



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Expresión, purificación y caracterización de  
la enzima recombinante triosa fosfato  
isomerasa C232A del parásito intracelular  
*Encephalitozoon intestinalis*

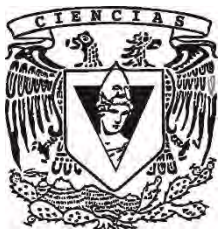
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

ARTURO JUANA SANTIAGO



DIRECTOR DE TESIS:  
DR. SERGIO ENRÍQUEZ FLORES

Ciudad Universitaria, Cd.Mx., 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“We are here because one odd group of fishes had a peculiar fin anatomy that could transform into legs for terrestrial creatures; because the earth never froze entirely during an ice age; because a small and tenuous species, arising in Africa a quarter of a million years ago, has managed, so far, to survive by hook and by crook. We may yearn for a ‘higher answer’ – but none exists”

— **Stephen Jay Gould**

“Science is based on experiment, on a willingness to challenge old dogma, on an openness to see the universe as it really is. Accordingly, science sometimes requires courage - at the very least the courage to question the conventional wisdom.”

— **Carl Sagan**

## **Dedicatoria**

*Quiero dedicar este trabajo enormemente a mi madre, Maria Magdalena Santiago, no solo por darme vida, sino por mostrarme que todo se logra perseverando y nunca rendirse. Eres tú, mi heroína. Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.*

*A quienes conforman mi familia, mis hermanos Felipe y Rosa, que estando o no presentes en mi formación, han contribuido a mi crecimiento como persona por su apoyo moral y económico.*

*A mi hermano Marcos, que aún en la distancia sigue presente y atento a la familia.*

*A mi primo Antonio, por el apoyo recibido tanto a mi, como a la familia.*

*A mis sobrinos Adrián, Ángel, Rocío y Giovani, por forjar mi paciencia.*

*Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos y para ellos.*

## Agradecimientos

A el laboratorio de Bioquímica Genética, y ahora en Biomoléculas y Salud Infantil, del Instituto Nacional de Pediatría, por adoptarme y continuar con mi formación.

A el Dr. Sergio Enríquez, por todo el inmenso apoyo recibido en este proyecto. A la Dra. Itzhel Torres por compartir sus conocimientos y tiempo dedicado en este trabajo. Al Dr. Gabriel López, por sus valiosos puntos de vista en la mejora del trabajo. Al Dr. Ignacio de la Mora y M. en C. Cinthia Fernández, por sus conocimientos y apoyo en tema específicos. A nuestra ex Técnico de Laboratorio Carmen Órtiz, por su apoyo con los materiales y reactivos.

A los miembros de mi Jurado por dedicar su tiempo en la revisión de ésta tesis, sus comentarios fueron bastante acertados para robustecerlo: Dr. Abraham Landa P., Dra. Ingeborg Becker F. y Dra Gloria Hernández A.

A CONACyT por la beca recibida por el proyecto con numero de registro 259105 FOSIE/CONACyT que me permitió realizar y finalizar el presente trabajo.

A el laboratorio del Dr. Ruud Marinus Buijs, por brindarme el espacio para realizar mi servicio social, y al Dr. Francisco Romo, por incluirme en su proyecto. Amé las neurociencias.

A Carlos F. Contreras V., “bro” por fin está tu nombre en esta sección, por alentarme a tomar riesgos y tomar confianza en los demás. Esas tardes de caminata y de billar se extrañan. Y por acompañarme a los panteones en mi primer intento de tesis.

A Carlos M. Sánchez M., tú mi *sempai*, que en momentos cruciales has estado ahí apoyándome incondicionalmente. A ti te debo mis perversiones.

A Alma Karen V., amiga y confidente, que tras la divergencia de nuestras carreras seguimos estando presentes. Tus sándwiches, inteligencia y amabilidad, te hacen una gran amiga.

A los “Chubis”: Lupisponium S.V, mi “primis” por siempre; Lulucita G.L, por compartir aficiones frikis; a Cynthia G. y Jose Ángel M, por hacer en estos años de conocernos, con su presencia tan histriónica, nuevas formas de ver la vida. Sigamos haciendo locuras cósmicas, plagada de risas y momentos inolvidables.

A Rafael “Fay” Capistrán D. por apoyarme en todo este proyecto y en cada toma de decisiones. Llegaste en el momento indicado.

A Viviana N, Karla C, Norma V, y Dany J, por hacer más llevadero el CCH, sus locuras son inolvidables.

A Coral S, Sandrito V., Ari H., Ferudito, Andy P, Nadia R, Fernanda P, Tarsi y Omar R., amigos y colegas de la carrera, que con su compañía compartimos aventuras y frustraciones inolvidables.

A mi *sensei* A.M. por su apoyo moral invaluable, en este trabajo.

A amigos del laboratorio José Luis R, Dany C. y Yoalli M. por compartir momentos agradables..

# Índice General

	Página
Resumen .....	1
1. Introducción .....	2
1.1 Taxonomía .....	2
1.2 Morfología .....	5
1.3 Ciclo de Vida de <i>Encephalitozoon intestinalis</i> .....	6
1.4 Epidemiología .....	7
1.5 Enfermedad y patogenia .....	8
1.6 Diagnóstico y tratamiento .....	10
1.7 Estrategia en la búsqueda de nuevos tratamientos contra la microsporidiosis .....	12
1.7.1 Enfoques a la búsqueda de tratamientos .....	12
1.7.2 Enzimas de vías metabólicas de <i>E. intestinalis</i> como blanco para el diseño de nuevos compuestos con potencial farmacológico .....	13
1.7.3 Enzimas de la glucólisis como blancos para el diseño de compuestos farmacológicos .....	14
2. Justificación .....	18
3. Objetivos .....	19
3.1 Objetivo general .....	19
3.2 Objetivos particulares .....	19
4. Hipótesis .....	19
5. Materiales y métodos .....	20
5.1 Obtención del gen de la <i>eitim</i> .....	20
5.2 Diseño de oligonucleótidos para la 694_696TGC>GCG .....	20
5.3 Clonación de la mutante de <i>eitim</i> 694_696TGC>GCG en los vectores de replicación y de sobreexpresión .....	22
5.4 Purificación de la EiTIM C232A .....	24
5.5 Determinación de las constantes catalíticas de la EITIM C232A .....	25
5.6 Determinación de la sensibilidad enzimática de la EiTIM C232A con agentes derivatizantes de Cys .....	26
5.7 Determinación de la estructura secundaria y estabilidad térmica de la EiTIM C232A mediante Dicroísmo Circular (DC) y Temperatura media de desnaturalización (Tm) .....	27
5.8 Determinación de la Fluorescencia extrínseca (FE) en la EiTIM C232A .....	28
6. Resultados .....	28
6.1 Diseño de oligonucleótidos para la <i>eitim</i> 694_696TGC>GCG .....	28
6.2 Clonación de la mutante <i>eitim</i> 694_696TGC>GCG en el vector de replicación y de expresión .....	29
6.3 Sobreexpresión y purificación de la EiTIM C232A .....	34
6.4 Cinética enzimática de la EiTIM C232A .....	34

6.5 Determinación de la actividad enzimática de la EITIM C232A con los agentes derivatizantes (MMTS, MTSCE y DTNB)-----	36
6.6 Obtención del Dicroísmo Circular (DC) y la Temperatura media de desnaturalización (Tm) de la EiTIM C232A -----	38
6.7 Fluorescencia extrínseca (FE) de la EiTIM C232A derivatizada con reactivos sulfhídrido y en presencia de ANS -----	41
7. Discusión -----	42
8. Conclusiones -----	44
9. Perspectivas -----	44
Apéndice -----	45
Referencias -----	47

## Resumen

Los microsporidias son parásitos oportunistas intracelulares, que tomaron su relevancia ante el auge del VIH/SIDA. Actualmente de 14 especies patógenas al hombre, *Encephalitozoon intestinalis* es el segundo más prevalente en los casos de microsporidiosis. Los tratamientos usados contra la infección provocada por *E. intestinalis* han mostrado ser ineficaces y con efectos secundarios aunado a la posibilidad de resistencia contra el tratamiento; bajo estas circunstancias impera la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos. La triosafosfato isomerasa (TIM) es un enzima de la vía glucolítica que, además de ser ampliamente estudiada, ha sido propuesta como blanco farmacológico de diversos parásitos y más recientemente de *Encephalitozoon intestinalis* (EiTIM) en la cual se demostró que es inactivada con agentes derivatizantes de cisteínas.

El presente trabajo tiene como propósito caracterizar la mutante sencilla del residuo de cisteína 232 de la EiTIM (C232A), y analizar esta región como potencial para la inactivación de la enzima, determinando sus constantes catalíticas, su sensibilidad ante los derivatizantes de cisteína como el MMTS, MTSES y DTNB, cambios en la estructura secundaria (mediante dicroísmo circular y temperatura media de desnaturalización) y terciaria (fluorescencia extrínseca). Las propiedades catalíticas de la EiTIM C232A mostraron ser similares a la EiTIM silvestre ( $K_m$ ,  $K_{cat}$  y  $K_{cat}/K_m$ ) con disminución en la  $V_{max}$ . En cuanto a la inactivación por los derivatizantes se promovió de manera parcial con el MMTS, casi total con MTSES y total con DTNB, siendo dependiente de la concentración. Estos resultados fueron similares a los observados en la EiTIM wt. No hubo cambios significativos en la estructura secundaria determinada por DC para cada una de las condiciones; en tanto que, en la estabilidad térmica, la EiTIM C232A mostró un valor similar con respecto a la EiTIM wt. La adición de los derivatizantes demostró su efecto en la inestabilidad térmica en un intervalo de 2 a 8 °C, donde el DTNB fue el compuesto que mayor inestabilidad promovió. Con la medición de la fluorescencia extrínseca usando ANS, se demostró que la máxima emisión fue con la EiTIM C232A en ausencia de los derivatizantes, en tanto que con MMTS, MTSES o DTNB la intensidad de fluorescencia disminuyó considerablemente. En conclusión, la EiTIM C232A tras ser inactivada con los derivatizantes, también se altera a nivel estructural de manera similar a la EiTIM wt. Por tanto, este residuo de Cys 232 no es directamente responsable de la inactivación promovida con los derivatizantes.



# 1. Introducción

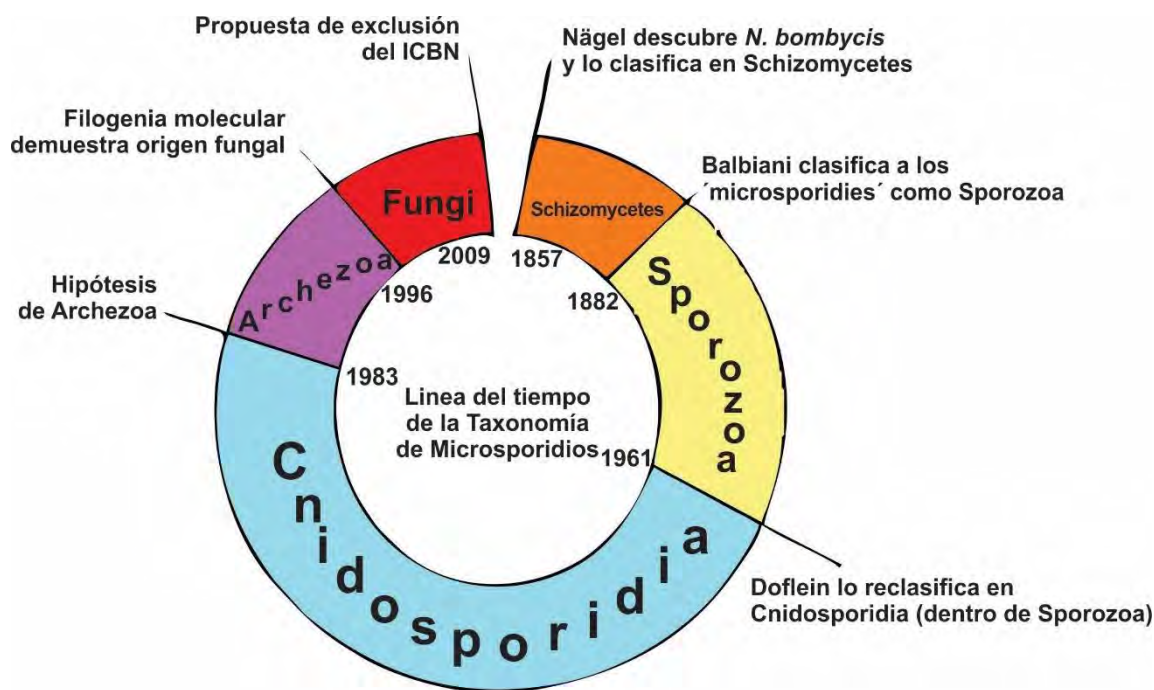
## 1.1 Taxonomía

El parasitismo es una estrategia desarrollada para “vivir juntos”, una asociación entre un organismo denominado parásito que vive a expensas de otro, denominado el hospedero, infligiéndole daño durante la invasión y estancia (Becerril, 2011). Esto representa un sistema dinámico en el que el parásito y su hospedero están bajo constante presión evolutiva desarrollando nuevas adaptaciones, lo que permite la coexistencia de ambos organismos (Vávra y Lukes, 2013).

Los microsporidias son organismos parasitarios intracelulares que se han adaptado a su hospedero. Estos, forman parte del phylum Microspora, que son un grupo de parásitos intracelulares obligados, conformado aproximadamente por 1,300 especies distribuidas en 150 géneros. Se clasifican como eucariontes ya que poseen un núcleo celular con envoltura nuclear, arreglo de membranas citoplasmáticas, así como una separación de cromosomas en husos mitóticos (Shadduck y Greeley, 1989; Weber y cols., 1994). Están ampliamente distribuidos alrededor del mundo, por lo que son cosmopolitas e infectan tanto a invertebrados como vertebrados (Weber y cols., 1994). Son responsables de enfermedades infecciosas en peces, mascotas (lo que afecta a la industria pesquera, apícola y peletera), y humanos (Franzen, 2008), de los cuales al menos 14 especies son patógenas de éste: *Anncalia (Brachiola) algerae*, *A. connori*, *A. vesicularum*, *Enterocytozoon bienensei*, *Encephalitozoon cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*, *Microsporidium africanum*, *M. ceylonensis*, *Nosema ocularum*, *Pleistophora spp*, *Trachipleistophora hominis*, *T. anthropophthera* y *Vittaforma corneae*. Aunque las especies más frecuentemente reportadas son *E. bienensei* y *E. intestinalis* (Didier y Weiss, 2006; Ghosh y Weiss, 2012; Ramanan y Pritt, 2014), siendo esta última especie motivo de estudio en este trabajo.

Históricamente, en 1882 el embriólogo francés Edouard-Gerard Balbiani acuñó la palabra ‘microsporidies’ para nombrar a estos microorganismos, aunque no especificó su nivel taxonómico. Posteriormente en 1977, Sprague y Vávra los reclasificaron al nivel de Phylum Microspora (Vávra y Lukes, 2013). Tradicionalmente se sugirió que eran un grupo de protozoarios “primitivos” por carecer de ciertos organelos, como mitocondrias y peroxisomas (Didier y Weiss, 2008), aunque con técnicas de filogenia molecular se ha demostrado que están relacionados a los hongos (Figura 1) (Ramanan y Pritt, 2014; Weiss y Schwartz, 2006). Tales técnicas moleculares han utilizado secuencias de ADN y de otros marcadores; lo anterior fue primeramente estudiado en 1987 al determinar la secuencia de la subunidad ribosomal pequeña del ARN (SSU rRNA) de *Vairormorpha necatrix*, como un primer marcador para las relaciones evolutivas de los microsporidias; adicionalmente se han estudiado secuencias genéticas del factor de elongación de la traducción EF-1 $\alpha$  y EF-2 (Kamaishi y cols., 1996; Van de Peer y cols., 2000). Posteriormente, estudios basados en genes codificantes de proteínas tales como la  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, la subunidad pequeña de la ARN polimerasa II (RPB1), Valil tRNA sintetasa (Va1RS), glutamil- y seril-sintetasas, hsp-70, EF-1 $\alpha$ , RPB1, ATPasa vacuolar, TF-II; subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la piruvato deshidrogenasa mitocondrial, y también la proteína de unión a la caja TATA (TBP) (Edlind y cols., 1996; Fast y cols., 1999). De esta manera, existe gran cantidad de evidencia molecular que apoya la

relación entre los microsporidias y los hongos, entre las que destacan genes que codifican proteínas y que están relacionados a los hongos (Vávra y Lukes, 2013).



**Figura 1. Cambios en las relaciones filogenéticas de microsporidias desde su descubrimiento hasta la actualidad** (Modificado de Keeling, 2009).

Aunque los microsporidias parecieran no poseer similitudes con los hongos, ambos grupos dejan un depósito de pared celular sobre la membrana celular, una estructura donde los microtúbulos emergen y se anclan a los cuerpos polares, la formación de esporas, la presencia de quitina, y trehalosa son caracteres en común. Actualmente los microsporidias son considerados altamente divergentes, bien adaptados y parásitos especializados que están relacionados con los hongos endoparásitos (Cryptomycota) o quizás un grupo hermano (Ramanan y Pritt, 2014).

También, se ha demostrado reducción genómica extrema, por lo que el interés de estudiar estos organismos ha incrementado en los últimos años, por ejemplo, el tamaño del genoma de *E. intestinalis* es de 2.3 Mb (Tabla 1). La mayoría de sus genes codifican para proteínas que participan en rutas metabólicas y de regulación, manteniendo solo los relacionados al transporte de energía y de metabolitos, muy probablemente debido a su alta dependencia con el hospedero (Didier y Weiss, 2008). En el caso del género *Encephalitozoon*, carecen de la habilidad para producir varios nucleótidos y aminoácidos, otras rutas que no están presentes o de expresión reducida que incluyen al ciclo de Krebs y el complejo de síntesis de ácidos grasos.

Tabla 1. Tamaño comparativo entre los genomas de microsporidias, hasta ahora secuenciados.

ESPECIE	TAMAÑO DEL GENOMA	REFERENCIAS
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	2.9 Mpb	Pombert y cols., 2013
<i>E. hellem</i>	2.5 Mpb	Pombert y cols., 2012
<i>E. romaleae</i>	2.5 Mpb	Pombert y cols., 2012
<i>E. Intestinalis</i>	2.3 Mpb	Corradi y cols., 2010
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	6 Mpb	Akiyoshi y cols., 2009
<i>Anncalia algerae</i>	23 Mpb	Peyretailade y cols., 2012
<i>Trachipleistophora hominis</i>	8.5 – 11.5 Mpb	Heinz y cols., 2012

### Género *Encephalitozoon*

Todas las especies de este género, se desarrollan dentro de vacuolas parasitóforas, los merontes se dividen mediante fisión binaria circundando la membrana vacuolar. Los esporontes producen una cubierta delgada que será la exospora, y estos se dividirán para dar origen a los esporoblastos que madurarán en esporas. Las esporas tienen dimensiones de 2.0 a 2.5 por 1.0 a 1.5  $\mu\text{m}$  y en el filamento polar tienen de cinco a siete giros (Franzen y Müller, 1999).

*E. cuniculi* fue reportado por Wright y Craighead en 1922 y nombrado por Nicolau y Schöen en 1923. Se ha demostrado que parasita diversos mamíferos como roedores, carnívoros, primates y humanos (Franzen y Müller, 1999). Estos se desarrollan intracelularmente en una vacuola parasitófora, los merontes al dividirse por fisión, permanecen cerca de la membrana vacuolar, miden 2 a 6  $\mu\text{m}$  por 1 a 3  $\mu\text{m}$ . Los esporontes permanecen libres centrícamente de la vacuola y se dividen en dos esporoblastos para madurar a esporas.

