



Modelamiento proteico de la Tubulina de *G. lamblia* por homología de secuencias

Protein modeling of *G. Lamblia* Tubulin through sequence homology

GRADOS TORREZ, RICARDO ENRIQUE¹

FECHA DE RECEPCIÓN: 13 DE MARZO DE 2019

FECHA DE ACEPTACIÓN: 19 DE ABRIL DE 2019

Resumen

La Giardiasis ocasionada por *Giardia intestinalis* (conocida como *Giardia lamblia*), es una de las infecciones parasíticas más comunes en todo el mundo y con mayor prevalencia en países en desarrollo como el nuestro. Existen muchas drogas para el tratamiento de la giardiasis, de diferente eficacia y efectos adversos como la curcumina que inhibe la polimerización de los microtubulos por un mecanismo distinto al de la colchicina. Sin embargo, la estructura cristalográfica de la Tubulina de *G. lamblia* (cadenas α y β) permanece desconocida. El análisis de alineamiento de secuencias (PBLAST) indica una identidad del 86,98 y 88,32 % entre las cadenas α y β de la Tubulina de *G. lamblia* y *B. taurus* (PDB:5NQT). El Modelamiento por Homología de la estructura proteica de la Tubulina de *G. lamblia* utili-

Abstract

Giardiasis caused by *Giardia intestinalis* (known as *Giardia lamblia*), is one of the most common parasitic infections in the world and with a higher prevalence in developing countries like ours. There are many drugs for the treatment of giardiasis, of different efficacy and adverse effects such as curcumin that inhibits the polymerization of microtubules by a mechanism other than colchicine. However, the crystallographic structure of *G. lamblia* Tubulin (α and β chains) remains unknown. The sequence alignment analysis (PBLAST) indicates an identity of 86,98 and 88,32 % between the α and β chains of the Tubulin of *G. lamblia* and *B. taurus* (PDB: 5NQT). Homologous Modeling of the protein structure of *G. lamblia* Tubulin using the *B. taurus* Tubulin as a template employing the SWISS-MODEL server,

Laboratorio de Farmacología, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (I.I.F.B.) "Luis Enrique Terrazas Siles". Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra 2224. La Paz, Bolivia.
E-mail: ergrados@hotmail.com

zando como molde a la Tubulina de *B. taurus* mediante el servidor SWISS-MODEL, generó una estructura proteica con los siguientes parámetros: z-core = -1,16 y -1,41, QMEANscore6 = 0,71 y 0,70, % de confiabilidad (de los diagramas de Ramachandran) = 96,08 y 96,95 %, RMS (Root Mean Square) = 0,081 y MOLPROBITYscore = 1,26. Estos parámetros indican que la estructura proteica de la Tubulina de *G. lamblia* obtenida a partir del Modelamiento por Homología es de buena calidad, por tanto, esta estructura podría ser utilizada en futuras evaluaciones, como el análisis *in silico* de compuestos antiGiardia.

PALABRAS CLAVE

Modelamiento Proteico, Tubulina, *Giardia lamblia*, Homología de Secuencias.

generated a protein structure with the following parameters: z-core = -1,16 and -1,41, QMEANscore6 = 0,71 and 0,70, % of reliability (from Ramachandran plots) = 96,08 y 96,95 %, RMS (Root Mean Square) = 0,081 and MOLPROBITYscore = 1,26. These parameters indicate that the protein structure of *G. lamblia* Tubulin obtained from Homology Modeling is of good quality, therefore, this structure could be used in further evaluations, such as the *in silico* analysis of anti-Giardia compounds.

