. perú. med.exp.salud publica* v.25 n.4.
 - Rodney DA (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* vol. 14 no. 3, 447-475.
 - Sahagún P, 2006. Caracterización molecular de *Giardia duodenalis* en humanos y correlación de los genotipos aislados con la sintomatología. *Tesis doctoral*.
 - Sprong H., Caccio SM and van der Giessen JW (2009). Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3:e558.
 - Stevens PD (1985). Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing World. XIX. Giardiasis. *Rev Infect Dis.* 7:530-535.
 - Tellez A., Morales W, Rivera T, Meyer E, Leiva B, Linder E (1997). Prevalence of intestinal parasites in the human population of Leon, Nicaragua. *Acta Trop* 66: 119-125.
 - Teodorovic S., Braverman JM, Elmendorf HG (2007). Unusually low levels of genetic variation among *Giardia lamblia* isolates. *Eukaryot. Cell* 6:1421-1430.
 - Thompson TCA, Hopkins RM, Homan WI (2000). Nomenclature and Genetic Grouping of *Giardia* Infecting Mammals. *Parasitol Today.* 16:210-213.
 - Thompson RCA, Reynoldson JA, Mendis AHW (1993). *Giardia* and giardiasis. *Adv Parasitol*, 32, pp. 71–160.
 - Torres-Romero JC, Euan-Canto AJ, Benito-González N, Padilla-MONTaño N, Huchin-Chan C, Lara-Riegos J, Cedillo-Rivera R (2014). Intestinal parasites and genotyping of *Giardia duodenalis* in children: first report of genotype B in isolates from human clinical samples in Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 109(3): 388-390
 - WHO. The World Health Report (1996). Fighting Disease Fostering Development . World Health Organization, Geneva.

- Wright SG, Tomkins AM, Ridley DS (1977). Giardiasis: clinical and therapeutic aspects. *Gut* ;18:343-50.
- Yardley JH, Takano J, Hendrix TR (1964). Epithelial and other mucosal lesions of the jejunum in giardiasis. Jejunal biopsy studies. *Bull J Hopkins Hosp* ;115:389-406.