*E. intestinalis* (Syn. *Septata intestinalis*), descrito inicialmente en 1992 por Orenstein y cols., como un microsporidio con similitudes estructurales con el género *Encephalitozoon*. Posteriormente fue clasificado por Cali y colegas en 1993, como un nuevo género y especie: *Septata intestinalis*; basados en estudios sobre rRNA se sugirió que fuera ubicado en el género *Encephalitozoon* y renombrado como *E. intestinalis*. Este microsporidio muestra una única red fibrilar circundante secretado por el parásito durante su desarrollo, otorgándole a la vacuola parasitófora la apariencia de estar septada (Franzen y Müller, 1999). Inicialmente se identificó en pacientes con VIH/SIDA en los enterocitos y la lámina propia, posteriormente fueron detectados en fibroblastos y células endoteliales de la lámina propia, células de riñón, células del epitelio bronquial y nasal (Weber y cols., 1994).

A continuación, se enlista su clasificación (Yazar y cols., 2013):

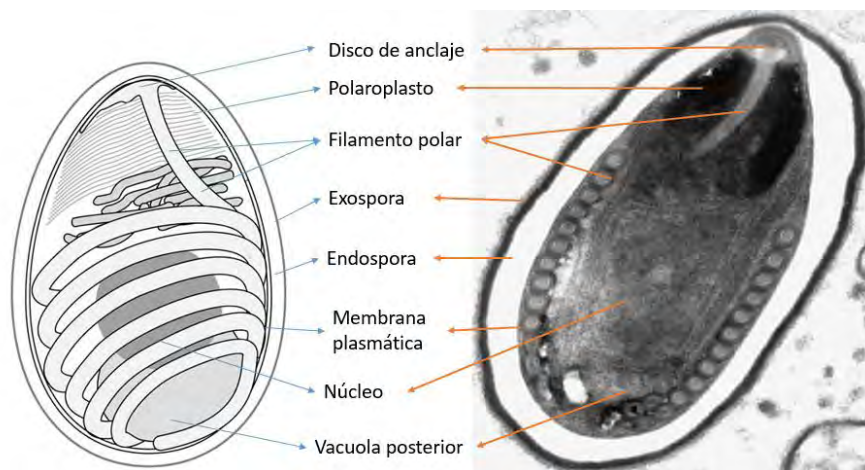
Clasificación del microsporidio *E. intestinalis*

Reino: Fungi  
 Subreino: Eomycota  
 Phylum: Microsporidia  
 Clase: Haplophasea  
 Orden: Glugeida  
 Familia: Encephalitozoonidae  
 Género: Encephalitozoon  
 Especie: *Encephalitozoon intestinalis*

## 1.2 Morfología

Las características principales que distinguen a las esporas de los microsporidias, son su pequeño tamaño (1.0 a 4.0  $\mu\text{m}$ ), tienen una cubierta de quitina y glicoproteínas, paredes delgadas y la presencia de un organelo llamado tubo polar, esta estructura es bastante larga y finamente delgada, la cual está enrollada y rodea el citoplasma de la espora (Figura 2) (Keeling y McFadden, 1998).

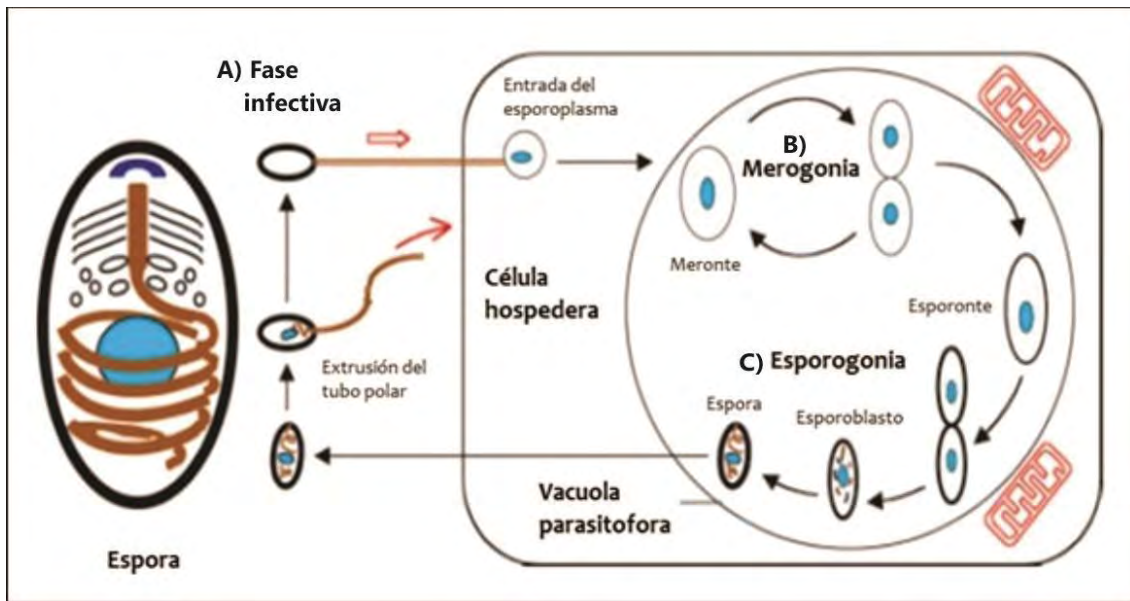
Las esporas de los microsporidias son de aspecto piriforme, están rodeadas por una capa externa delgada de glicoproteína (exospora) la cual es Gram-positiva y electrodensa; una capa interna de quitina (endospora) y electrolúcida, así como una membrana plasmática que envuelve al citoplasma (Franzen y Müller, 1999), la Figura 2 lo esquematiza. El citoplasma de la espora contiene un disco de anclaje anterior, un polaroplasto con membrana lamelar que alberga un aparato de Golgi atípico, mitosomas, retículo endoplásmico, ribosomas, y una vacuola posterior; además contiene un núcleo con arreglo monocarión o diplocarión (según la especie), poseen un característico aparato de extrusión constituido por un filamento polar (tubo polar) unido al disco de anclaje (Didier y Weiss, 2008; Franzen y Müller, 1999). El tubo polar es una estructura característica de los microsporidias que ayuda a la infección y germinación en la célula huésped. Se denomina filamento polar cuando se encuentra enrollado dentro de la espora, el número de vueltas es característico de cada especie. En corte transversal el filamento polar está compuesto de capas concéntricas electrodensas y electrolucientes cuyo número puede variar desde 3 hasta 20 capas. Hay un material particulado electrodenso que rellena el centro del filamento. La evaginación de este filamento durante la infección forma un tubo hueco que mantiene adherido a la espora con la célula huésped permitiendo el paso del esporoplasma (esto es el vaciado del contenido citoplasmático). El tamaño del tubo polar va de 0.1 a 0.15  $\mu\text{m}$  de diámetro por 50 a 100  $\mu\text{m}$  de longitud; es una estructura flexible que permite una variación en el diámetro durante la evaginación de 0.1 a 0.25  $\mu\text{m}$  (Xu y Weiss, 2005).



**Figura 2.** Estructura general de los microsporidias en una ilustración y de una micrografía en microscopio electrónico (Franzen, 2008). Se muestran los componentes principales de estos organismos.

### 1.3 Ciclo de Vida de *E. intestinalis*

Los microsporidias no tienen estadios activos fuera de las células de sus hospederos debido a su alta dependencia con estos. En general, el ciclo de vida consta de tres fases (Figura 3): infectiva, merogonial o proliferativa y esporogonial o productora de esporas (Franzen, 2008).



**Figura 3. Ciclo de vida de *Encephalitozoon* spp.** Se esquematizan las tres fases A) infectiva, B) merogonial y C) esporogonial. Modificado de Chilón-Cornejo, 2014.

La Primera fase o fase infectiva, abarca desde la liberación de la espora al medio ambiente en las heces hasta que es ingerida o inhalada por un nuevo hospedero, e infecta una célula susceptible. Bajo condiciones adecuadas dentro del hospedero, el filamento polar es descargado a través de la porción anterior de la espora y de esta manera penetra al interior de la célula del hospedero. (Franzen y Müller, 1999).

La segunda fase, fase de merogonia o proliferativa, inicia al momento en que la espora hace contacto con la célula huésped y evagina el tubo polar de manera que sale disparado, perforando la célula huésped, esto forma un canal por el cual se libera el esporoplasma, ahí se lleva a cabo división por fisión binaria o simple dando origen a merontes, que son células redondas, irregulares o bien elongadas con un retículo endoplásmico rugoso rudimentario (Franzen, 2008). Estos están rodeados por una membrana plasmática sencilla y proliferan dividiéndose repetidamente por fisión binaria o múltiple. Ellos pueden contener uno o más núcleos.

En la tercera fase o fase de esporogonia se inicia la síntesis de proteínas que dará lugar a la pared de la espora (Vávra y Lukes, 2013). Es la etapa que da origen a los esporontes y posteriormente a las esporas maduras. Los esporontes se caracterizan por el desarrollo de una cubierta delgada electrodensa que da origen a la capa de la exospora (Franzen y Müller, 1999). El núcleo puede estar aislado o pareado; estos maduran a esporoblastos por fisión binaria (esporogonia disporoblástica) o bien pueden llegar a ser plasmodios multinucleados y pasar a través de divisiones secuenciales. Los esporoblastos son

normalmente de aspecto ovoide y maduran a esporas cuando se sintetizan los organelos de las esporas. En esta etapa los retículos endoplásmicos liso y rugoso incrementan en número y producen vesículas semejantes al aparato de Golgi (Botero-Garces y Montoya-Palacio, 2002). Una vez que han madurado las esporas, ocurre la lisis de la célula huésped, liberando esporas que infectarán a otras células adyacentes; mientras que otras serán liberadas en las heces, orina, y posiblemente en secreciones de vías respiratorias y en el moco.

## 1.4 Epidemiología

La microsporidiosis, es una enfermedad ocasionada por los microsporidias antes mencionados, (Anane y Attouchi, 2010). Los estudios referentes a la prevalencia de dicha enfermedad se han centrado principalmente en personas inmunocomprometidas como pacientes con VIH-SIDA, en receptores de órganos, así como personas de la tercera edad y la población infantil. Previo a la pandemia del VIH-SIDA, la microsporidiosis fue raramente reportada en humanos, sin embargo, a mediados de 1980 la pandemia del VIH/SIDA promovió la capacidad oportunista de los microsporidias para infectar al humano produciendo enfermedades en órganos vitales (Stentiford y cols., 2016).

A nivel mundial, la presencia de microsporidias varía entre 5 al 78% en diversos tipos de población susceptible, diversos investigadores sugieren que esto es debido a los diferentes métodos usados para la identificación, así como al tipo de población estudiada (Ayinmode y cols., 2011; Bryan y Schwartz, 1999; Didier y cols., 2004; Eeftinck-Schattenkerk y cols., 1991; Eligio-García y cols., 2013; Matos y cols., 2012; Noda-Albelo y cols., 2013); se estima que en la población infantil con o sin VIH la prevalencia varía entre 17 al 76.9% y 9.3 al 22.5% respectivamente (Tumwine y cols., 2005).

Geográficamente, la información es igualmente variable, por ejemplo, en África se reporta hasta un 77% en pacientes con VIH; en tanto que estudios realizados en Europa se ha reportado que en este tipo de población existe una prevalencia de hasta el 60%. En ese continente, los reportes indican que en niños sanos abarca desde 1.7 al 30.6% en tanto que en niños con VIH alcanza hasta un 65%, mientras que en personas sanas y en viajeros hasta un 22% y un 10% respectivamente (Lores y cols., 2002; Matos y cols., 2012; Sak y cols., 2010). En el continente asiático la prevalencia entre pacientes con VIH y niños sanos es de aproximadamente 27%, mientras que en niños con VIH es del 18% (Matos, 2012; Pagornrat y cols., 2009).

Finalmente, para el continente americano se han desarrollado estudios que indican que la prevalencia más baja se encuentra en los Estados Unidos en los pacientes con VIH con 1.5% (Dworkin y cols., 2007); mientras que en países de Latinoamérica como Brasil se ha reportado la microsporidiosis en pacientes con VIH desde 14.7 hasta un 46% (Costa y cols., 2013), en Colombia, Venezuela y Perú se reporta en pacientes con VIH 14.7%, 36% y 8% respectivamente; por último, en México un reporte reciente indica que el 31% de pacientes con VIH evaluados cursaron con microsporidiosis (Gamboa-Dominguez y cols., 2003), en tanto que en otro estudio con niños que padecían leucemia o linfoma la prevalencia era hasta un 60% (Jiménez-González y cols., 2012); también se ha identificado a los

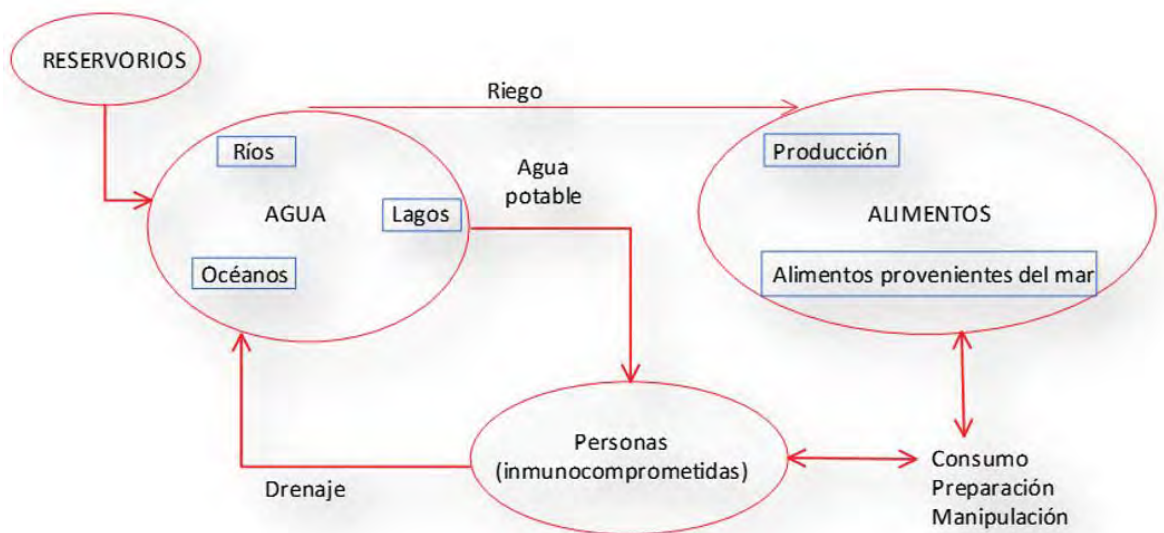


microsporidias en población sana de zonas rurales, con una prevalencia de aproximadamente 8% (Enriquez y cols., 1998).

Basados en lo descrito anteriormente, poblaciones específicas poseen factores de riesgo que recaen principalmente en personas con VIH, así como en niños con o sin VIH (Lobo y cols., 2012), así mismo en viajeros inmunocompetentes que van a zonas tropicales, y seguidos de adultos mayores e inmunosuprimidos.

### 1.5 Enfermedad y Patogenia

La microsporidiosis es una patología variada, puesto que algunas de las especies identificadas de microsporidias se han focalizado en diferentes órganos o tejidos blanco. Se ha descrito que estos organismos pueden causar diferentes síntomas, dependiendo del sitio de infección (Tabla 2). La mayoría de las infecciones probablemente ocurren por ingestión o inhalación de las esporas que corresponden el estadio infeccioso, las esporas son resistentes al ambiente y sobreviven por largos periodos de tiempo en el ambiente (Figura 4; Didier y Weiss, 2008).



**Figura 4.** Fuentes de transmisión de los microsporidias (Modificado de Cali y Takvorian, 2004).

Antes del surgimiento de la pandemia del VIH, solo se conocían en humanos 8 casos de infecciones por microsporidias (Mathis y cols., 2005). La importancia de estos organismos en humanos fue reconocida a mediados de 1980 asociando las infecciones entéricas oportunistas y diarreas persistentes en personas con VIH/SIDA. Se ha demostrado que pacientes con VIH con un recuento de células T-CD4+ menor a 100 por mm<sup>3</sup> son más propensos a presentar episodios diarreicos persistentes, pérdida de peso y dolor abdominal asociados a *E. bienensis* y *E. intestinalis*, microsporidias altamente frecuentes en el humano (Didier y Weiss, 2008). Por otro lado, en personas que se les ha realizado trasplantes de órganos, son muy susceptibles a *Encephalitozoon spp* y es común que una vez infectadas puede haber diseminación a otros órganos, adicionalmente se han demostrado microsporidiosis en pulmones de pacientes con enfermedades hematológicas y en trasplante de médula ósea. Se han reportado casos de abscesos cerebrales, sinusitis,

endocarditis, miocarditis, osteomielitis, infecciones cutáneas y genitourinarias (Ramanany Pritt, 2014).

**Tabla 2. Manifestaciones clínicas de infecciones por microsporidiosis humana** (Modificado de Franzen y Müller, 2001).

Microsporidia		Manifestaciones clínicas
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>		Enteritis, diarrea, colangitis, colecistitis, neumonitis, bronquitis, sinusitis, rinitis
<b>Encephalitozoon</b>	<i>E. cuniculi</i>	Hepatitis, peritonitis encefalitis, infección intestinal, infección en vías urinarias, sinusitis, rinitis, queratoconjuntivitis, infección diseminada
	<i>E. hellem</i>	Queratoconjuntivitis, sinusitis, rinitis, neumonitis/bronquiolitis, nefritis, uretritis, prostatitis, uretritis, cistitis, infección diseminada
	<i>E. intestinalis</i>	Enteritis, diarrea, perforación de intestino delgado, colangitis, colecistitis, nefritis, infección del tracto urinario, sinusitis, rinitis, bronquitis, queratoconjuntivitis, infección diseminada
<b>Trachipleistophora</b>	<i>T. hominis</i>	Miositis, queratoconjuntivitis, sinusitis, rinitis
	<i>T. anthropophthera</i>	Encefalitis, miositis, infección diseminada
<b>Pleistophora spp.</b>		Miositis
<b>Vittaforma corneae</b>		Queratitis, infección del tracto urinario
<b>Nosema</b>	<i>N. ocularum</i>	Queratoconjuntivitis
<b>Anncalia (Brachiola)</b>	<i>A. vesicularum</i>	Miositis
	<i>A. algerae</i>	Queratoconjuntivitis
	<i>A. connori</i>	Infección diseminada
<b>Microsporidium</b>	<i>M. africanum</i>	Úlcera cornea
	<i>M. ceylonensis</i>	Úlcera cornea

Puesto que la duplicación celular de los microsporidias ocurre en el epitelio del intestino delgado, esto lleva a la disminución de superficie en la vellosidad intestinal, lo que se asocia con la mala absorción de nutrientes (tales como lípidos, deficiencias de potasio, magnesio, vitamina B12 y una baja de bicarbonatos en suero) y diarrea. *E. intestinalis* infecta tanto a las vellosidades intestinales como a las células cripticas, invadiendo macrófagos y fibroblastos. Induce una severa ulceración del intestino delgado asociado a la atrofia de la mucosa, hay inflamación aguda o bien crónica debido a la disminución de la actividad enzimática (fosfatasa alcalina y la  $\alpha$ -glucosidasa, localizadas en la porción basal de las vellosidades, de igual forma hay infiltración de macrófagos en la submucosa (Anane y Attouchi, 2010; Conteas y cols., 2000).