KEY WORDS

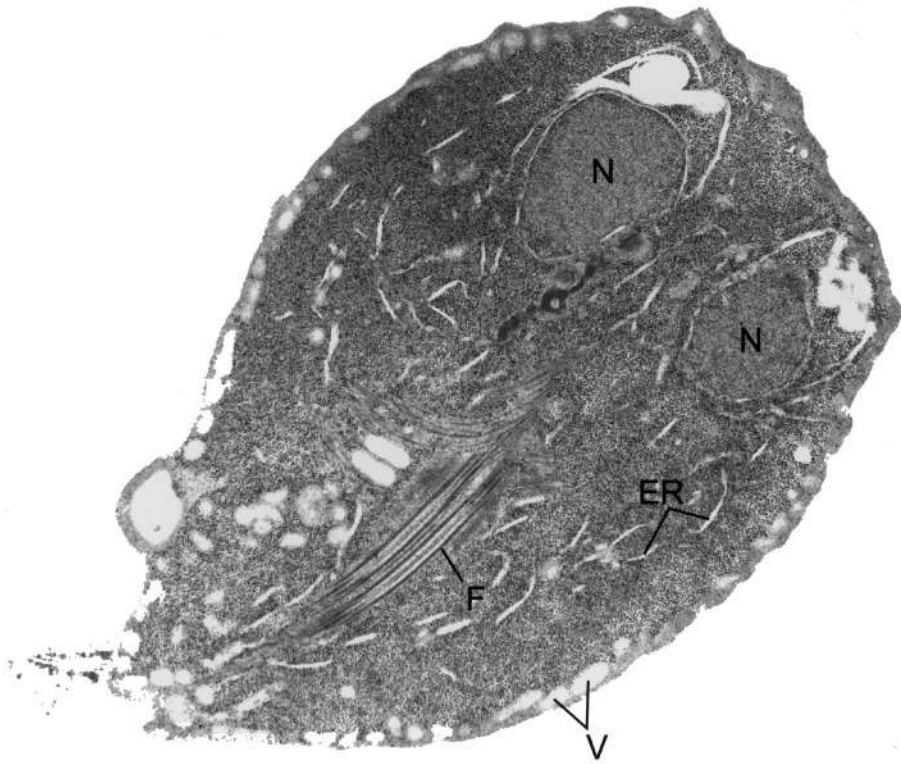
Protein Modeling, Tubulin, *Giardia lamblia*, Sequence Homology.

INTRODUCCIÓN

La Giardiasis es una de las infecciones parasíticas más comunes en todo el mundo y con mayor prevalencia en países en desarrollo como el nuestro (Koehler *et al.*, 2013 y Almirall *et al.*, 2013). Esta infección es ocasionada por *Giardia intestinalis* (conocido también como *Giardia lamblia*), que es un protozooario, flagelado de simetría bilateral, extracelular, anaerobio, binucleado y piriforme (Adam, 2001) (Figura 1). Se estima que cerca de 200 millones de personas se infectan anualmente por *G. lamblia* en Asia, África y América Latina (Alparo, 2005).

Existen muchas drogas para el tratamiento de la parasitosis, de diferente eficacia y efectos adversos (Lalle, 2010; Gardner y Hill, 2001; Granados *et al.*, 2012). En la búsqueda de nuevas terapias anti giardiales, varias sustancias naturales han sido evaluadas (Freitas *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2010 y Rufino-Gonzalez *et al.*, 2012). Los curcuminoides presentes en la cúrcuma han sido utilizados para el tratamiento de diferentes patologías (Araujo y Leon, 2001; Aggarwal *et al.*, 2007). La curcumina, uno de los principales componentes bioactivos de las rizomas de la cúrcuma, posee un amplio rango de propiedades farmacológicas incluyendo actividades antioxidantes e antiinflamatorias (Aggarwal *et al.*, 2007; Araujo y Leon, 2001; Cheng *et al.*, 2001; Padilla *et al.*, 2013). Muchos estudios han reportado el efecto antiparasitario de la curcumina contra *Leishmania spp.*, *Cryptosporidium parvum*, *Plasmodium falciparum*, *Giardia Lamblia* y otros. En modelos animales infectados con *G. lamblia*, la curcumina produce una considerable disminución en el número de trofozoitos en secciones intestinales (Said *et al.*, 2012). Otros estudios demostraron que la curcumina inhibe la polimerización de los mi-

Figura 1. Sección transversal de un Trofozoito de *G. lamblia*. Núcleo (N), Flagelo (F), Vacuolas (V) y Retículo Endoplasmático (ER) (Extraído de Adam, 2001).



crotubulos por un mecanismo distinto al de la colchicina (Gupta *et al.*, 2006). Además, Chakraborti *et al.* (2011) determinó experimentalmente (mediante la técnica de *Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET*) que el sitio de unión de la curcumina se encuentra alrededor de 32Å lejos del sitio de unión de la colchicina pero cerca del sitio de unión de la vinblastina.

El citoesqueleto de *G. lamblia*, constituido principalmente por filamentos de actina, microtúbulos (Tubulina alfa y beta) y proteínas conocidas como giardinas, ha sido ampliamente estudiado por métodos como la inmunofluorescencia (Matadamas-Martínez e Iglesias-Osores, 2018). Sin embargo, la estructura cristalográfica de la Tubulina de *G. lamblia* (cadenas α y β) permanece desconocida. El análisis cristalográfico constituye un paso importante para poder dilucidar y evaluar el sitio de unión de posibles moléculas antiparasitarias como la curcumina y otros derivados de interés terapéutico.

En estudios realizados por Gutierrez-Gutierrez *et al.* (2017), utilizaron el Modelamiento de proteínas por Homología como método *in silico* para obtener un modelo estructural de la Tubulina de *G. lamblia* a partir de su secuencia de aminoácidos, utilizando como molde a la estructura cristalográfica de la Tubulina de *Bos taurus* (PDB:1SA0; resolución = 3,58 Å) almacenada en la base de datos *Protein Data Bank* (PDB) (Ravelli *et al.*, 2004). No obstan-

te, en estudios recientes (Weirnet *et al.*, 2017) se pudo obtener la estructura cristalográfica de la Tubulina de *B. taurus* con mejor resolución (PDB:5NQT; resolución = 2,15 Å) mediante una técnica más sofisticada, basada en la cristalografía serial en milisegundos utilizando una fuente de luz sincrotrón a temperatura ambiente. El presente trabajo se enfoca en realizar el Modelamiento por Homología de la estructura proteica de la Tubulina de *G. lamblia* utilizando como molde a la Tubulina de *B. taurus* con mejor resolución (PDB:5NQT) mediante el servidor SWISS-MODEL.

MATERIALES Y MÉTODO

Ya que en la actualidad, la estructura cristalográfica de la Tubulina de *G. lamblia* no se encuentra disponible, las estructuras tridimensionales de la Tubulina α y β fueron construidas por el principio de Modelamiento por Homología.

La secuencia de aminoácidos de la Tubulina- α (GenBank número de acceso ESU39295.1) (Adam *et al.*, 2013) y la Tubulina- β (GenBank número de acceso EDO79714.1) (Kirk-Mason *et al.*, 1988) de *Giardia lamblia*, fueron utilizadas para análisis de alineamiento de secuencias mediante *Protein Basic Local Alignment Search Tool – NCBI - NIH* (PBLAST) con la secuencia de la Tubulina de *B. taurus* (5NQT_A y 5NQT_B, respectivamente) para determinar el porcentaje de similitud entre ambas e inferir el grado de homología.

En este estudio, llevamos a cabo el proceso de Modelamiento por Homología con el servidor SWISS-MODEL (Biasini *et al.*, 2014). Se empleó la estructura cristalográfica de la Tubulina de *B. taurus* (PDB:5NQT) (Weirnet *et al.*, 2017) como molde. Ambos modelos monoméricos obtenidos (α y β) fueron evaluados individualmente según el QMEANscore6 (Benkert *et al.*, 2009 y 2011) para obtener una estimación de la calidad global y local de los modelos. Se obtuvieron los diagramas de Ramachandran correspondientes a cada cadena (α y β) para determinar el % de confiabilidad basado en el número de residuos que ocupan regiones favorecidas y el número de residuos con valores atípicos; mientras que, la calidad de la geometría del modelo proteico final fue analizada utilizando el servidor MOLPROBITY (Chen *et al.*, 2010).

Finalmente se realizó el alineamiento estructural entre la estructura final de la Tubulina de *G. lamblia* obtenida por modelamiento y la estructura de la Tubulina de *B. taurus* (PDB:5NQT; molde) con el programa PyMol para evaluar la calidad de las posiciones atómicas entre ambas estructuras.

RESULTADOS

Alineamiento de secuencias (PBLAST)

Tubulina- α .