## 1.6 Diagnóstico y tratamiento

Diversas técnicas de laboratorio han sido descritas para la identificación de los microsporidias en muestras provenientes de humanos, tales como las técnicas de tinción, microscopía electrónica de transmisión (MET), ensayos de inmunofluorescencia (EIF) con anticuerpos monoclonales o policlonales, cultivos celulares, así como el empleo de técnicas moleculares (Ramanan y Pritt, 2014), que a continuación se describirán de manera breve.

1. **Microscopía Electrónica de Transmisión.** Es considerado como el estándar de referencia para la confirmación diagnóstica e identificación de especies, y es requerido para la descripción de nuevas especies (Gosh y cols., 2014). La identificación de esporas o de estadios de desarrollo dentro de las células infectadas mediante ésta técnica es en muestras clínicas a partir de heces, jugos duodenales o biliares, orina, frotis de la conjuntiva, fluidos del lavado broncoalveolar, esputo, descargas nasales y para su identificación específica es la toma de una biopsia del tejido infectado. Con esto se observa la estructura de la pared celular, la vuelta del filamento polar, esporoplasma y morfología del núcleo. La detección es altamente específica, pero carece de sensibilidad cuando se analizan muestras de fluidos o de heces. Muchas de estas técnicas requieren mucha experiencia, así como de equipo y reactivos costosos, sin contar que pocos son los centros de investigación referenciados para su identificación (Franzen y Müller, 1999).
2. **PCR.** Los microsporidias muestran características similares a la de los procariontes especialmente en genes del rRNA, poseen una subunidad pequeña 16S (SSU rRNA) y una subunidad grande 23S (LSU rRNA) separados por un espaciador intergénico no transcrito. Aunado a que carecen de una subunidad 5.8S rRNA y un segundo espaciador intergénico, presentes en eucariontes. (Franzen y Müller, 1999). Esto ha sido aprovechado para identificar a nivel de especie, utilizando el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde se amplificando diferentes regiones de la SSU rRNA. Como ejemplo, los pares de oligonucleótidos EBIEF1 y EBIEF2 son para identificar a *E. bienewisi* (Da Silva y cols., 1996) y en el caso de *E. intestinalis* se usan los oligonucleótidos SINTF1 y SINTR (Bedoya y cols., 2008). Ésta técnica es la más precisa ya que identifica a nivel de especie.
3. **Microscopía de Luz.** El diagnóstico por la microscopía de la luz ha mejorado enormemente, pues permite la diagnosis por microsporidiosis, pero la diferenciación entre las esporas de especies de microsporidias es prácticamente imposible mediante estas técnicas (Gosh y cols., 2014); otra limitante es que las tinciones de Gram y Giemsa no son apropiadas para diagnóstico en muestras citológicas, ya que no se diferencian las esporas con el entorno en fluidos corporales o en heces; para la examinación de fluidos o en heces se hacen de rutina las basadas en cromotropo y sus modificaciones (de Ryan o Weber), las esporas teñidas tienen un color rojo rosado además de que a magnificaciones 1000x es apreciable en algunas esporas una banda en diagonal o ecuatorialmente muy distintiva; las tinciones por medio de inmunofluorescencia ha sido desarrollada para la identificación específica entre microsporidias, pero su uso queda restringido solo con fines de investigación (Franzen y Müller, 1999).

4. **Métodos basados en antígenos.** Las pruebas hechas para inmunofluorescencia han sido usadas para el diagnóstico y diferenciación de especies empleando anticuerpos poli y monoclonales que reconocen la superficie de la espora o el tubo polar de uno o varios microsporidios. Para el caso de *E. intestinalis* se desarrollaron dos anticuerpos monoclonales específicos capaces de reconocer antígenos de superficie de varios estadios de desarrollo (Si13) o bien con el tubo polar (Si91) (Beckers y cols., 1996).
5. **Pruebas serológicas.** En tanto a las técnicas serológicas son diseñadas para detectar anticuerpos IgG e IgM de microsporidias se desconoce la sensibilidad y especificidad, especialmente en condiciones para diagnosticar a personas con inmunodeficiencias. (Franzen y Müller, 1999).

El tratamiento común contra la microsporidiosis intestinal por *E. intestinalis* se basa principalmente en el uso de albendazol y en mucho menor grado la fumagilina, así como derivados de estos fármacos, sin embargo, no hay hasta el momento un tratamiento específico, efectivo y seguro en humanos. (Eligio-García y cols., 2013).

**Albendazol.** Este es un derivado del benzimidazol, es usado como un antihelmíntico de amplio espectro y con actividad antifúngica (Conteas y cols., 2000). La acción de este medicamento es interferir con la polimerización de la subunidad beta de la tubulina, que es la proteína blanco. Se ha demostrado que en los microsporidias promueve la inhibición de la división celular bloqueando la síntesis de tubulina, el principal constituyente del huso mitótico. Los estudios clínicos han demostrado la eficacia contra el género *Encephalitozoon* en pacientes con VIH, en donde se emplea como tratamiento de primera línea contra la microsporidiosis intestinal, ocular y diseminada. La dosis recomendada es de 400 mg dos veces por día en adultos y 7.5 mg/kg dos veces por día en niños, durante 2 a 4 semanas. (Anane y Attouchi, 2010). Su uso prolongado puede provocar diversos efectos adversos tales como, dolor abdominal, diarrea, elevación en los niveles en las transaminasas en suero, proteinuria, malestar con vértigo, erupción en la piel, así como raramente neutropenia y pancitopenia (Groß, 2003).

A pesar del tratamiento usando albendazol, se ha demostrado la persistencia de microsporidios tras la resolución de la enfermedad intestinal durante las primeras etapas de infección, lo cual no solo podría pasarse por alto al parecer resuelta la infección, sino también permanecer latente (Sak y cols., 2010). Una infección latente en pacientes inmunocompetentes, permitiría un relapso de dicha infección tras una inmunosupresión dándole suma importancia para la salud pública (Kotkova y cols., 2013).

En cuanto a la resistencia se conoce que de la secuencia aminoacil de la  $\beta$ -tubulina, seis aminoácidos son los que están implicados en la sensibilidad a benzimidazoles (His6, Ala165, Phe167, Glu198 y Arg241; numeración basada en la secuencia de *Saccaromyces cerevisiae*). Por ejemplo, tanto *Vittaforma corneae* como *E. bienewisi* poseen una sustitución de la Glu198 en los cuales se ha demostrado la resistencia al tratamiento con albendazol (Franzen y Salzberger, 2008). Por otra parte, en el caso de la resistencia del género *Encephalitozoon* spp puede deberse a un mecanismo similar a los descritos en *Plasmodium* spp, *Leishmania* spp y *E. histolytica*, los cuales involucra a los transportadores de unión a ATP (ABC), estos son uno de los mecanismos basados en la translocación de fármacos,

alejándolos de sus sitios blanco dentro de los parásitos. Los transportadores ABC son un conjunto de proteínas de membrana compuestas por al menos cuatro dominios, son capaces de transportar una gran variedad de sustratos, fármacos, metales pesados, aminoácidos, pequeñas moléculas, iones, fosfolípidos, péptidos, entre otros (Klokouzas y cols., 2003). Las bombas de resistencia a multi-fármacos (MDR1) tales como la P-glicoproteína (P-gp) pertenecen a la familia de transportadores ABC. Ha quedado demostrado que *E. intestinalis* posee dos genes EiABC1 y EiABC2 los cuales comparten homología con los transportadores ABC (Bonafonte y cols., 2001), de esta manera, sugiriendo que la presencia y expresión de estos genes podría promover la resistencia al albendazol.

**Fumagilina.** Éste fármaco es un antibiótico extraído de *Aspergillus fumigatus*, identificada en 1949 y usado en 1953 por apicultores para tratar a las abejas contra *Nosema apis* y usada en humanos inicialmente contra la amibiasis. El blanco es una metaloproteasa, la metionina aminopeptidasa-2 (MetAP2), una enzima esencial para el metabolismo del microsporidio (al eliminar la metionina inicial de las proteínas necesaria para la modificación post-traducciona) lo que inhibe la replicación al bloquear irreversiblemente el sitio activo de la MetAP2 así como la síntesis del RNA. A pesar de su eficacia, posee efectos adversos serios en humanos, al administrarse oralmente muestra toxicidad en la médula ósea afectando directamente sobre las células megacariocíticas y mieloides. Como consecuencia se genera trombocitopenia y neutropenia como síntomas comunes, también se presenta dolor abdominal, diarrea, vomito e hiperlipasemia. (Anane y Attouchi, 2010). Sólo se recomienda su administración de forma tópica en el tratamiento de la queratoconjuntivitis cuando hay infección por *E. intestinalis* (Conteas y cols., 2000).

## **1.7 Estrategia en la búsqueda de nuevos tratamientos contra la microsporidiosis**

### **1.7.1 Enfoques a la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos**

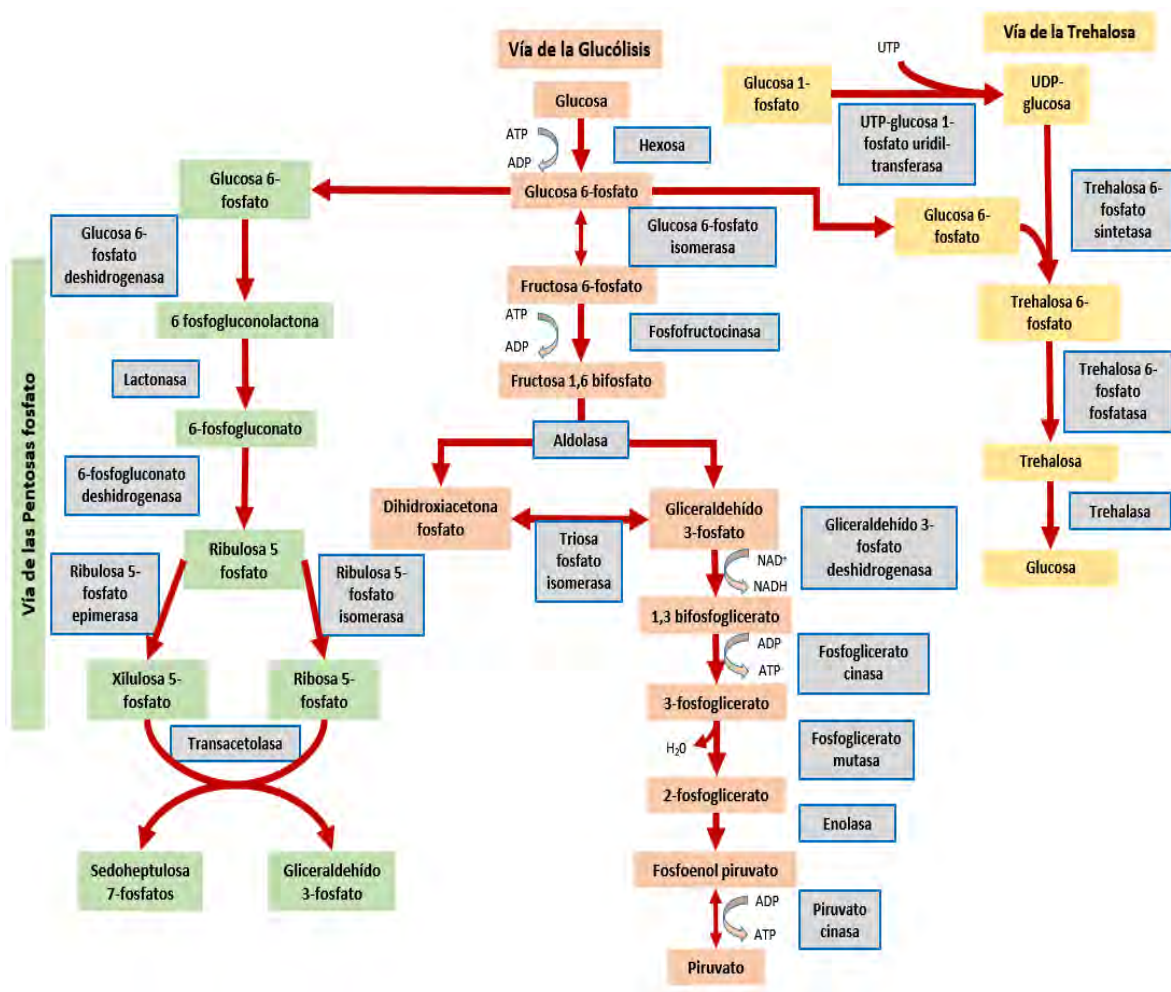
Como se mencionó anteriormente, el empleo de fármacos de uso común para tratar la microsporidiosis, ha conducido a la resistencia o reincidencia de la enfermedad tras cesar el tratamiento, así como severos efectos adversos en el humano, aunado a que no se cuenta con un fármaco específico para la microsporidiosis. Por tanto, es necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos para erradicar esta enfermedad infecciosa que causa graves trastornos en el humano.

Para esto, es importante identificar la biomolécula “ideal” del patógeno que pueda ser usada como blanco con potencial farmacológico (Hernández-Alcántara y cols., 2013). Muchos estudios se han enfocado en el diseño de moléculas antiparasitarias considerando vías energéticas, por lo que se han analizado las estructuras de diversas enzimas, sin embargo, es importante destacar que si la proteína blanco es similar (en estructura y función) a la homóloga humana, los centros catalíticos serán idénticos, puesto que son regiones estrictamente conservadas (Gómez-Puyou y cols., 1995), por lo que no sería conveniente desarrollar moléculas inhibitorias que tengan afinidad sobre dichas regiones. Con base en lo anterior, una estrategia empleada para desarrollar compuestos con afinidad

a sitios diferentes al centro activo y que logren inactivar o desestabilizar estructuralmente a la enzima en cuestión, es identificar regiones poco conservadas entre enzimas homólogas. Para lograr lo anterior, es importante identificar que proteínas pueden ser candidatos a considerarse como blancos farmacológicos y conocer aspectos importantes del organismo de estudio, que para este caso es *E. intestinalis*. Por lo que a continuación se mencionarán aspectos importantes a considerar en el desarrollo de compuestos con potencial farmacológico.

### **1.7.2 Enzimas de vías metabólicas de *E. intestinalis* como blanco para el diseño de nuevos compuestos con potencial farmacológico**

Considerando que *E. intestinalis* es un organismo parasitario, se ha descrito que algunas de sus vías metabólicas están disminuidas o nulas, tal es el caso del ciclo de Krebs, fuente importante de energía en forma de ATP en la mayoría de los organismos eucariontes. Sin embargo, se sabe que *E. intestinalis* no posee mitocondrias, en su lugar se han reportado unos organelos denominados mitosomas (Williams y cols., 2014). Hasta ahora se ha descrito que su única función es la importación de proteínas nucleares para su funcionamiento y mantenimiento; es por ello que dependen de su hospedero para el acarreamiento de nutrientes y sustratos energéticos (Burri y cols., 2006; Hacker y cols., 2014). En contraste, la vía glucolítica se ha descrito en diversas microsporidias, así como la secuencia genética de las enzimas de esta vía (Keeling y cols., 2010). Por otro lado, un caso extremo es *Enterocytozoon bieneusi* que solo cuenta con 2 genes implicados en el metabolismo de la glucosa y pentosas fosfato (Müller y cols., 2012). Tomando en cuenta lo anterior, la glucólisis es una vía importante, que entre otras cosas aportan metabolitos a la vía de las pentosas fosfato y de trehalosa (Figura 5), las cuales también son muy importantes para la sobrevivencia de estos organismos (Keeling y cols., 2010). Por tanto, las enzimas de la vía de la glucólisis pueden considerarse blancos potenciales para el diseño de compuestos con potencial farmacológico, en ese sentido ya se han propuesto muchas de estas enzimas pertenecientes a diversos organismos parasitarios como se describe en la siguiente sección.



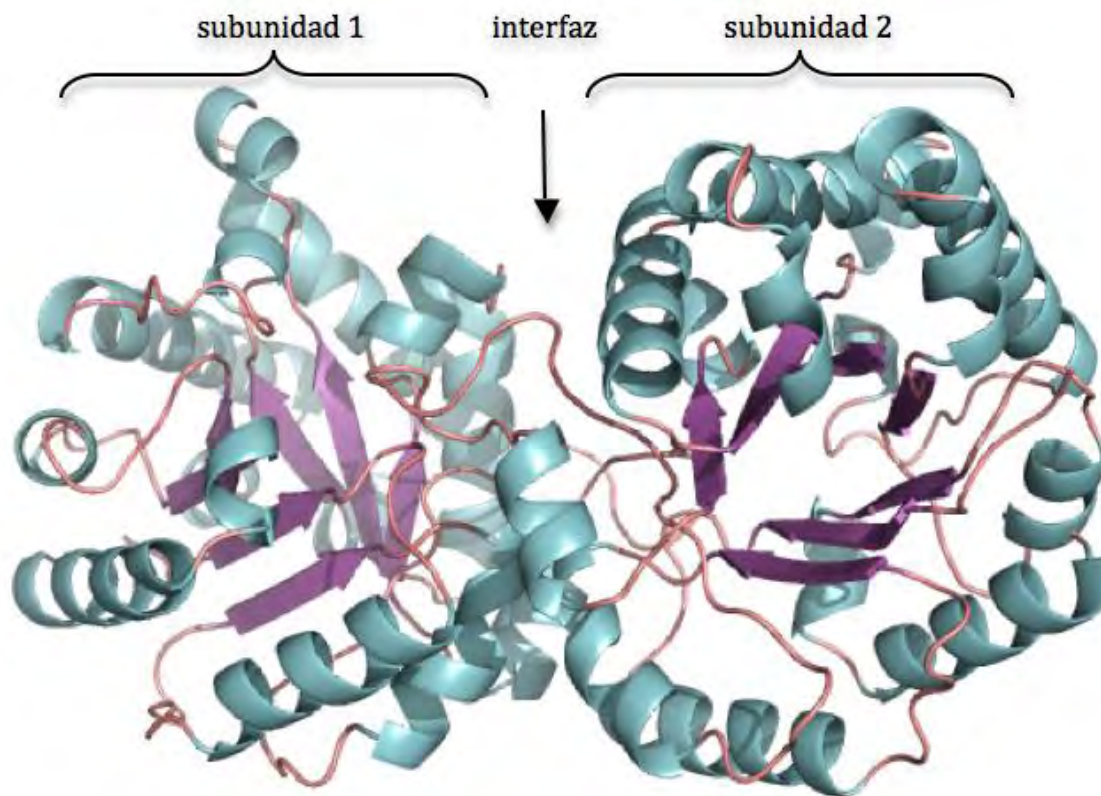
**Figura 5. Metabolismo de carbohidratos presentes en los microsporidias.** Basado principalmente en la glucólisis y del cual pueden derivarse hacia la vía de las pentosas fosfato y de trehalosa (Imagen adaptada de Keeling y cols., 2010).

### 1.7.3 Enzimas de la glucólisis como blancos para el diseño de compuestos farmacológicos

La glucólisis (del griego, glykos: dulce; lysis: pérdida, ruptura), es la vía metabólica en donde la glucosa es metabolizada a piruvato, con la generación de 2 moléculas de ATP, así como NADH por cada molécula de glucosa que entra a la vía. Esto determina un papel importante en el metabolismo energético al proveer significativamente la energía y otros metabolitos necesarios para la supervivencia de muchos organismos (Voet y Voet, 2011).