El análisis del alineamiento de secuencias entre las cadenas α de la tubulina de *G. intestinalis* y *B. Taurus* mediante PBLAST, indica una identidad del



86,98 %. El E-value es tan bajo que descarta el azar en el número de aciertos tras el alineamiento entre ambas secuencias (Figura 2).

Figura 2. Alineamiento de secuencias (Pblast). Query: Cadena- α Tubulina *G. intestinalis* (ESU39295.1). Sbjct: Cadena- α Tubulina *B. Taurus* (5NQT_A). E-value = <1-e19; ID: 86,98 %.

```

Query 58  MRECISVHIGQAGVQIGNACHELYCLEHGSIQHDGQMP SDKITGGGDDAFNTFFSETGAGK 117
Sbjct 1    .....I.V.....P.....S..... 60

Query 118 HVPRAVFDLEPTVVDEVRAGSYRQLYHPEQLISGKEDAAINNYARGHYTIGKEIVDLVLD 177
Sbjct 61  .....I...T.T...F...T.....I..... 120

Query 178  RVRKLDANCSGLQGF LIFHSFGGGTGAGFGSLFLERLSVDYGRKSKLEFVVYPSQIATA 237
Sbjct 121  ..I.....Q.T.....V.....S..T..LM.....K.....SI..A..VS.. 180

Query 238  VVEPYNTILAAHSMLEHSDCAFNVNDNEAMYDICRRNLDIERTPTYNLNLRLIAQCISSITA 297
Sbjct 181  .....S..TT.TT.....I.....S.IV.... 240

Query 298  SLRFDGALNVDLTFEQTNLVPYPRIHFP L C S Y A P I I S S E K A Y H E K L S V A E L T N S V F E P A N 357
Sbjct 241  .....AT...V..A...Q...I..AC.... 300

Query 358  MMVKCDPRHGKYM ACCM Y R G D V V P K D V N A A I A V I K T K R T I Q F V D M C P T G F K V G I N Y Q P P 417
Sbjct 301  Q.....LL.....T...S..... 360

Query 418  TVIPGGDLAKVQRSC LM I S N I T T A I A E V W S R M D H K F D L M Y A K R A F V H W Y V G E G M E E G F S E 477
Sbjct 361  ..V.....AVC.L.....A.A.L..... 420

Query 478  AREDLAALKDYEEIGAETL 497
Sbjct 421  ....H.....V.VDSV 440
    
```

Tubulina- β .

El análisis del alineamiento de secuencias entre las cadenas β de la tubulina de *G. lamblia* y *B. taurus* mediante PBLAST, indica una identidad del 88,32 %. El E-value es tan bajo que descarta el azar en el número de aciertos tras el alineamiento entre ambas secuencias (Figura 3).

Figura 3. Alineamiento de secuencias (PBLAST). Query: Cadena β Tubulina *G. lamblia* (ED079714.1). Sbjct: Cadena β Tubulina *B. Taurus* (5NQT_B). E-value = <1-e19; ID: 88,32 %.

```

Query 1    MREIVHIQAGCGQGNQIGAKFWEVISDEHGVDPSGEYRGDSELQIERIINIVYFNEAAGGRYV 60
Sbjct 1    .....I..T..S.H...D..L.....Y...T.NK.. 60

Query 61   PRAILVDLEPGTMDSVRAGPFQGI FRPDNFVFGQSGAGINWAKGHYTEGAELVDVLDVW 120
Sbjct 61   .....S.....S..... 120

Query 121  RKES EACDCLQGFQICHSLGGGTGAGMGTLLIAKIREEYPRMCTFSVVPSPKVSOTVW 180
Sbjct 121  .....S.....LT.....S.....S.....I.N...M..... 180

Query 181  EPYNATLSVHQLVEHADEVFCIDNEALYDICFRTLKLTCTPTYGDLNHLVSLVMSGCTSCL 240
Sbjct 181  .....NT..TY.....T.....AT...V.T.. 240

Query 241  RFPGQLNADLRKLAVNLI P P R L H F F L V G F A P L T S R G S Q I Y R A L T V P E L V S Q M F O N K I M M 300
Sbjct 241  .....MV.....MP.....Q.....TQ....S.... 300

Query 301  AASDPRHG R Y L T A A A M F R G R M S T K E V D E Q M L N I Q N K I S S Y F V E W I P I N I M K V S V C D I P P R G 360
Sbjct 301  ..C.....V..I...M.....V.....V.TA..... 360

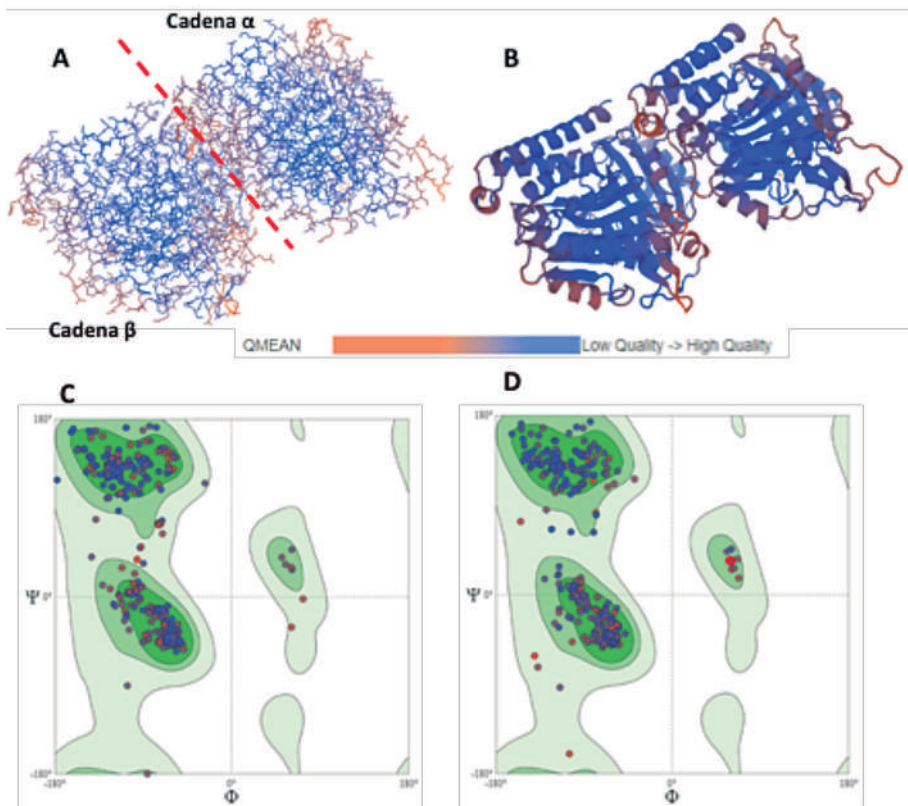
Query 361  LKMAATFIGNSTCIQELFKRVGEQFTAMFRRKAF L H W Y T G E G M D E M E F T E A E S N M D L V S 420
Sbjct 361  ...S.....A.....IS..... 420

Query 421  EYQQYQEA 428
Sbjct 421  .....D. 428
    
```

Modelamiento de la Tubulina de *G. lamblia*.