La vía glucolítica se constituye de diez enzimas implicadas en cada una de sus reacciones, una de las más caracterizadas tanto a nivel funcional como estructural es la triosa fosfato isomerasa (TIM) (Gómez-Puyou y cols., 1995) enzima homodimérica implicada en el quinto paso de la glucólisis. La TIM cataliza la interconversión del gliceraldehído 3-fosfato (GAP) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), que son los isómeros aldosa y cetosa respectivamente (Alvarez y cols., 2013; Voet y Voet, 2011). Estructuralmente, el monómero de la TIM

consiste de 8 láminas  $\beta$ , rodeadas por ocho  $\alpha$ -hélices unidas por asas formando la típica conformación barril  $\alpha/\beta$ . El homodímero se asocia por interacciones no covalentes entre dos monómeros constituyendo su forma catalíticamente activa (Figura 6).



**Figura 6. Estructura tridimensional del homodímero de la TIM de *Giardia lamblia* en formato de asas y listones (código PDB: 2DP3).** En aspectos generales se aprecia en color cian a las  $\alpha$ -hélices, en la parte interna de color violeta están las láminas  $\beta$ -plegadas, cada una de ellas unidas por asas en color café. Al centro de cada subunidad se localizan los sitios activos. Figura modelada con PyMOL (DeLano, 2002).

El sitio catalítico de la TIM consta de 3 aminoácidos altamente conservados entre las especies, que son la Lisina (Lys) 12, Histidina (His) 95 y el Ácido glutámico (Glu) 165 (numeración correspondiente a la secuencia de *Plasmodium falciparum*). Para realizar la catálisis, el Glu165 actúa como base para extraer un protón del C<sub>2</sub> del GAP y DHAP, en tanto que la Lys12 e His95 están involucradas en el acomodo correcto durante el estado de transición con el sustrato y la transferencia de protones, respectivamente (Samanta y cols., 2011). Por tanto, la TIM es considerada catalíticamente perfecta, ya que la velocidad de la reacción enzima-sustrato es limitada sólo por difusión del sustrato, esto es, que la formación de los productos tiene lugar con la misma rapidez con la que la enzima y el sustrato interaccionan en solución, de tal forma que, al aumentar la eficiencia catalítica de la TIM esto no producirá ningún aumento en la velocidad de reacción. Debido a la elevada eficacia de la interconversión entre GAP y DHAP se mantienen en el equilibrio:  $K = \frac{[GAP]}{[DHAP]} = 4.73 \times 10^{-2}$ , dicho de otra forma,  $[DHAP]$  es  $\gg [GAP]$  en el equilibrio. Pero mientras en GAP

se va consumiendo en la siguiente reacción de la glucólisis, mas DHAP es convertido en GAP para mantener su reacción en equilibrio (Voet y Voet, 2011).

La TIM se ha estudiado tanto a nivel funcional como estructural, proponiéndola como blanco de fármacos en diversos organismos patógenos (Gómez-Puyou y cols., 1995; Gao y cols., 1998; Garza-Ramos y cols., 1998; Olivares-Illana y cols., 2007; Rodríguez-Romero y cols., 2002). Puesto que sólo el GAP continua en la vía, la importancia de la TIM es aportar una molécula “extra” de GAP al interconvertir la DHAP hacia GAP, por tanto, es de gran relevancia energéticamente hablando, ya que debido a lo anterior se obtiene ganancia neta de ATP. De tal manera que, si se anula o interfiere a la TIM el aporte de GAP a la vía disminuirá, afectando a la producción de ATP y de otros metabolitos.

Con base en la importancia de la TIM, se han realizado estudios empleando métodos de modificación química de residuos de cisteína (Cys) con compuestos tiol-reactivos (derivatizantes de Cys) con el propósito de identificar regiones sensibles y poco conservadas a través de las cuales se afecte la función y/o estructura de ésta enzima. Por ejemplo, las TIMs de conejo, de levadura y de *Trypanosoma brucei* comparten una identidad aproximada del 38%. Dichos estudios demostraron que, a través de la Cys en posición 14 (Cys14) se podía inactivar a la enzima de *T. brucei* utilizando derivatizantes de Cys, como el metilmetanotiolsulfonato (MMTS) entre otros. Otro estudio evaluó el grado de inactivación enzimática de las TIMs de los tripanosomátidos *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania* a agentes derivatizantes de Cys. Al incubarse con MMTS, la actividad enzimática de la TIM de *T. cruzi* (TcTIM) fue 200 veces más resistente comparada con las otras TIMs. Esta diferencia de las tres enzimas hacia el MMTS, fue sugerida por las diferencias en la región adyacente de la Cys14 (Gómez-Puyou y cols., 1995; Ostoa-Saloma y cols., 1997). Con estos estudios, los investigadores propusieron a las TIMs de estos organismos como blanco para el diseño de antiparasitarios.

En trabajos más recientes, se determinó que la TIM de *Giardia lamblia* (GITIM) era sensible a los derivatizantes de Cys MMTS, 5,5'-ditiol-bis (2-ácido nitrobenzoico) [DNTB] y al 2-carboxietil metanotiolsulfonato (MTSCE) logrando su inactivación total. Posteriormente se demostró que a través de la Cys 222, se lograba inactivar a la enzima, por lo que se propuso como blanco de inactivación en la GITIM a la Cys222, en contraste, la TIM de humano fue resistente a dichos agentes químicos, demostrándose inactivación especie-específica (Enríquez-Flores y cols., 2011); inclusive un paso más adelante fue demostrar que la GITIM es inactivada por el omeprazol (fármaco utilizado para tratar la acidez estomacal), el cual es un inhibidor de la bomba de protones (PPI) que inhibe irreversiblemente a la H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa actuando sobre el residuo de Cys 813. Adicionalmente, se demostró el efecto citotóxico sobre los trofozoítos de *G. lamblia* de diferentes cepas, incluidas aquellas resistentes a benzimidazoles y nitazoxanidas (Reyes-Vivas y cols., 2014); posteriormente utilizaron otros PPIs (omeprazol, esomeprazol, pantoprazol, lansoprazol y rabeprazol) y demostraron que el rabeprazol fue el fármaco más efectivo, ya que inactivó la GITIM a menores concentraciones, todos ellos actuando sobre la derivatización de la Cys222 (García-Torres y cols., 2016). Con esto se demostró que los PPIs no solo son seguros en humanos, sino también eficaces para tratar a *G. lamblia*.



```

EiTIM --MKKNKLLGGNWKMNPSLKTLEIAKNFR-----QNFSGNDTFIAVFPFYIYFAKKMF- 52
PftIM --MARKYFVAANWKCNGTLESIKSLTNSFNNL--DFDPSKLDVVVFPVSVHYDHRKLL- 55
GltIM -MPARRPFIGGNFKCNGSLDFIKSHVAAIA---AHKIPDSVDVVIAPSAVHLSTAIAANT 56
EhTIM -MGAGKFVVGGNWKCNGTILASIELTKGVAASVDAELAKKVEVIVGVVFFIYIPKVQQILA 59
HsTIM MAPSRKFFVGGNWKMNGRKQSLGELIGTLN---AAKVPADTEVVCAPPTAYIDFARQKL- 56
LmTIM MSAKPQPIAAANWKCNGTTASIEKLVQVLN---EHII SHDVQCVVAPT FVHIPLVQATLR 57
TbTIM -MSKPQPIAAANWKCNGSQQLSELIDLFN---STSINHVDVQCVVASTFVHLAMTKERLS 56
TcTIM MASKPQPIAAANWKCNGSESLVPLIETLN---AATFDHDVQCVVAPTFLHIPMTKARLT 57

EiTIM ----PEYIKVGAQDCSQFEGGPYTGVEVSAMIKEMGAEYVII GHSERRRWFGETSEVIAK 108
PftIM ----QSKFSTGIQNVSKFGNGSYTGVEVSAEIAKDLNIEYVII GHFERRRKYFHETDEDVRE 111
GltIM ----SKQLRIAAQNVYLEGNGAWTGETSVEMLQDMGLKHVIVGHSERRRIMGETDEQSAK 112
EhTIM GEANGANILVSAENA-WTKSGAYTGEVHVGMVLDQVVPYVILGHSERRQIFHESNEQVAE 119
HsTIM ----DPKIAVAAQNCYKVTNGAFTGEISPGMIKDCGATWVVLGHSERRHVFGESEDELIGQ 112
LmTIM ----NPKYVVAENA-IAKSGAFTGEVSMPIKLDLGINWVILGHSERRTYGETDEIVAQ 112
TbTIM ----HPKFVIAAQNA-IAKSGAFTGEVSLPILKDFGVNWIVLGHSEERRAYYGETNEIVAD 111
TcTIM ----NPKFQIAAQNA-ITRSGAFTGEVSLQILKDYGIKWVVLGHSERRLYYGETNEIVAE 112

EiTIM KIRNARSQGLKVICIGEEKCRKQKGKYLDVIKDQLLSLGEDV-----KGDGIDIAYPEV 163
PftIM KLQASLKNLKA VVCFGESLEQREQNKTEVITKQVKAFVDLI----DNFDNVILAYEPL 167
GltIM KAKRALEKGMTVIFCVGETLDERKANRTMEVNIAQLEALGKELGESKMLWKEVVIAYPEV 172
EhTIM KVKVAIDAGLKVIACIGETE AQRIANQTEEVVAAQLKAINNAI---SKEAWKNIILAYEVP 177
HsTIM KVAHALAEGLVVIACIGEKLDEREAGITEKVVFQTKVIADNV---KDWSKVVLAYEVP 168
LmTIM KVAAA CEQGFVVIACIGETLQQREANQTAKVLSQTSIAIAKV---PKEAWSQIVLAYEVP 170
TbTIM KVAAA VAAAGFMVIACIGETLQERESGRTAVVVL TQIAAIAKKL---KKADWAKVVIAYEVP 169
TcTIM KVAQA CAAGFHVIVCVGETNEEREAGRTAAVVL TQLAAVAQKL---SKEAWHVVIAYEVP 170

EiTIM WAIGTGKIPTNDQIREVVS NVKKWG-----ESVGFEGRVIYGGSVSMLNCQSVLDVEEVD 218
PftIM WAIGTGKTATPEQAQLVHKEIRKIVKDTCEGEKQANQIRILYGGSVNTENCSSLIQQEDID 227
GltIM WSIGTGVVATPEQAEEVHVGLRKWFAEKVC AEGAQHIRI IYGGSSANGSNCEKLGQCPNID 232
EhTIM WAIGTGKTATPDQAQEVHQYIRKWMTENISKEVAEATRIYGGSVNPNANCNELAKKADID 237
HsTIM WAIGTGKTATPQAQAEVHEKLRGWLKSNVSDAVAQSTRIYGGSVTGATCKELASQPDVD 228
LmTIM WAIGTGKVATPEQAQEAHALIRSWVSSKIGADVAGELRILYGGSVSASNAKTYMKADIN 230
TbTIM WAIGTGKVATPQAQEAHALIRSWVSSKIGADVAGELRILYGGSVNGKNARTLYQQRDVN 229
TcTIM WAIGTGKVATPQAQAEVHELLRRVRSKLGADIAAQLRILYGGSVTAKNARTLYQMRDIN 230

EiTIM GFLVGGTSLKMD-FCMISSEMGTKR- 242
PftIM GFLVGNASLKES-FVDIIKSAM---- 248
GltIM GFLVGGASLKPE-FMTMIDILTKTRT 257
EhTIM GFLVGGASLDAAKFKTIINSVSEKL- 262
HsTIM GFLVGGASLKPE-FVDIINAKQ---- 249
LmTIM GFLVGGASLKPE-FRDIIDATR---- 251
TbTIM GFLVGGASLKPE-FVDIIKATQ---- 250
TcTIM GFLVGGASLKPE-FVEIIEATK---- 251

```

**Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de algunas TIM hasta ahora caracterizadas.** En sombreado amarillo están los residuos de cisteína presetes en cada una de las secuencias. EiTIM es la trifosfato isomerasa de *E. intestinalis*, PftIM es de *P. falciparum*, GltIM de *G. lamblia*, EhTIM de *E. histolytica*, HsTIM de humano, LmTIM de *L. mexicana*, TbTIM de *T. brucei* y TcTIM de *T. cruzi*. Alineamiento realizado en ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>)

Finalmente, y de manera reciente se caracterizó la TIM de *E. intestinalis* (EiTIM), en ese estudio se demostró que dicha enzima se inactiva eficientemente en presencia de los



agentes tiol-reactivos anteriormente descritos (Ríos-Pérez, Tesis en Preparación), por lo que se propone como un nuevo blanco con potencial farmacológico para ayudar de eliminar la microsporidiosis. En este trabajo se caracterizará a una mutante de Cys, con el propósito de establecer su papel en el proceso de inactivación de la EiTIM retada con derivatizantes de Cys

De acuerdo a lo anterior, la EiTIM posee en su estructura primaria 242 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 54 kDa en forma dimérica. Dentro de su secuencia aminoacil contiene 5 residuos de Cys ubicados en las posiciones 63, 123, 130, 208 y 232 (Figura 7); la Cys63 no tiene equivalente con algún otro parásito excepto por la Cys 67 en humano, la Cys 123 es la más conservada entre los organismos, en tanto que la Cys 208 es equivalente a la Cys 222 de *G. lamblia* y finalmente los residuos de Cys130 y Cys232 son residuos únicos comparados con las otras secuencias.

## 2. Justificación

La microsporidiosis es una enfermedad emergente de amplia distribución mundial, afecta principalmente a personas inmunocomprometidas, de la tercera edad y la población pediátrica. Actualmente los fármacos de uso común son poco eficaces, tienen efectos secundarios adversos, por lo que son poco seguros para combatir a esta enfermedad ya que se ha demostrado reincidencia tras cesar el tratamiento, así como factores que generen resistencia a dichos fármacos por parte de *E. intestinalis*. Por lo anterior, es necesario buscar nuevos blancos terapéuticos que ayuden a eliminar a este organismo. Recientemente se ha demostrado que la trifosfato isomerasa de *E. intestinalis* (EiTIM) es un buen candidato para el diseño de moléculas que inhiban su función. En este trabajo se propone caracterizar a la mutante C232A de la EiTIM como una región novedosa que no es equivalente con otra Cys que se haya estudiado anteriormente, el cual posee potencial de inactivación.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo general

Expresar, purificar y caracterizar la enzima recombinante triosafosfato isomerasa C232A del parásito intracelular *Encephalitozoon intestinalis*.

#### 3.2 Objetivos particulares

- I. Obtener mediante mutagénesis dirigida por PCR, la mutante sencilla de cisteína sustituida por alanina en la posición 232 (694\_696TGC>GCG) del gen de la *eitim*.
- II. Clonar a la mutante 694\_696TGC>GCG en los vectores de clonación y sobreexpresión pJET 1.2/blunt y pET3a-HisTEVP respectivamente.
- III. Expresar la mutante EiTIM C232A en células de *Escherichia coli* BL21 DE3 pLySs.
- IV. Purificar la EITIM C232A mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC).
- V. Determinar algunos parámetros cinéticos ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ) de la EiTIM C232A.
- VI. Evaluar el efecto sobre la actividad enzimática en la EiTIM C232A en ausencia y presencia de los derivatizantes de cisteínas: MMTS, MTSCE y DTNB.
- VII. Caracterizar estructuralmente por medios espectroscópicos a la EiTIM C232A en ausencia y presencia de los derivatizantes de cisteínas: MMTS, MTSCE y DTNB.

### 4. Hipótesis

La EiTIM C232A al ser una Cys sin equivalencia en otros organismos, es una región potencial de inactivación de la enzima ante la presencia de los derivatizantes MMTS, MTSCE y DTNB. Por lo que al sustituir dicha Cys por Alanina se evitará su inactivación al ser retada con los agentes derivatizantes.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Obtención del gen de la *eitim*

La secuencia del gen de la *EiTIM* (wt) se obtuvo de la base de datos del GeneBank (No. de acceso NCBI: XM\_003073826.1). Como estrategia para generar la recombinante, a dicha secuencia se le añadió en el extremo 5' y 3' las secuencias de restricción *NdeI* y *BamHI*, 5'-CATATG-3' y 5'-GGATCC-3' respectivamente, con el propósito de clonar dicho gen en diferentes plásmidos comerciales. En la secuencia del gen, de manera interna este posee un sitio de restricción para *NdeI*, por lo que se mutó. Adicionalmente, se optimizó la secuencia para expresar la correspondiente enzima recombinante de manera heteróloga en bacterias de *Escherichia coli*. Una vez optimizado el gen de la *EiTIM* y añadidos los sitios de restricción, se sintetizó químicamente (Ríos-Pérez, Tesis en preparación).

El gen de la *eitim* clonado en el vector de pET3aHis en el anterior trabajo, se obtuvo a partir del cultivo en células de *E. coli* Top10. Las células se mantuvieron a 37 °C en agitación toda la noche. Posteriormente se aisló el plásmido con el kit comercial GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific); Posteriormente dicho cultivo se mantuvo a 4 °C y se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el botón fue solubilizado con amortiguador de resuspensión, suplementado con RNAsa según el protocolo del fabricante (GeneJet Plasmid Miniprep Kit, Thermo Scientific) para la extracción del pDNA. Para corroborar la integridad del pDNA, se determinó su concentración espectrofotométricamente con un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) y su pureza con un gel de agarosa, se tomó una alícuota del pDNA más 2 µL de GelRed (Biotium) y amortiguador de carga. Dicho DNA plasmídico (pDNA) se usará como templado en la PCR.

### 5.2 Diseño de oligonucleótidos para la 694\_696TGC>GCG

Para realizar la mutación de Cys 232 por alanina (Ala) [694\_696TGC>GCG], se utilizó el gen de la *eitim* wt, por lo que se diseñaron oligonucleótidos que incluyeran la mutación deseada sustituyendo el codón correspondiente de Cys por Ala como se observa en la Tabla 3. Estos fueron sintetizados químicamente en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT-UNAM). Posteriormente y mediante la técnica de mutagénesis dirigida por PCR se obtuvieron cada uno de los amplicones de como sigue:

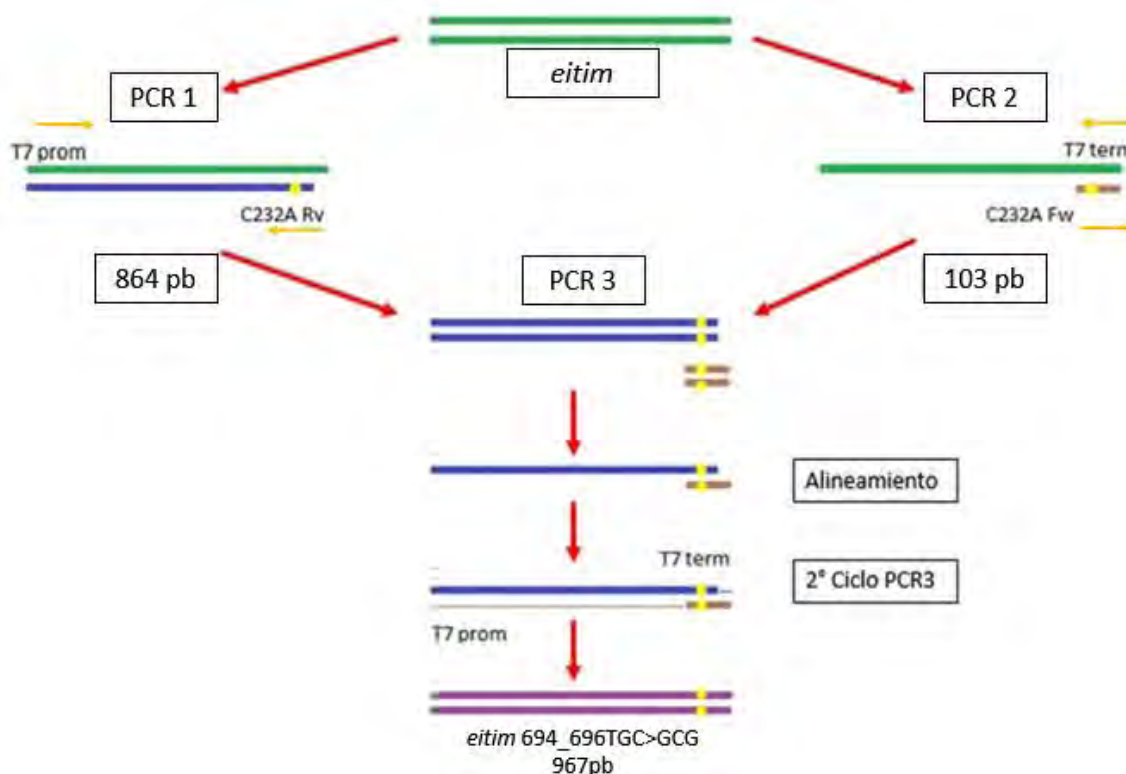
Se construyó la mutante sencilla de Cys sustituida por Ala, mediante PCR, para ello se diseñaron oligonucleótidos de 19 pb complementarios con el codón a cambiar de la secuencia templado de la *eitim*. Esta modificación requiere de tres pasos (Figura 8):

1. PCR 1. El amplicón resultante es aquel entre la región del oligonucleótido directo externo del plásmido y el reverso mutagénico (T7 promotor y c232a *Rv*).
2. PCR 2. Se amplifican los extremos contrarios, en este caso serán los oligonucleótidos en sentido directo del mutagénico y el reverso del plásmido (c232a *Fw* y T7 terminador).

3. PCR 3. En este paso los amplicones obtenidos en la PCR 1 y 2, ambos complementarios entre sí, se usaron como templado para esta reacción, así como los oligonucleótidos directo y reverso del plásmido (T7 promotor y T7 terminador).

**Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para la mutante 694\_696TGC>GCG de la *eitim*.** En el codón subrayado se indica la sustitución de Cys por Ala

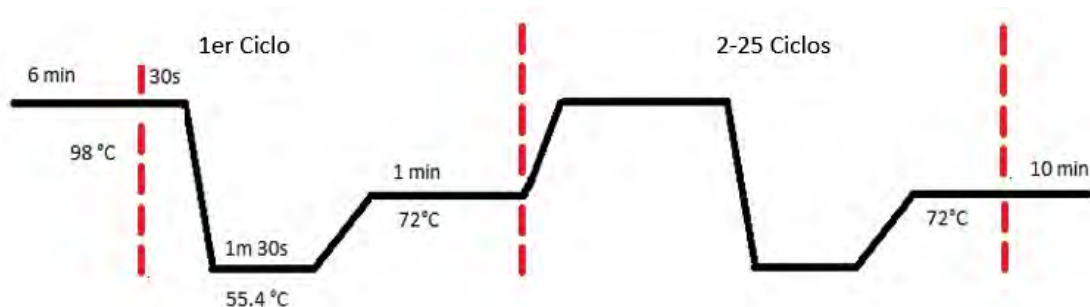
Cys	Secuencia de oligonucleótidos mutagénicos	
	Directo (Forward o Fw)	Reverso (Reverse o Rv)
232	5' - TGGACTTC <u>GCG</u> ATGATTAG - 3'	5' - CTAATCAT <u>CGC</u> GAAGTCCA - 3'



**Figura 8.** Pasos representativos de la mutagénesis sitio dirigida mediante PCR, para generar el gen de la *eitim* 694\_696TGC>GCG.

Para la PCR se probaron gradientes de temperatura (50 a 60 °C) con el fin de lograr una reacción eficiente de PCR. La condición final es la que se muestra en la Figura 9. Las reacciones se llevaron a cabo con las siguientes concentraciones 200 ng pDNA-*eitim*, 200 ng de los oligonucleótidos Fw y Rv, 0.2 mM de dNTP's, amortiguador Phusion HF 1X, 0.04 U/μL de *Taq* (Phusion HF, Thermo Scientific). Se aplicó un programa de 26 ciclos. Finalizado el tiempo de reacción, se preparó un gel de agarosa al 1% para cargar el producto de PCR. Las masas moleculares esperadas de las PCR's 1, 2 y 3 son de 864 pb, 103 pb y 967 pb respectivamente. Una vez identificadas las bandas correspondientes se

cortaron y purificaron; para purificar dichos fragmentos se utilizó el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante., enseguida se realizó una ligación con el vector pJET 1.2/blunt (Figura 10), las condiciones fueron las siguientes: una vez purificado el fragmento de la PCR3, se usó 12 µL del pDNA, 1 µL del pJET, 1 µL la T4 DNA ligasa (Thermo Scientific), 15 µL del amortiguador y un 1 µL de agua grado biología molecular, incubándose 2 horas a 22 °C.



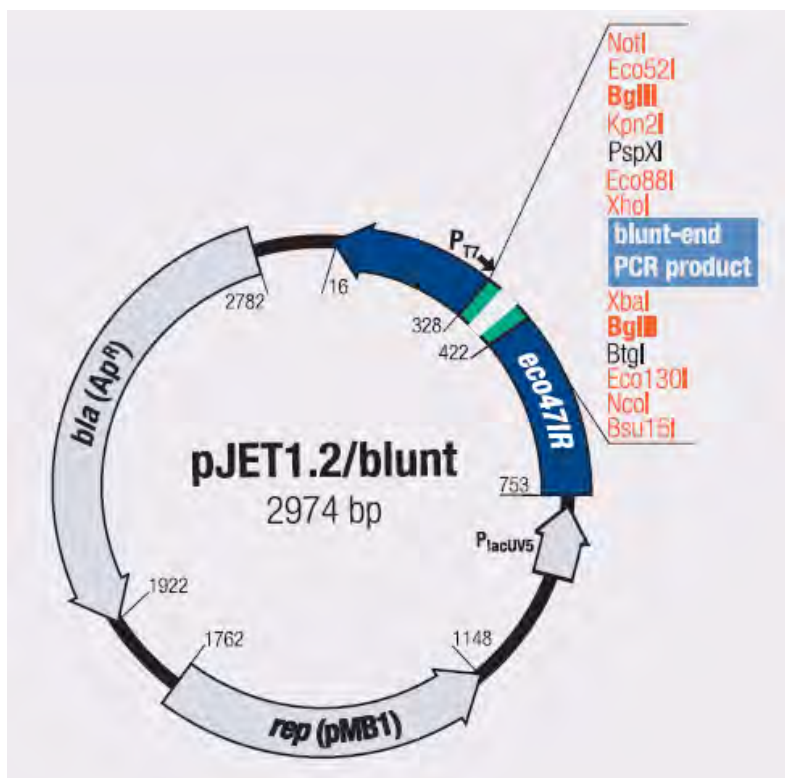
**Figura 9.** Se muestran las condiciones de la PCR por el método de mutagénesis sitio dirigida, así como los ciclos para la amplificación de los fragmentos en la *eitim* 694\_696TGC>GCG.

### 5.3 Clonación de la mutante de *eitim* 694\_696TGC>GCG en los vectores de replicación y de sobreexpresión

Obtenido el producto de la ligación, se transformaron en células competentes Top10 (mantenidas a -70 °C), para el cual se dejaron por diez minutos a 4 °C, en ambiente estéril se vertió el producto de la ligación y se mezcló con las células competentes, se mantuvieron por 30 min a 4 °C, transcurrido el tiempo se colocó el tubo a 42 °C durante 40s e inmediatamente fue transferido a 4 °C incubando 2 min. En esterilidad, se le añadió a la mezcla 350 µL de medio LB y se incubó por 40 min a 37 °C, con agitación. Posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm por 40s, se descartó casi todo el sobrenadante y el restante se usó para resuspender el botón formado, dicho volumen fue usado para sembrarlo en cajas Petri con agar-LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL). Realizada la transformación, se incubó a 37 °C toda la noche. A partir de las clonas obtenidas, se tomó una para realizar un precultivo para su criopreservación a -70 °C con glicerol al 9%. Obtenida las colonias, se monitorearon para localizar las clonas positivas.

Como pruebas para corroborar que el plásmido con la *eitim* 694\_696TGC>GCG está presente tras la ligación, se realizó una PCR de cultivo, para la cual se tomó una de las colonias obtenidas y se hicieron parches en una caja Petri con agar-LB + ampicilina; a partir de esto se tomó 1 mL de medio de cultivo LB + amp y se tomó una asada de los parches hechos previamente, para mantenerlos por 2 hrs a 37 °C. Posteriormente, con tubos de PCR etiquetados, se preparó una reacción para la PCR2, usando como templado 1µL de los cultivos. Finalizado los ciclos, los amplicones obtenidos fueron cargados en agarosa al 1% y se sometieron a electroforesis. La segunda prueba consistió en doble digestión con *NdeI/BamHI* a partir de clonas que resultaran positivas, para ello se utilizaron las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* (Thermo Scientific), se tomó 2 µL del pDNA que contenía el gen de la *eitim*, 0.5 µL de las enzimas de restricción y 1 µL del amortiguador Tango 10X (Thermo Scientific) llevados a 20 µL con agua grado biología molecular, posteriormente se incubó a 37 °C por 2 horas. Esto se depositó en un gel de agarosa al 1% y se corrió

electroforéticamente. Para la última prueba, se tomó en cuenta que el plásmido pJET posee dos sitios de corte para *Bg*II, por lo que se utilizó el Amortiguador D 1X, BSA 0.5 µL, 3 µL del pDNA, estos se incubaron por 1 h 30 min a 37 °C, para finalmente ser cargados en un gel de agarosa al 1%. Para corroborar la mutación y fidelidad del gen, este se secuenció por el método de Sanger (Secuenciación automática por electroforesis capilar).

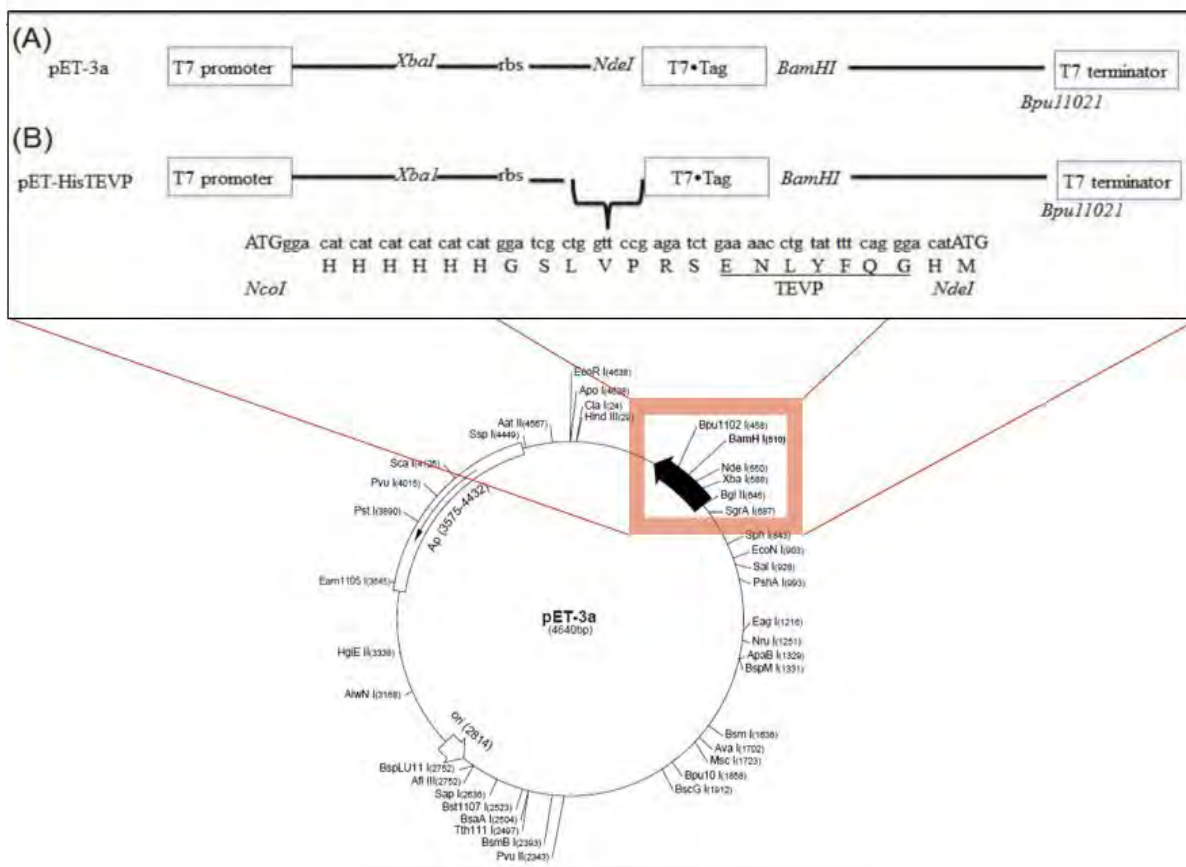


**Figura 10. Mapa representativo del vector pJET 1.2/blunt (Fermentas).** Se muestra que, dentro del sitio de clonación, este posee dos sitios de restricción para *Bg*II tanto en upstream como en downstream.

Corroborada la fidelidad de la secuencia genética, así como la correspondiente mutación de la *etit* 694\_696TGC>GCG, se criopreservó la clona positiva en glicerol al 9%. Se tomó una asada y se sembró en medio LB con ampicilina como precultivo para obtener el pDNA. Éste fue digerido con las enzimas de restricción *Nde*I y *Bam*HI para liberar el gen e insertarlo al vector de sobreexpresión pET3a-HisTEVP (Figura 11) mediante una reacción de ligación previamente descrito. La transformación se llevó a cabo en células competentes Top10 sembradas en cajas Petri con agar-LB para obtener las clonas positivas. Una vez obtenidas las colonias, se eligieron algunas para su monitoreo. Se realizaron parches de las colonias y se cultivaron para realizar PCR de cultivo, empleando los oligonucleótidos externos. Los amplicones obtenidos fueron corridos electroforéticamente en geles en agarosa al 1%. A partir de los resultados obtenidos, se eligieron colonias positivas y se realizó un parche para la obtención del pDNA. Enseguida se aisló el pDNA y se realizó doble digestión con *Nde*I/*Bam*HI, finalmente se secuenció en el IBT-UNAM.

Corroborada la secuencia de la *etit* 694\_696TGC>GCG en el pET3a-HisTEVP, se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS para expresar la EiTIM C232A. En cajas

Petri con agar-LB con ampicilina se realizó el sembrado de las células incubándose a 37 °C durante toda la noche.



**Figura 11. Mapa representativo del vector pET3a-HisTEVP.** Mapa del plásmido pET-3a, el cual está basado el plásmido de expresión y donde se indica el lugar de inserción del gen *eitim*. Se muestran los aminoácidos “extra” que permitirán la purificación de las proteínas recombinantes con etiqueta de histidinas.

#### 5.4 Purificación de la EITIM C232A

El gen de la mutante *eitim* 694\_696TGC>GCG fue subclonado en el vector de sobre expresión pET3a-HisTEVP, que contiene una etiqueta de 6 histidinas y 16 aminoácidos extra en su extremo amino terminal que permitirán su purificación en un solo paso (Figura 11). Se preparó un precultivo de células de *E. coli* BI21 (DE3) pLysS en 10 mL de medio LB suplementado con ampicilina a 100 µg/mL se incubaron en agitación constante por 16 horas a 37 °C. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió con 1 mL de medio LB nuevo, esto se adicionó a 1 L de medio LB suplementado con ampicilina. Se incubó a 37 °C hasta obtener una densidad óptica de 0.8 de absorbancia, la cual fue medida espectrofotométricamente a 600 nm, en este punto se indujo la expresión de la EITIM C232A adicionando 0.4 mM de IPTG y se incubó a 30 °C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó el cultivo a

5000 rpm por 5 minutos a 4 °C, el botón resultante se resuspendió con amortiguador de lisis (Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 50mM) suplementado con 1mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) disuelto en DMSO, esto se sonicó en frío durante 45 segundos con reposo de 1 min 15 seg, este proceso fue repetido 6 veces, posteriormente se centrifugó el sonicado a 9000 rpm por 1 hora a 4 °C.

Para purificar la proteína se empleó el método de cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) siendo níquel dicho metal, la resina fue equilibrada en una columna con 5 volúmenes de amortiguador de lisis; posteriormente se tomó el sobrenadante del centrifugado, se mezcló con la resina y se mantuvo en agitación a 4 °C durante 30 minutos. Enseguida se filtró el sobrenadante y se lavó tres veces con el mismo amortiguador. Para eluir la proteína se prepararon 30 mL de amortiguador de lisis más imidazol a 200 mM (se reajustó el pH a 8.0). Ésta solución se mezcló con la resina y se dejó en agitación durante 30 min. Se eluyó la proteína y se concentró por ultrafiltración en un tubo centrífugo de paso de corte de 30 kDa (Amicon Ultra, Millipore). Una vez concentrada la proteína se precipitó con sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 75%, y se mantuvo a 4 °C hasta su uso. Para solubilizarla se tomó el precipitado y se centrifugó a 12,000 rpm, 20 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió con amortiguador de digestión (Tris 50mM pH 8.0, EDTA 0.5 mM). Se determinó la concentración de la enzima a 280 nm con un espectrofotómetro y se utilizó el coeficiente de extinción molar de acuerdo a Pace y cols., 1995, el cual es 1.255 (absorbancia al 0.1% de la proteína en 1 g/L)

Para eliminar la etiqueta de histidinas y los aminoácidos extra en el extremo N-terminal, se utilizó la proteasa del Virus del Tabaco (TEVP), la incubación fue en relación 30:1 (enzima-TEVP), una vez mezclados enzima y proteasa se añadió 1 mM de DTT, esto se dejó por 18 hrs a temperatura ambiente. Al día siguiente el volumen de la digestión fue mezclado con la resina IMAC-Níquel previamente equilibrada en amortiguador de trietanolamina 100 mM, pH 7.4 (TEA). El eluido se concentró en un centrífugo y al obtener el volumen final, se añadió glicerol al 50%; se calculó la concentración de la enzima midiendo espectrofotométricamente a 280 nm, se etiquetó y se mantuvo a -20 °C hasta su uso.

Para determinar el grado de pureza de la enzima, se monitoreó cada etapa de la purificación, por lo que se tomaron alícuotas de cada uno de los pasos. Dichas muestras se mezclaron con amortiguador de carga Von Jagow y DTT, se calentaron un minuto en agua a 100 °C. Estas muestras se cargaron en un gel desnaturante de acrilamida-bisacrilamida al 16% (SDS-PAGE) y se corrieron mediante electroforesis a voltaje constante.