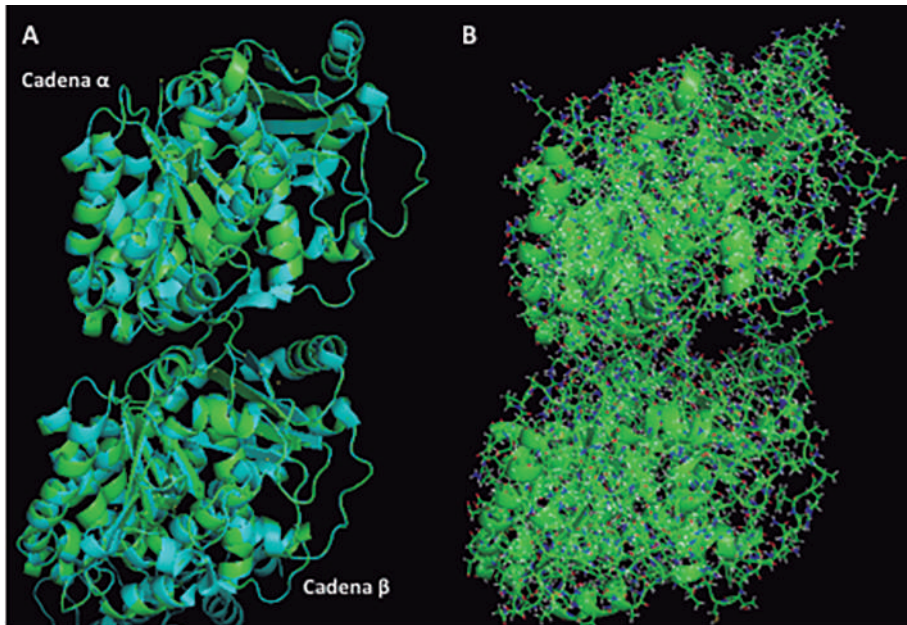
Con base en el análisis de PBLAST, se utilizó como molde estructural a la estructura cristalográfica de la Tubulina de *B. taurus* (PDB:5NQT) para modelar la estructura proteica de la Tubulina de *G. lamblia* a partir de su secuencia de aminoácidos con el servidor SWISS-MODEL (Figura 4A y B). El análisis de los diagramas de Ramachandran de los modelos de cadenas α y β de la Tubulina, indican una confiabilidad mayor al 95 % en ambas cadenas (Figura 4C y D). Adicionalmente, el Z-score (-1,16 y -1,41) y el QMEANscore6 (0,71 y 0,70) para ambas cadenas respectivamente, alcanzaron valores aceptables (Benkert *et al.*, 2008) para que este modelo estructural proteico de la Tubulina de *G. lamblia* sea adecuado en futuros estudios como el análisis de acoplamiento molecular (*Molecular Docking*).

Figura 4. Modelamiento por Homología de la Tubulina de *G. lamblia*. A. Modelo de líneas (aparecen las cadenas laterales de todos los aminoácidos). B. Modelo de cintas (aparecen las estructuras secundarias). C y D. Diagramas de Ramachandran indican una confiabilidad de 96,08 y 96,95 %, para las cadenas α y β respectivamente.



El análisis de la superposición de la estructura de la Tubulina de *G. lamblia* obtenida por modelamiento con la Tubulina de *B. taurus* utilizada como molde, muestra que la desviación cuadrática media de las posiciones atómicas entre ambas estructuras es de: RMS (*Root Mean Square*) = 0,081. Valores cercanos a 0 indican que ambas estructuras tienen una distribución espacial muy similar (Figura 5A).

Figura 5. A. Alineamiento estructural de la Tubulina de *B. taurus* (5NQT, molde celeste) con la proteína modelada de Tubulina de *G. lamblia* (verde). RMS = 0,081. B. Geometría del modelo proteico final, MolProbity score = 1,26.



Por otro lado, la estructura proteica modelada fue analizada mediante la plataforma MOLPROBITY para añadir los átomos de hidrógeno colocados en posiciones de nubes electrónicas favorecidas, así, la His118 y 396 fueron girados automáticamente para adquirir posiciones más favorables. La puntuación de *MolProbity* final obtenida fue de 1,26 (Figura 5B).

DISCUSIONES

El alineamiento de secuencias (PBLAST) de las cadenas α y β de la Tubulina de *G. lamblia* con las cadenas α y β de *Bos taurus* alcanzaron un % de identidad del 86,98 y 88,32 respectivamente, estos valores son similares a los reportados por Gutierrez-Gutierrez *et al.* (2017) (87,06 y 88,04 %). Tras el Modelamiento por Homología, se obtuvo una estructura dimérica con un esquema de colores de acuerdo al z-score basado en QMEANscore6 que es un estimador compuesto, que compara las diferentes propiedades geométricas de la

proteína, proporciona estimaciones de calidad locales (es decir, residuo por residuo) como globales (para toda la estructura) en comparación con un único modelo.

El QMEANscore6 resulta de la combinación lineal de 6 términos estadísticos potenciales: el potencial de interacción entre los átomos C β solamente, todos los átomos, el potencial de solvatación, el potencial del ángulo de torsión y dos términos de coincidencia que evalúan la consistencia de las características estructurales con predicciones basadas en secuencias. Este valor tiene un rango de 0 a 1 (siendo el 1 como ideal). La estructura proteica de la Tubulina de *G. lamblia* obtenida por modelamiento obtuvo un QMEANscore6 de 0,71 y 0,70 (para ambas cadenas) que son valores más cercanos a 1 en comparación con otros estudios (0,660 y 0,577) (Gutierrez-Gutierrez *et al.*, 2017).