## **5.5 Determinación de las constantes catalíticas de la EITIM C232A**

Con la finalidad de conocer los principales parámetros cinéticos de la EITIM C232A primeramente se determinó la actividad enzimática mediante un ensayo acoplado, La mezcla de reacción (MR) contenía amortiguador de trietanolamina 50 mM (TEA), 0.2mM de NADH, y 0.9 U de  $\alpha$ GDH, la concentración del sustrato se varió de 0 a 5 mM. La actividad de la EITIM se midió con 60 ng/mL, para lo cual primero se llevó la proteína a 1 mg/mL, a partir del cual se toma un 1  $\mu$ L y se diluye en 99  $\mu$ L de TEA. Posteriormente se tomó de dicha dilución, 3  $\mu$ L y mezclados con 497  $\mu$ L de MR en una celda. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado y fueron medidos a 25 °C. La actividad fue monitoreada



espectrofotométricamente a 340 nm, siguiendo la señal del NADH. En las condiciones descritas por cada molécula de DHAP que la TIM produce a partir del GAP, se consume una molécula de NADH, por lo que para calcular la velocidad de la EiTIM se usó la ecuación 1 (Becerril-Velasco, 2015):

$$V = \frac{m \text{ Abs}}{(\varepsilon) * [E]} \quad \text{Ecuación 1}$$

V= velocidad de consumo del sustrato  $\mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * \text{mg}^{-1}$   
 mAbs = pendiente del consumo del NADH  
 $\varepsilon$ = coeficiente de extinción molar del NADH,  $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$   
 [E]= concentración de la enzima expresada en miligramos (mg)

Para determinar los principales parámetros cinéticos se utilizó el sistema acoplado variando la concentración del sustrato gliceraldehído 3-fosfato (GAP). Una vez obtenidas las actividades para cada condición, esto se graficó en función de la concentración del sustrato utilizada y los resultados se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten (Voet y Voet, 2011).

$$V(s) = \frac{V_{\text{max}} * [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ecuación 2}$$

[S]= concentración de sustrato,  
 V(s)= velocidad de la enzima a la concentración de sustrato [S]  
 V<sub>max</sub>= velocidad máxima de la enzima  
 K<sub>m</sub>= constante de Michaelis.

## 5.6 Determinación de la sensibilidad enzimática de la EiTIM C232A con agentes derivatizantes de Cys.

Para determinar la actividad de la EiTIM C232A retada con los agentes tiol reactivos, se incubó dicha enzima a una concentración de 0.5 mg/mL (esta concentración se estimó con base en la constante de disociación de la EiTIM wt), con concentraciones crecientes de los derivatizantes (0 a 250  $\mu\text{M}$  de MMTS, MTSES y DTNB), durante 2 h a 37 °C. Terminado el tiempo de incubación, se tomó una alícuota y se diluyó cincuenta veces con TEA, posteriormente se tomaron 3  $\mu\text{L}$  de la dilución y se añadió a una celda con 497  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción para tener una concentración final de 60 ng/mL. La actividad de cada condición se determinó midiendo la absorbancia del NADH a 340 nm como previamente se describió. Los resultados se expresan como porcentaje de actividad vs concentración del derivatizante, donde el 100% es la actividad de la enzima incubada en ausencia de derivatizante.

## 5.7 Determinación de la estructura secundaria y estabilidad térmica de la EiTIM C232A mediante Dicroísmo Circular (DC) y Temperatura media de desnaturalización (T<sub>m</sub>).

Con la finalidad de obtener información sobre los probables cambios estructurales de la mutante en ausencia y presencia de los derivatizantes, se utilizó la técnica de dicroísmo circular. La técnica consiste en polarizar dos haces de luz, una girando hacia izquierda y otra hacia la derecha; al interactuar con los planos formados por los enlaces peptídicos, la luz se desviará, dando cambios en la elipticidad. Si se tiene la condición de control, así como la experimental, se pueden medir los espectros de dicroísmo de ambos estados y en consecuencia se podrán cuantificar los probables cambios estructurales de las proteínas en ciertas condiciones (Greenfield, 2006).

El experimento se realiza con un espectropolarímetro midiendo el dicroísmo circular (DC) en un barrido de 220 a 190 nm a una concentración de proteína de 0.5 mg/mL (con una cantidad total de 0.15 mg de proteína) a 25 °C. Los resultados de expresan como elipticidad molar ( $\theta$ ), la cual se define en la ecuación 3 (Enríquez-Flores y cols.,2008):

$$\theta = \frac{\theta_{obs}(MRW)(100)}{lc} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde  $\theta_{obs}$  es la elipticidad media por residuo expresada en grados  $c$  es la concentración de la proteína en mg/mL; MRW es la masa media de los residuos de aminoácidos (108.43) y  $l$  es el paso de luz en centímetros.

En relación a la estabilidad térmica, para medir los probables cambios a nivel de estructura terciaria, estructural y que, en nuestro caso, las implicaciones en la estabilidad ocasionada por la mutación efectuada y/o por la derivatización de la enzima. Se utilizó la muestra de la que se obtuvo el DC, por lo que se evaluó la estabilidad térmica (T<sub>m</sub>) por el cambio de la señal de DC a 222 nm, en un intervalo de temperatura de 20 a 90 °C, el cual fue incrementando 1 °C/min. De los datos obtenidos, se calculó la T<sub>m</sub> utilizando la ecuación 4 (Enríquez-Flores y cols.,2008):

$$fD = \frac{yN - y}{yN - yD} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde  $fD$  son las subunidades de la fracción desnaturalizada,  $yN$  y  $yD$  son los valores de elipticidad de las fracciones nativa y desnaturalizada, respectivamente. Ambos parámetros fueron extrapolaciones lineares de las porciones inicial y final de la curva de “ $\gamma$ ” como una función de la temperatura

## 5.8 Determinación de la Fluorescencia extrínseca (FE) en la EiTIM C232A.

Esta técnica se basa en la excitación de los electrones por una fuente de luz ocasionando que el electrón cambie a un estado energético mayor al basal, este proceso es inestable por lo que el electrón regresara a su estado original, emitiendo un fotón de menor energía al incidente.

Para la FE se usó la molécula 1-anilino-8 naftalentolueno (ANS) como sonda, esta posee la característica de ser hidrofóbica y emitir grandes cantidades de fluorescencia en ambientes hidrofóbicos cuando es excitada por una fuente de luz. Para los experimentos, la EiTIM C232A fue retada previamente en ausencia o presencia de los derivatizantes MMTS, MTSES o DTNB. Después de inactivada, esta se filtró por una columna de 1 mL que contenía Shepadex G-50 pre-equilibrada con amortiguador TEA, para eliminar el exceso de derivatizante sin interactuar. Se recalibró la concentración de proteína midiendo espectrofotométricamente a 280 nm y la muestra se utilizó en los experimentos de FE. Para medir la FE, se utilizó la EiTIM a 0.3 mg/mL en una celda de cuarzo para fluorimetría. La muestra se excitó a 395 nm y se midió su espectro de emisión de fluorescencia entre 400 y 600 nm, con una velocidad de escaneo de 200 nm/min con slits de excitación y de emisión de 10 nm. Posteriormente se adicionaron 15  $\mu$ L de ANS a 33 mM y se midió el espectro de emisión de FE como se indicó. Este mismo procedimiento se realizó para la EiTIM derivatizada con MMTS, MTSES o DTNB, registrándose en todos los casos el espectro de emisión de fluorescencia en ausencia y presencia del ANS. Los resultados se expresan como intensidad de fluorescencia para cada condición experimental y en cada caso se les restó el blanco que consistió en el amortiguador con ANS.

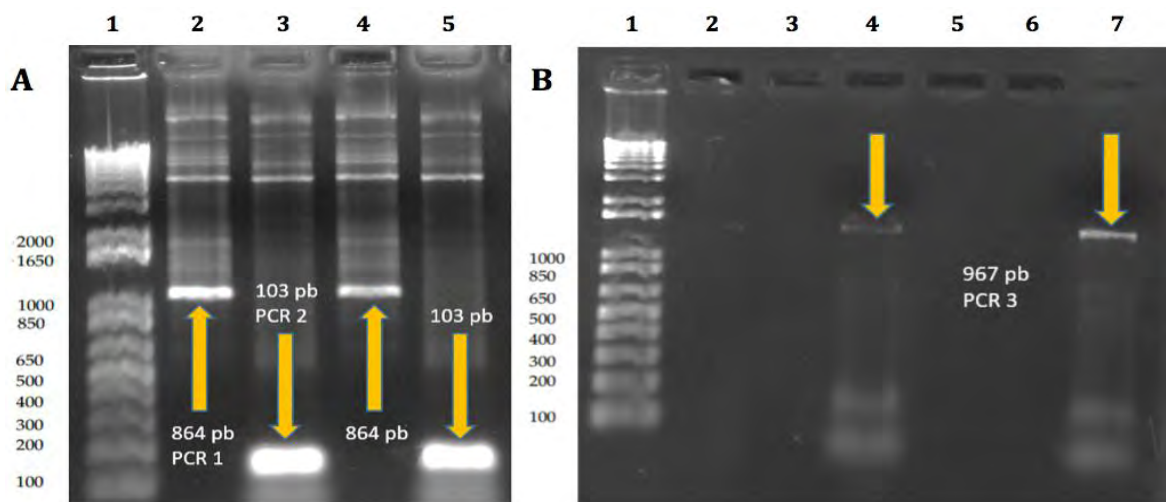
## 6. Resultados

### 6.1 Diseño de oligonucleótidos para la *eitim* 694\_696TGC>GCG

En el trabajo de Ríos-Pérez (Tesis en preparación) se describe la estrategia para obtener el gen de la EiTIM (wt) mediante síntesis automatizada y se clonó en el vector de expresión pET3a-HisTEVP.

Para el diseño de oligonucleótidos *Fw* y *Rv* de la *eitim* 694\_696TGC>GCG se consideró la secuencia optimizada del gen de la *eitim* wt, los oligonucleótidos se utilizaron para sustituir la Cys por Ala en posición 232 en la posición correspondiente del codón de nucleótidos. Una vez sintetizados los oligonucleótidos se llevó a cabo la técnica mutagénesis sitio dirigida por PCR para obtener la mutación deseada.

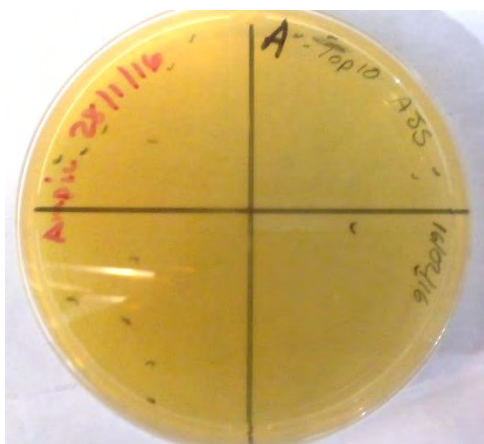
En la Figura 12, se muestran los resultados obtenidos. Los amplicones de las PCR 1 y 2 corresponden a las masas moleculares esperadas de 864 pb (c232a *Rv*) y de 103 pb (c232a *Fw*) como se señala en la Figura 12-A. Estos fragmentos fueron purificados y se utilizaron para el tercer paso de la PCR, en la Figura 12-B se muestra en los carriles 4 y 7 bandas con masa molecular aproximada de 967 pb, que corresponden a la masa molecular esperada.



**Figura 12. Gel de agarosa al 1%, pasos de PCR para obtener la mutante *eitim* 694\_696TGC>GCG.** A) Carril 1 MPM 1kb plus, carril 2 y 4 se amplificó una banda correspondiente a la masa molecular esperada de 864 pb para la PCR1, en tanto que en el carril 3 y 5 se observa una banda de 103 pb para la PCR2. B) Amplificados de la PCR3 de la C232A, la flecha indica una banda de 967 pb en los carriles 4 y 7. [Nota técnica: Las masas moleculares no coinciden en ocasiones con el marcador de peso GelRed]

## 6.2 Clonación de la mutante *eitim* 694\_696TGC>GCG en el vector de replicación y de expresión.

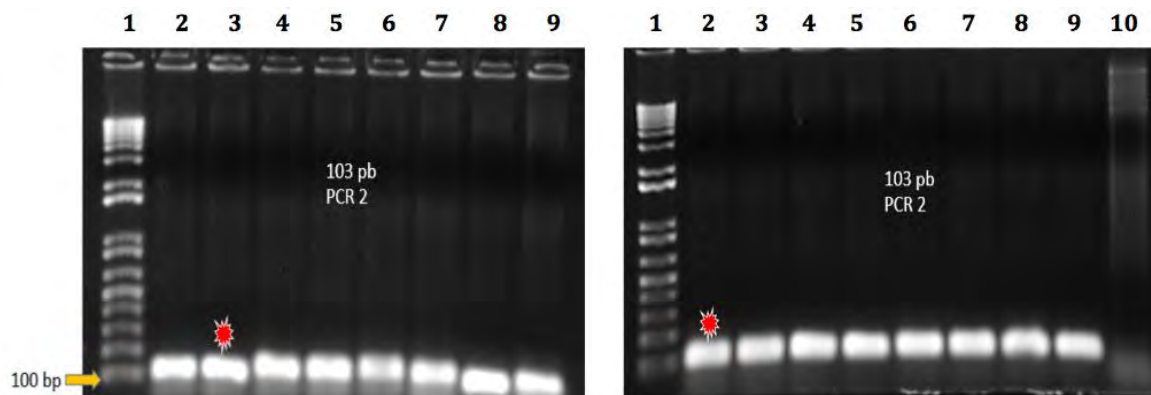
Para clonar el gen de la *eitim* 694\_696TGC>GCG, se llevó a cabo la ligación con dicho DNA en el plásmido pJET y posteriormente se transformaron en células de *E. coli* Top10 y sembradas en placas de agar-LB. Después de incubarlas a 37 °C toda la noche y obtener colonias como se ve en la Figura 13.



**Figura 13. Placar de agar-LB.** Se obtuvieron colonias tras la ligación en el vector pJET, las marcas en tinta negra corresponden a las colonias elegidas con las que se realizó el seguimiento y comprobación de que fueran positivas.

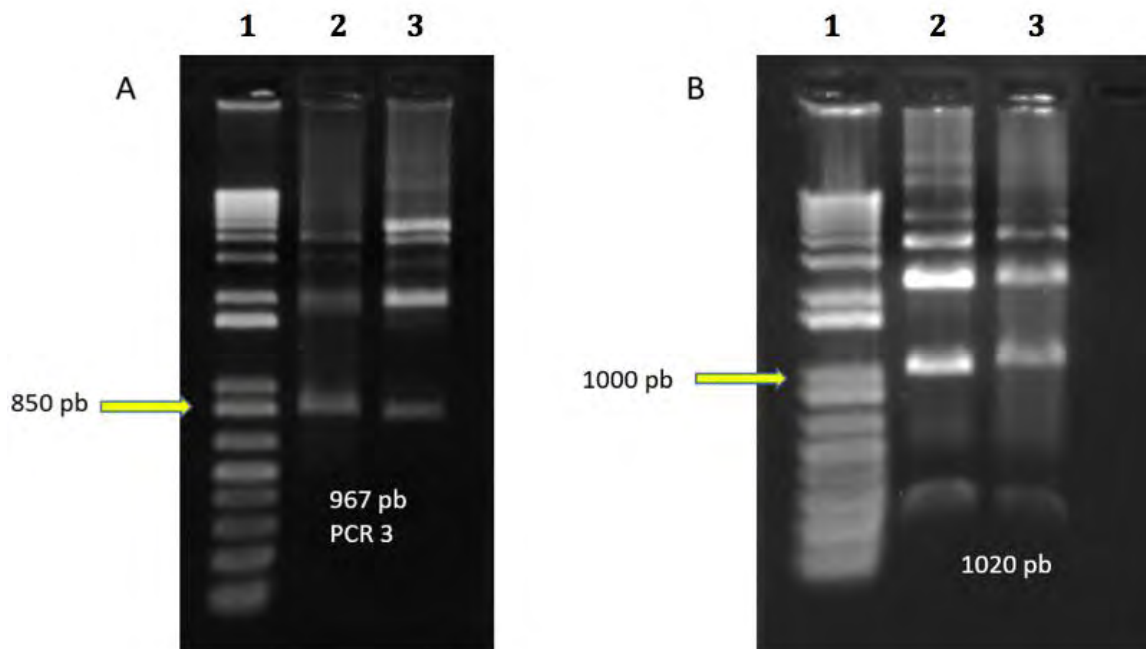
En las pruebas realizadas para verificar que las colonias portaran el vector con el inserto, se obtuvieron resultados positivos como se observa en la Figura 14, se amplificaron fragmentos de aproximadamente 100 pb correspondientes a un fragmento del gen ya que

se utilizó el *Fw* mutagénico y el T7 terminador, corroborando que nuestra mutante de interés se encontraba en dichas clonas.



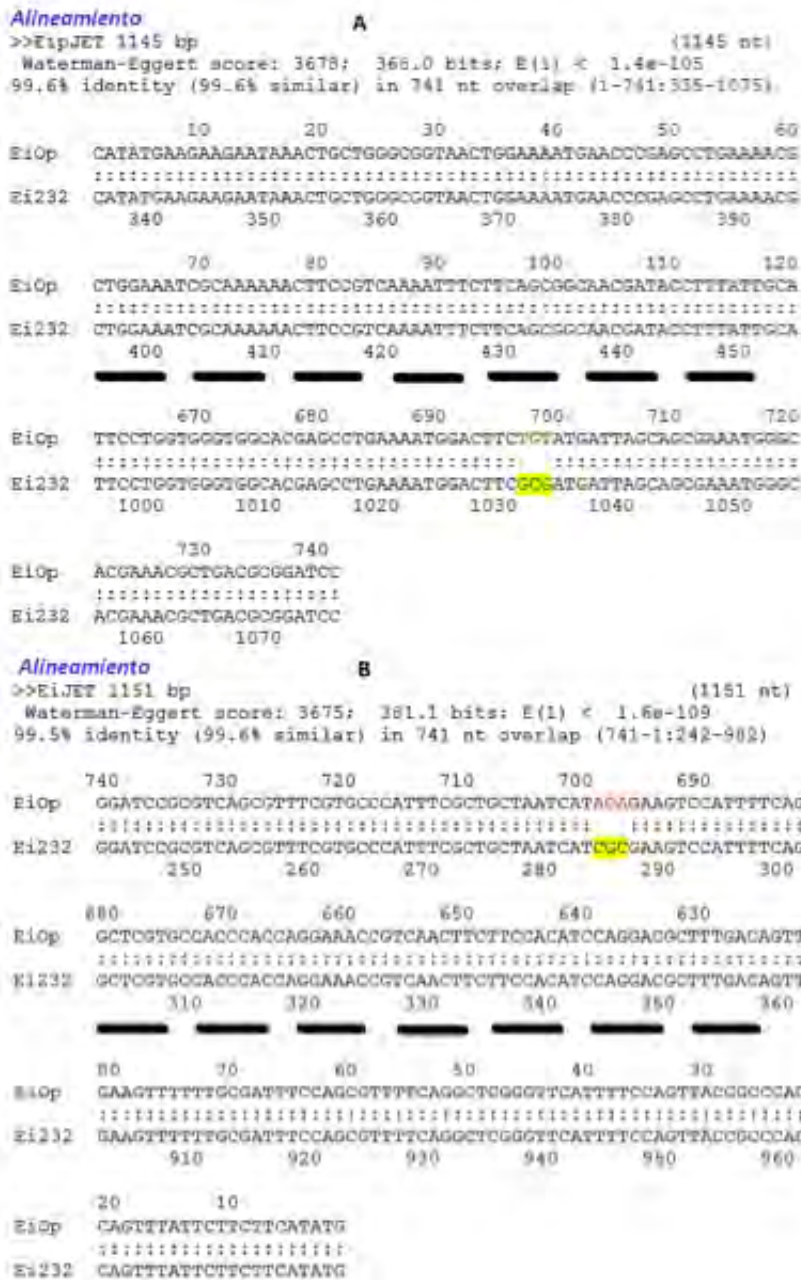
**Figura 14. Gel de agarosa 1%, PCR de cultivo de clonas elegidas al azar.** Se probó a distintas condiciones el amplificado de la banda producto de la PCR 2. Como primer filtro para probar que nuestro vector construido tuviese nuestro inserto. En todas obtuvimos la banda del peso esperado.

En la segunda prueba con la doble digestión de *NdeI/BamHI* pese a haber obtenido digestión parcial de las clonas positivas, se obtuvo el fragmento esperado del inserto (967 pb); en el caso de la digestión con *BglII*, también se corroboró la presencia del inserto, por lo que se esperaba obtener una banda de 1020 pb como se observa en las Figuras 15-A y 15-B, respectivamente.



**Figura 15. Pruebas de seguimiento a las clonas positivas con enzimas de restricción en gel de agarosa al 1%.** **A)** Digestión doble con *NdeI* y *BamHI*, con ésta se liberó el inserto correspondiente a 967 pb. **B)** Digestión con *BglII*, donde se corrobora la presencia del inserto en el plásmido pJET, al liberarse una banda de aproximadamente 1000 pb.

Una vez demostrada la presencia del inserto en el vector pJET, se secuenció para corroborar la presencia de la mutación, así como la fidelidad del gen, en la Figura 16-A y 16-B se muestran las secuencias alineadas de la *eitim* wt y la *eitim* 694\_696TGC>GCG.



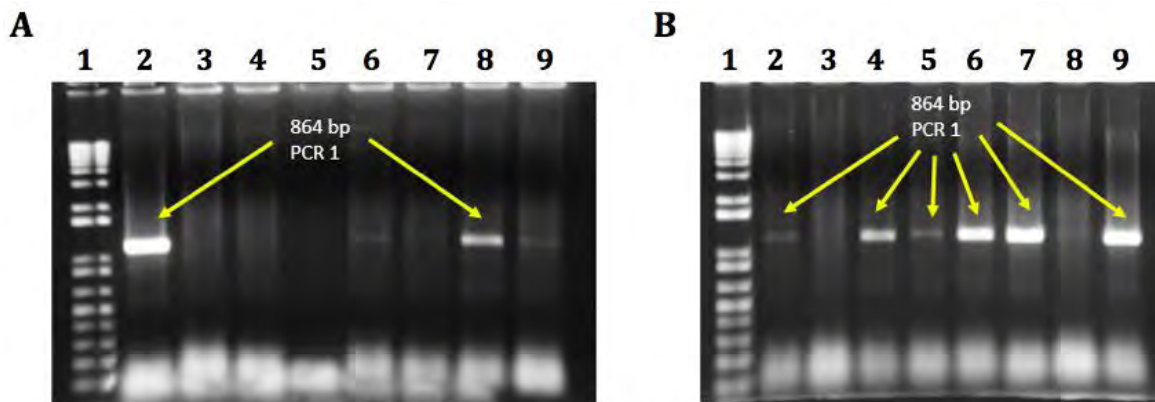
**Figura 16.** Alineamiento de las secuencias de *eitim* wt vs *eitim* 694\_696TGC>GCG.

A) Alineamiento del extremo 5'.

B) Alineamiento del extremo 3'. Se utilizó el programa LALIGN (Artimo y cols., 2017).

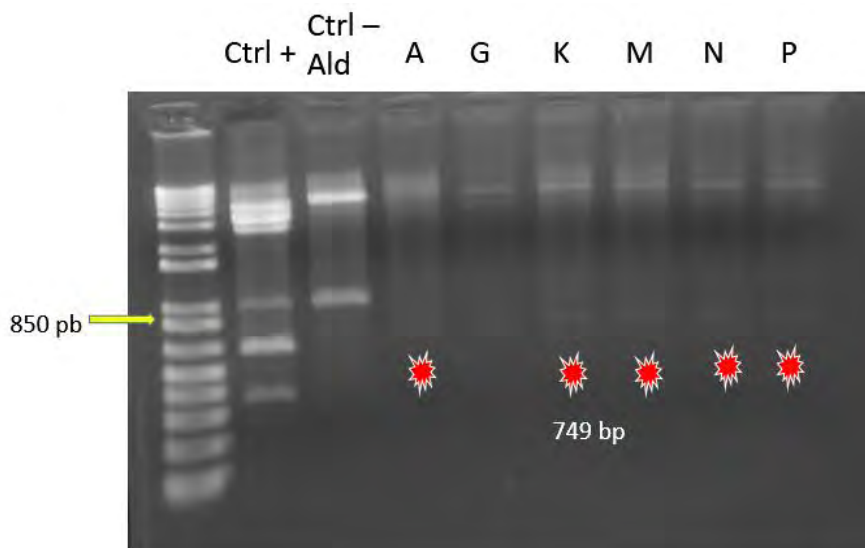
Después de demostrar que la mutación deseada estaba presente y corroborar la fidelidad del gen de la *eitim* 694\_696TGC>GCG, se realizaron digestiones con las enzimas *NdeI/BamHI* tanto del inserto como del vector de expresión (pET3a-HisTEVP), posteriormente se ligaron ambos fragmentos digeridos y se utilizaron para transformar en células de *E. coli* Top10. Una vez obtenidas las colonias positivas se dio seguimiento a

diferentes colonias elegidas al azar. En la primera prueba, donde se utilizó PCR de cultivo, de varias colonias se obtuvo un amplicón de 864 pb correspondiente a la PCR 1 con los oligonucleótidos *Rv* mutagénico y el T7 promotor (Figura 17-A y 17-B).



**Figura 17. (Gel de agarosa 1%) Prueba realizada a la mutante *eitim* 694\_696TGC>GCG insertado en el plásmido pET3a-HisTEVP.** En A y B se observan las bandas amplificadas producto de la PCR de cultivo.

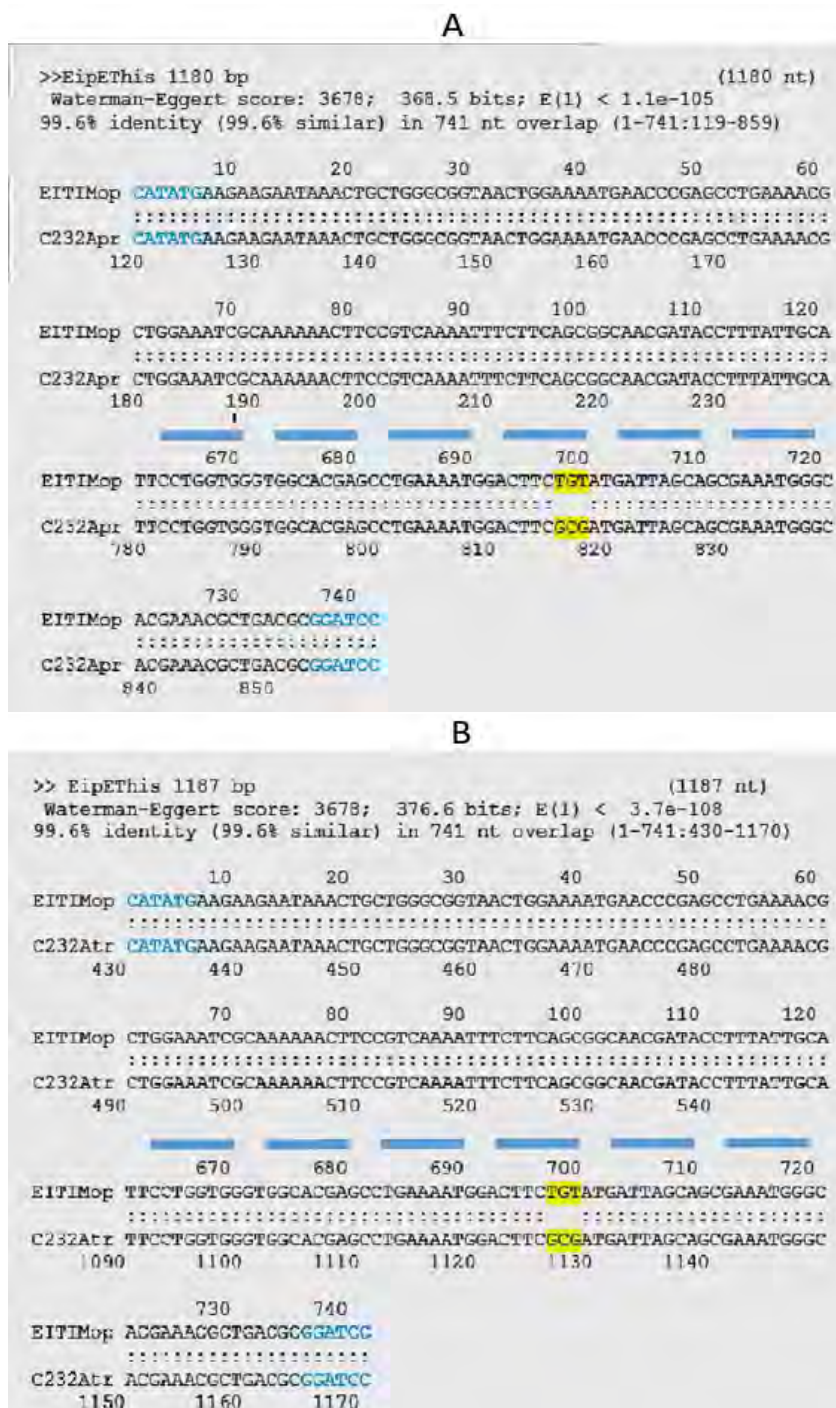
Adicionalmente y a partir del plásmido purificado se realizaron pruebas de digestión con las enzimas *NdeI/BamHI* donde se obtuvieron fragmentos correspondientes a la masa molecular esperada (Figura 18).



**Figura 18. Gel de Agarosa 1%, segunda prueba del gen de la *eitim* 694\_696TGC>GCG en el plásmido pET-HisTEVP.** Digestión doble con *NdeI/BamHI*. Carril 1 marcador de peso molecular (MPM) 1 kb plus, carril 2 control positivo DNA de la C232A en el pJET (previamente corroborado), carril 3 control negativo (gen de aldolasa de *Giardia Intestinalis*), carriles 4-9 muestras de DNA de las clonas elegidas al azar (Clonas A, G, K, M, N, P). Con marcas en rojo, está la banda tenuemente liberada del inserto *eitim* 694\_696TGC>GCG.



Finalmente se secuenció a la clona denominada 2A (proveniente de la clona A monitoreada en la Figura 18) para corroborar la presencia del gen dentro del plásmido (Figura 19).

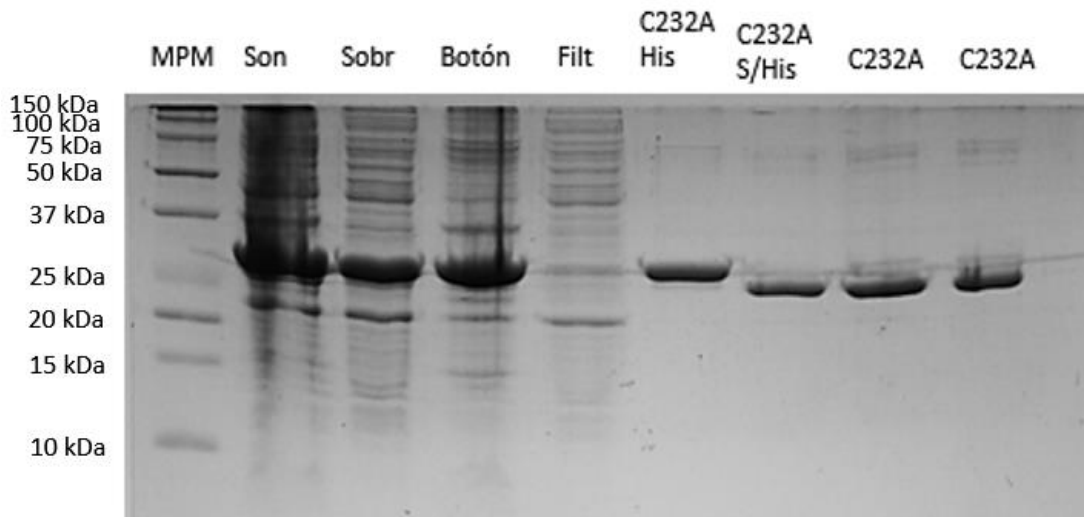


**Figura 19. Alineamiento de secuencia de la *etim* wt vs *etim* 694\_696TGC>GCG.** A) Se aprecia la lectura a partir del T7 promotor. B) Alineamiento a partir del T7 terminador. Ambas secuencias tienen alta identidad de secuencia excepto en la zona de la mutación, marcada en color rojo.



### 6.3 Sobreexpresión y purificación de la EiTIM C232A

Una vez insertado gen mutagénico de la EiTIM C232A en el vector de sobre expresión pET3a-HisTEVP, se cultivaron células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Se lisaron por sonicación y el sobrenadante del centrifugado se mezcló con la resina IMAC-níquel, posteriormente se realizaron lavados para eliminar las proteínas no específicas y al final se eluyó la proteína de interés con imidazol. El eluido se concentró en los tubos Amicon. En la Figura 20 se muestra la sobre expresión de la EiTIM C232A que, tras haber seguido los pasos de purificación, la proteína con una pureza mayor al 95% se eluyó de la columna.



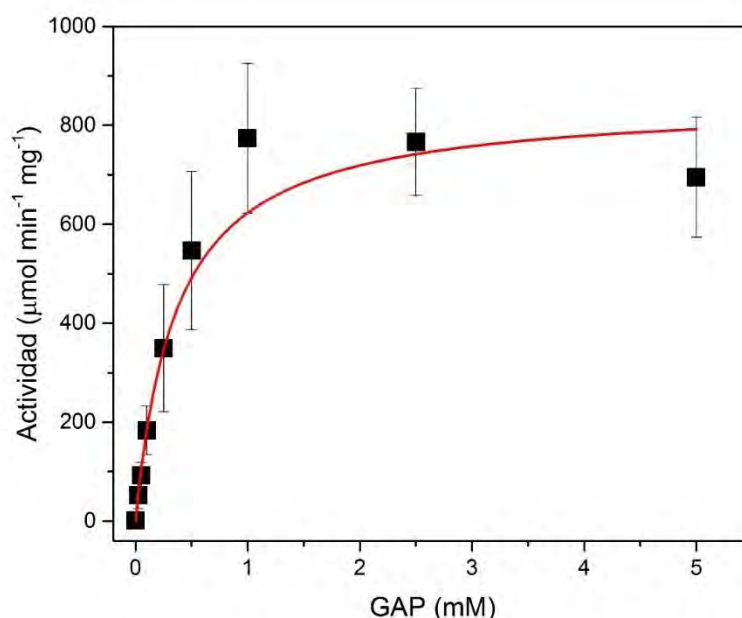
**Figura 20. Gel SDS-PAGE, von Jagow al 16%. Pasos de purificación de la EiTIM C232A.** Carril 1. Marcador de masa molecular, Precision Plus Protein Kaleidoscope (Bio-Rad). Carril 2 Fracción de células sonicadas. Carril 3 Sobrenadante. Carril 4 Restos celulares a partir del botón formado tras la centrifugación. Carril 5 Fracción del filtrado tras la incubación del sobrenadante con la resina IMAC-níquel. Carril 6 Proteína eluida y filtrada del Amicon. Carril 7 Proteína digerida en presencia de la TEVP para retirar las colas de His. Carril 8 y 9 EiTIM C232A pura a 10 µg y 5 µg respectivamente.

Después de purificar la enzima, se determinó su concentración a 280 nm, se ajustó a 5 mg/mL y se guardó a 4 °C o -20 °C en presencia de glicerol al 50%.

### 6.4 Cinética enzimática de la EiTIM C232A

Una vez obtenida la EiTIM C232A con un grado de pureza mayor al 95% corroborado por densitometría óptica de los geles (Figura 20) se determinaron los principales parámetros cinéticos usando como sustrato el GAP. Para los experimentos se utilizó de 0 a 5 mM de sustrato y la actividad enzimática se midió con 60 ng/mL de enzima. Una vez determinado el valor de la pendiente de cada ensayo, se obtuvo la actividad específica como se mencionó anteriormente. Los datos obtenidos se graficaron en función de la concentración de sustrato utilizada. Como se observa en la Figura 21, los valores corresponden a un comportamiento tipo Michaelis-Menten, por lo que el gráfico se ajustó a dicho modelo. Se obtuvieron los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$ ; los valores de la  $K_m$  fueron muy similares

a lo reportado con la EiTIM wt, esto es, la afinidad por el sustrato se mantuvo sin cambio significativo, de igual manera los valores para la  $K_{cat}$  y  $K_{cat}/K_m$ . Comparativamente, estos parámetros cinéticos son menores en relación a los parámetros cinéticos de otras enzimas (Tabla 4).



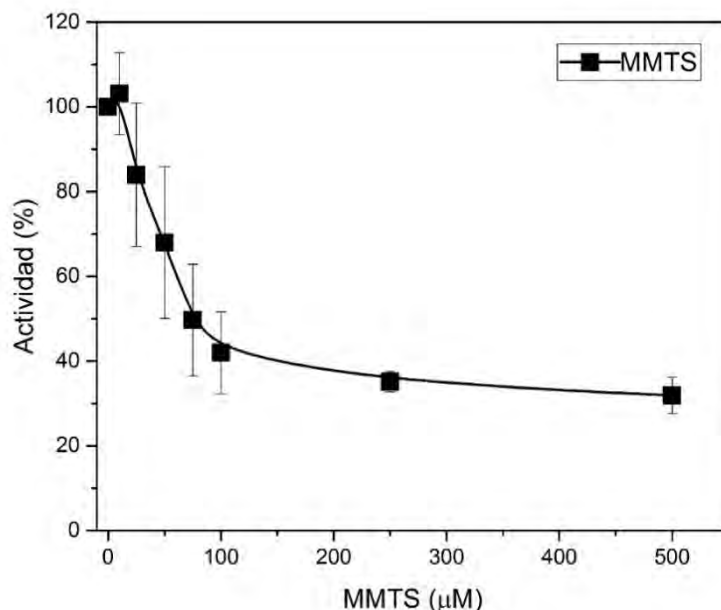
**Figura 21. Determinación de los parámetros cinéticos de la EiTIM C232A.** Para determinar los parámetros cinéticos de la EiTIM C232A, esta se ajustó a 1 mg/mL, enseguida se tomó una alícuota y se determinó su actividad a distintas concentraciones de sustrato, mediante el ensayo acoplado como se describió. Se calculó la actividad específica para cada concentración de sustrato utilizada. Los datos de actividad específica se graficaron en función de la concentración de sustrato utilizada y se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten (ajuste representado por la línea en rojo).