Por defecto, QMEANscore6 es transformado en términos de z-scores para relacionar los puntajes obtenidos con los que esperaríamos de estructuras de rayos-x de alta resolución. El z-score representa el grado de “natividad” del modelo proteico generado, indica si el QMEANscore6 del modelo es comparable con lo que uno esperaría de estructuras experimentales de tamaño similar. Z-scores cercanos a cero indican una buena coincidencia entre la estructura obtenida por modelamiento y estructuras experimentales de tamaño similar, valores por debajo de -4,0 indican que el modelamiento fue de baja calidad. La estructura de Tubulina obtenida por modelamiento obtuvo valores globales de -1,16 y -1,41; considerados como aceptables y de mejor calidad en comparación con otros estudios (-1,275 y -2,257) (Gutierrez-Gutierrez *et al.*, 2017).

Con relación a la calidad de la geometría del modelo proteico final obtenido para la Tubulina de *G. lamblia*, la puntuación general de MOLPROBITY fue de 1,26 basado en: el análisis de la combinación de los puntajes obtenidos en la evaluación de posibles choques entre todos los átomos (número de superposiciones estéricas serias) (clashscore), el porcentaje de aminoácidos no favorecidos en los diagramas de Ramachandran y el porcentaje de rotameros de cadena lateral de mala calidad. Éste valor es menor a la resolución de la proteína cristalográfica utilizada como molde (2,15 Å), por lo tanto, una estructura con un puntaje de MOLPROBITY numéricamente menor que su resolución cristalográfica real es, en términos de calidad, mejor que la estructura promedio en esa resolución.

Todos los parámetros estructurales evaluados indican que, la estructura proteica de la Tubulina de *G. lamblia* obtenida por modelamiento con base en la homología de secuencias, es apropiada para ser utilizada (*in silico*) como posible blanco proteico. Así, se hará posible evaluar diferentes moléculas (como la curcumina y sus derivados) que hayan demostrado potencial actividad anti-giardia en ensayos clínicos o de cultivo *in vitro*.

REFERENCIAS

- Adam, R. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. Departments of Medicine and of Microbiology and Immunology, University of Arizona College of Medicine, Tucson, Arizona. Clinical Microbiology Reviews. Vol4 No. 3 p. 447-475.
- Adam, R.D., Dahlstrom, E.W., Martens, C.A., Bruno, D.P., Barbian, K.D., et al. (2013). Genome sequencing of *Giardia lamblia* genotypes A2 and B isolates (DH and GS) and comparative analysis with the genomes of genotypes A1 and E (WB and Pig). Genome Biol. Evol. 5, 2498-2511.
- Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Malani, N., Ichikawa, H. (2007). Curcumin: the Indian solid gold. Adv. Exp. Med. Biol. 595, 1-75.
- Almirall, P., Nunez, F.A., Bello, J., Gonzalez, O.M., Fernandez, R., et al. (2013). Abdominal pain and asthenia as common clinical features in hospitalized children for giardiasis. Acta Trop. 127, 212-215.
- Alparó, I. (2005). Giardiasis y desnutrición. Rev Soc Bol Ped 2005; 44 (3): 166 - 73.
- Araujo, C.C., Leon, L.L. (2001). Biological activities of Curcuma longa L. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96, 723-728.
- Benkert, P., Tosatto, S.C.E. and Schomburg, D. (2008). "QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 71(1):261-277.
- Benkert, P., Kunzli, M., Schwede, T. (2009). QMEAN server for protein model quality estimation. Nucleic Acids Res. 37, W510-514.
- Benkert, P., Biasini, M., Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. Bioinformatics 27, 343-350 (2011).
- Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., Schwede, T. (2017). Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. Scientific Reports 7 (2017).
- Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T.A.P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality. Nucleic Acids Res. 45, D313-D319 (2017).
- Chakraborti, S., Das, L., Kapoor, N., Das, A., Dwivedi, V., et al. (2011). Curcumin recognizes a unique binding site of tubulin. J. Med. Chem. 54, 6183-6196.
- Chen, V., Arendall III, B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S. and Richardson, D.C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta Cryst. D66, 12-21.
- Cheng, A.L., Hsu, C.H., Lin, J.K., Hsu, M.M., Ho, Y.F. (2001). Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. Anticancer Res. 21, 2895-2900.
- Freitas, S.F., Shinohara, L., Sforcin, J.M., Guimaraes, S. (2006). *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. Phytomedicine 13, 170-175.
- Gardner, T.B., Hill, D.R. (2001). Treatment of giardiasis. Clin. Microbiol. Rev. 14, 114-128.
- Granados, C.E., Reveiz, L., Uribe, L.G., Criollo, C.P. (2012). Drugs for treating giardiasis. Cochrane Database Syst. Rev. 12 (CD007787).
- Gupta, K.K., Bharne, S.S., Rathinasamy, K., Naik, N.R., Panda, D. (2006). Dietary antioxidant curcumin inhibits microtubule assembly through tubulin binding. FEBS J. 273, 5320-5332.
- Gutierrez-Gutierrez, F., Palomo-Ligasa, L., Hernández-Hernández, M., Pérez-Rangel, A., Aguayo-Ortiz, R., Hernández-Campos, A., Castillo, R., González-Pozo, S., Cortés-Zárate, R., Ramírez-Herrera, M.A., Mendoza-Magaña, M.L., Castillo-Romero, A. (2017). Curcumin alters the cytoskeleton and microtubule organization on trophozoites of *Giardia lamblia*. Acta Tropica 172 (2017) 113-121.
- Harris, J.C., Plummer, S., Turner, M.P., Lloyd, D., 2000. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: Allium sativum (garlic) is an effective anti-giardial. Microbiology 146 (Pt. 12), 3119-3127.
- Kirk-Mason, K.E., Turner, M.J., Chakraborty, P.R. (1988). Cloning and sequence of beta tubulin cDNA from *Giardia lamblia*. Nucleic Acids Res. 16, 2733.
- Koehler, A.V., Jex, A.R., Haydon, S.R., Stevens, M.A., Gasser, R.B. (2013). *Giardia*/giardiasis - a perspective on diagnostic and analytical tools. Biotechnol. Adv. 32, 280-289.
- Lalle, M. (2010). Giardiasis in the post genomic era: treatment, drug resistance and novel therapeutic perspectives. Infect. Disord. Drug Targets 10, 283-294.
- Machado, M., Dinis, A.M., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Custodio, J.B., et al. (2010). Anti- *Giardia* activity of phenolic-rich essential oils: effects of *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*, and *Lippia graveolens* on trophozoites growth, viability, adherence, and ultrastructure. Parasitol. Res. 106, 1205-1215.
- Matadamas-Martínez, F., Iglesias-Osores, S.A. (2018). Inmunofluorescencia del citoesqueleto de *Giardia lamblia*. Rev. Exo Med 4(1).
- Padilla, S.L., Rodríguez, A., Gonzales, M.M., Gallego, G.J., Castano, O.J. (2013). Inhibitory effects of curcumin on dengue virus type 2-infected cells *in vitro*. Arch. Virol. 159, 573-579.
- Ravelli, R., Gigant, B., Curmi, P.A., Jourdain, I., Lachkar, S., Sobel, A., Knossow, M.



- (2004). Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*. Vol 428.
- Rufino-Gonzalez, Y., Ponce-Macotela, M., Gonzalez-Maciel, A., Reynoso-Robles, R., Jimenez-Estrada, M., *et al.* (2012). *In vitro* activity of the F-6 fraction of oregano against *Giardia intestinalis*. *Parasitology* 139, 434–440.
- Weinert, T., Olieric, N., Cheng, R., Brünle, S., James, D., Ozerov, D., Gashi, D., Vera, L., Marsh, M., Jaeger, K., Dworkowski, F., Panepucci, E., Basu, S., Skopintsev, P., Doré, A.S., Geng, T., Cooke, R.M., Liang, M., *et al.* (2018). Serial millisecond crystallography for routine roomtemperature structure determination at Synchrotrons. *Nature Communications*. Vol8:542.