**Tabla 4. Parámetros cinéticos obtenidos de la EiTIM C232A, comparado con otros organismos.**

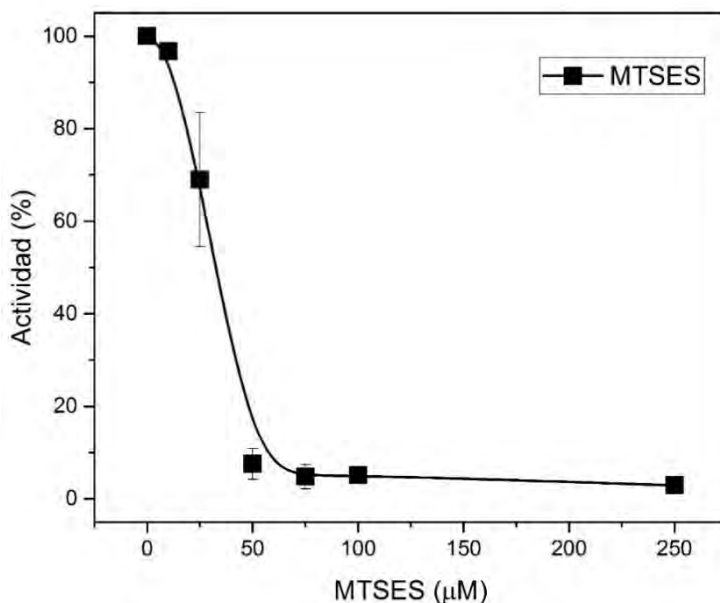
TIMs	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_{cat}/K_m$ ( $\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$ )	Referencia
EiTIM C232A	850	0.36	$4.64 \times 10^4$	$1.27 \times 10^5$	Este trabajo
EiTIM wt	1154	0.38	$6.8 \times 10^4$	$1.7 \times 10^5$	Ríos-Pérez (Tesis en preparación)
GITIM	7300	0.78	$4.6 \times 10^5$	$5.89 \times 10^5$	Enríquez-Flores y cols. (2008)
HsTIM	6920	0.74	$1.85 \times 10^5$	$2.55 \times 10^5$	de la Mora-de la Mora y cols. (2015)

## 6.5 Determinación de la actividad enzimática de la EITIM C232A con los agentes derivatizantes (MMTS, MTSE y DTNB).

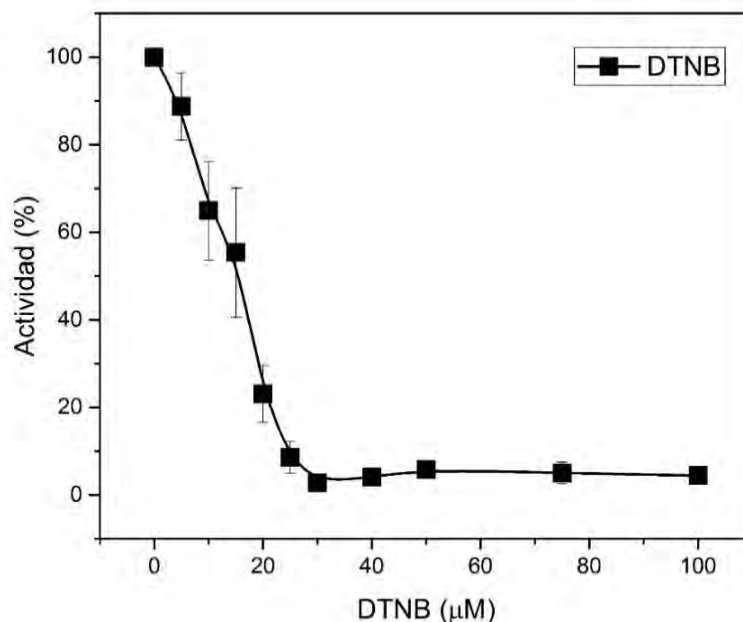
Para cuantificar el grado de inactivación de la enzima ante los derivatizantes, se expuso con diferentes concentraciones de los mismos. En el trabajo que antecede a esta tesis, se demostró que con estos derivatizantes se promueve la inactivación total de la EITIM wt. Por tal motivo, en este trabajo se trabajó con la enzima mutada (C232A) para valorar la participación de dicha Cys en la susceptibilidad a los agentes tiol. Como se muestra en las Figuras 22, 23 y 24, los derivatizantes MMTS, MTSES y DTNB promovieron que la enzima se inactivara de forma parcial, casi total o total, respectivamente. Detallando las actividades obtenidas, para el caso del MMTS, la inactivación fue parcial llegando a casi un 80 % con 500  $\mu\text{M}$  (Figura 22). Cuando se incubó con MTSES, el panorama fue diferente y se promovió una inactivación casi total al alcanzar concentraciones diez veces menores con 50  $\mu\text{M}$  (Figura 23). Mientras que el DTNB fue el derivatizante más potente ya que la EITIM C232A se inactivó totalmente cuando se alcanzó 30  $\mu\text{M}$  de este compuesto (Figura 24). La Figura 25 muestra comparativamente los efectos de estos derivatizantes sobre la EITIM C232A, por lo que en todos los casos esta enzima fue susceptible al efecto inactivador de dichos agentes tiol, como se demostró previamente con la enzima EITIM wt (Ríos Pérez, Tesis en preparación).



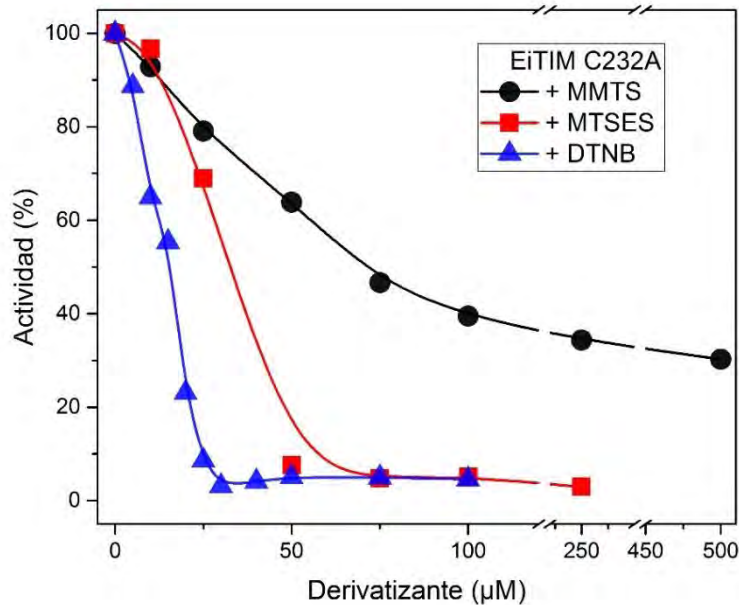
**Figura 22. Inactivación de la EITIM C232A en presencia de MMTS.** La enzima se incubó a 0.5 mg/mL en ausencia o presencia de concentraciones crecientes del derivatizante. Después de incubarla durante 2 hrs a 37 °C, se tomó una alícuota, se diluyó y se determinó la actividad residual mediante el ensayo acoplado. En la gráfica se aprecia el porcentaje de actividad de la mutante EITIM C232A vs diferentes concentraciones del derivatizante MMTS.



**Figura 23. Inactivación de la EITIM C232A en presencia de MTSES.** La enzima se incubó a 0.5 mg/mL con concentraciones crecientes del derivatizante, durante 2 hrs a 37 °C. Después, se tomó una alícuota, se diluyó y se determinó la actividad residual mediante el ensayo acoplado de cada una de las condiciones experimentales. En la gráfica se observa el porcentaje de actividad de la mutante EITIM C232A vs concentraciones crecientes del derivatizante MTSES.



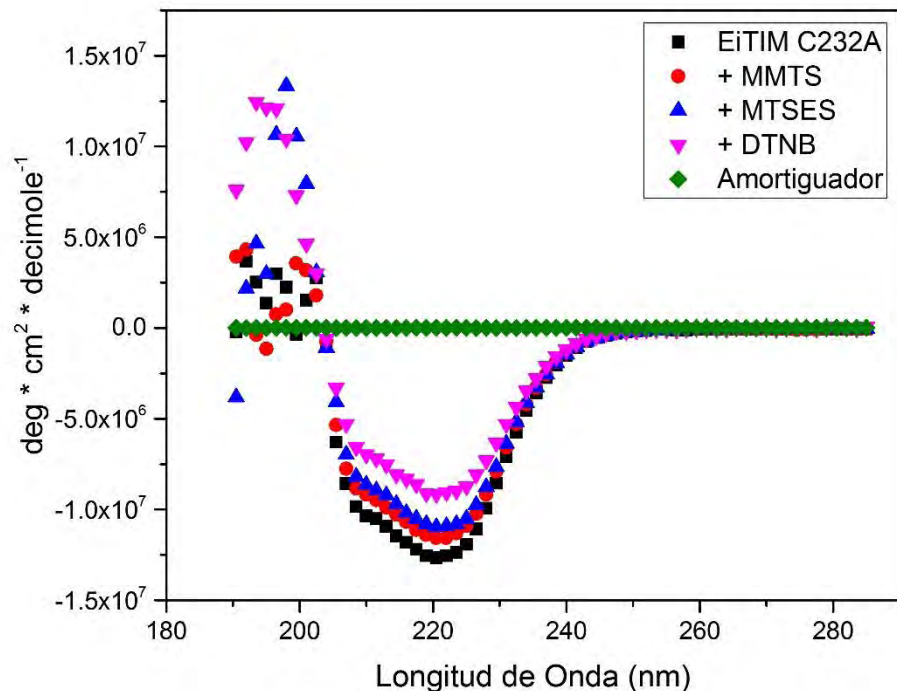
**Figura 24. Inactivación de la EITIM C232A en presencia de DTNB.** La enzima se incubó con concentraciones crecientes del derivatizante, durante 2 hrs a 37 °C. Después de este tiempo, se tomó una alícuota, se diluyó y se determinó la actividad residual mediante el ensayo acoplado a cada una de las condiciones experimentales. En la gráfica se aprecia el porcentaje de actividad de la mutante EITIM C232A vs diferentes concentraciones del derivatizante DTNB.



**Figura 25. Inactivación de la EiTIM C232A a diferentes concentraciones de los derivatizantes de Cys.** En condiciones similares, se incubó la EiTIM C232A durante 2 horas a 37°C. Los rangos de concentración variaron de acuerdo a cada derivatizante, así como sus efectos sobre la enzima. En puntos color negro se muestra la inactivación por el MMTS (0-500 µM), cuadrados en color rojo con MTSE (0-250 µM) y triángulos en color azul con DTNB (0-100 µM).

### 6.6 Obtención del Dicroísmo Circular (DC) y la Temperatura media de desnaturalización (T<sub>m</sub>) de la EiTIM C232A.

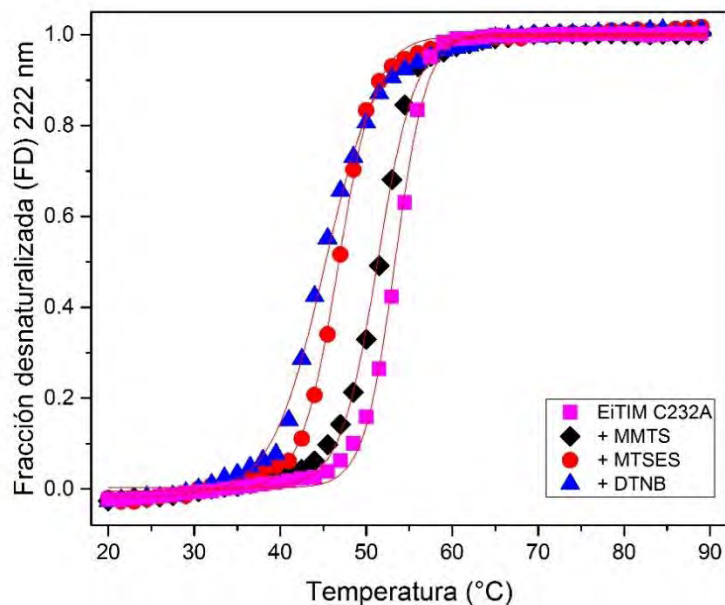
Con el propósito de determinar si la mutación provocó cambios a nivel de la estructura secundaria en la EiTIM C232A, se utilizó la técnica de dicroísmo circular, debido a la sustitución aminoacil descrita. La enzima se ajustó a 0.5 mg/mL y se obtuvo su espectro de DC. Como se aprecia en las Figura 26 se obtuvo el espectro de DC entre 190 a 290 nm, en dicho espectro de DC corresponde a la enzima EiTIM C232A se observa el típico espectro de estructuras barril  $\alpha/\beta$  de las TIMs (Lakowicz, 2006). Mientras que para la condición de la enzima incubada con los derivatizantes MMTS, MTSES o DTNB (Figuras 26) se obtuvo un espectro similar al obtenido de la enzima en ausencia de dichos agentes tiol.



**Figura 26. Espectro de dicroísmo circular de la EiTIM C232A en ausencia y presencia de los diferentes derivatizantes.** En esta figura, la enzima no se le dio tratamiento con los derivatizantes, se observan los espectros de emisión con máximos a 222 nm para las  $\alpha$  hélices, y de 208 para las hebras  $\beta$ -plegadas.

En las curvas de desnaturalización térmica, se monitoreó la EiTIM C232A mediante DC, en donde la muestra fue gradualmente expuesta a temperaturas crecientes desde 20 °C hasta 90 °C. Se monitoreó el DC de la enzima fijando la señal a 222 nm. En todas las Figura 27 se aprecia cooperatividad de desnaturalización de la enzima conforme se fue desnaturalizando.

Las  $T_m$  registrada para EiTIM C232A fue de 53.3 °C esto sin ningún tratamiento, cuando se incubó con los diferentes derivatizantes, la  $T_m$  disminuyó a 51.3 °C (MMTS), 46.77 °C (MTSES) y a 45.1 °C (DTNB). Por lo que la mutación le infligió leve inestabilidad en su estructura térmica (casi 2 °C) comparado con la  $T_m$  de EiTIM wt (Tabla 3). Cuando se preincubó con los derivatizantes, la desestabilización fue muy evidente en casi 8 °C de diferencia con respecto a la EiTIM C232A sin derivatizante. Esto se traduce en una menor cantidad de energía térmica requerida para desnaturalizarlas completamente.



**Figura 27. Curvas de desnaturalización térmica de la EiTIM en ausencia y presencia de los derivatizantes.** Gráfico combinado de las distintas curvas de Tm obtenidas en la EiTIM C232A con y sin derivatizantes. La enzima (0.5 mg/mL) se monitoreo desde los 20 a 90 °C y registrándose el DC a 222 nm conforme se fue calentando la muestra.

**Tabla 5. Valores de Tm comparativos de lo obtenido en este trabajo de Tesis y de otros estudios sobre la TIM.**

TIM	Tm (°C)	$\Delta T_m$	Referencia.
EiTIM C232A	53.3	-	Este trabajo
EiTIM C232A + MMTS	51.3	2	Este trabajo
EiTIM C232A + MTSES	46.7	6.6	Este trabajo
EiTIM C232A + DTNB	45.1	8.2	Este trabajo
EiTIM wt	54	-	Ríos-Pérez (Tesis en preparación)
EiTIM wt + MMTS	49.9	4.1	Ríos-Pérez (Tesis en preparación)
EiTIM wt + DTNB	48.8	5.2	Ríos-Pérez (Tesis en preparación)
GITIM wt	58	-	Enríquez-Flores y cols., 2008
GITIM wt + MMTS	54	4	Enríquez-Flores y cols., 2008
GITIM wt + DTNB	52	6	Enríquez-Flores y cols., 2008

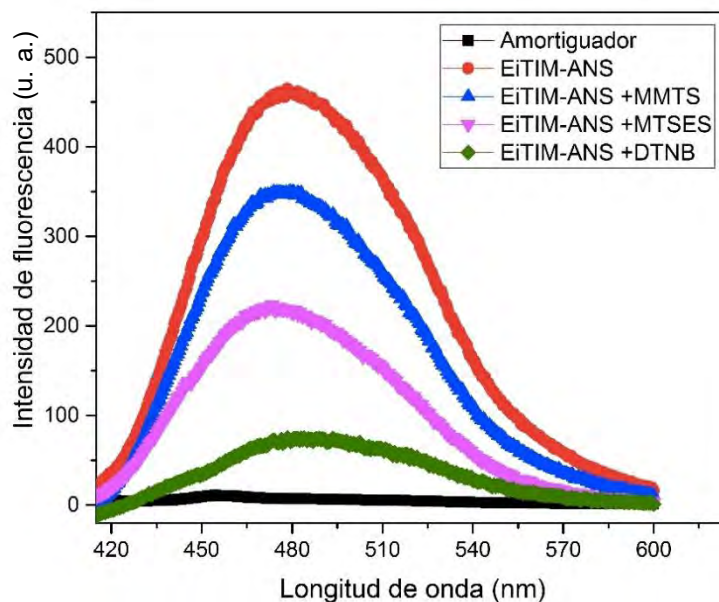
## 6.7 Fluorescencia extrínseca (FE) de la EiTIM C232A derivatizada con reactivos sulfhídrico y en presencia de ANS.

Se midió la FE para determinar el grado de afectación en la estructura terciaria y cuaternaria de la enzima en ausencia o presencia de los diferentes derivatizantes. Se registró la FE del ANS excitando a 395 nm, como se muestra en la Figura 28, la EiTIM C232A sin derivatizar y en presencia de ANS tiene un máximo de intensidad de fluorescencia de 460 (unidades arbitrarias) a una longitud de onda de 480 nm.

En experimentos similares al anterior, se midió la fluorescencia del ANS en presencia de la EiTIM previamente derivatizada con MMTS, derivatizada con MTSES o derivatizada con DTNB (Figura 28). Como se muestra en la Figura 27, la máxima emisión de fluorescencia del ANS de la EiTIM C232A en presencia de MMTS, fue de 360 (u. a.) a una longitud de onda de 480 nm.

Para el caso de la EiTIM derivatizada con MTSES la intensidad de fluorescencia del ANS fue menor que con MMTS, 230 de intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de 480 nm (Figura 28).

En el último experimento se midió la fluorescencia del ANS en presencia de la EiTIM previamente derivatizada con DTNB, la Figura 28 muestra que cuando se registró la fluorescencia del ANS tuvo un máximo de intensidad de 90 a una longitud de 480 nm.



**Figura 28. Espectros de emisión de fluorescencia extrínseca del ANS con la EiTIM C232A en ausencia o presencia de los derivatizantes MMTS, MTSES o DTNB.** Se observa que la intensidad de fluorescencia en cada condición fue disminuyendo siendo: EiTIM sin derivatizante > +MMTS > +MTSES > +DTNB. Se utilizaron 0.3 mg/mL de EiTIM y se midió la fluorescencia al añadirle el ANS. La intensidad se expresa en unidades arbitrarias (u. a.).



Como se observa en la figura anterior, al adicionar el ANS en la EiTIM sin derivatizantes se registró la máxima emisión de fluorescencia y conforme se derivatizó con MMTS, MTSES o DTNB la intensidad de fluorescencia fue disminuyendo progresivamente en el orden mencionado. Para cada caso se midió el espectro de emisión de fluorescencia del amortiguador con ANS y en todos los casos fue una señal basal sin embargo este valor se restó a cada condición.

## 7. Discusión

La microsporidiosis, es una enfermedad que representa un serio problema de salud pública en poblaciones inmunológicamente vulnerables como en personas con VIH/SIDA, adultos mayores y niños (en los cuales *E. intestinalis* es muy prevalente). Los fármacos existentes en la actualidad no poseen la eficacia ni especificidad requerida, aunado a los efectos adversos tras una prolongada administración. Esto llama fuertemente la atención a una búsqueda alterna para eliminar a la microsporidiosis ocasionada por *E. intestinalis*. Éste trabajo se enfoca en la caracterización funcional y estructural de la mutante de EiTIM C232A, previamente propuesta como buen blanco para el diseño de compuestos farmacológicos contra *E. intestinalis*. Esta enzima pertenece al metabolismo de la glucosa, y una de sus funciones en dicha vía metabólica es la producción de energía en forma de ATP, adicionalmente se ha descrito que disminuye los niveles de metil-glioxal, compuesto altamente tóxico y letal para la célula y que proviene de la degradación espontánea de la DHAP (Naila y cols., 2003).

En el trabajo de Tesis de Maestría de J. Ríos-Pérez (Tesis en preparación) que antecede a ésta, se demostró que la EiTIM wt es altamente susceptible cuando es retada con reactivos derivatizantes de Cys, estos provocan abolición de su actividad de manera eficiente y a bajas concentraciones (ver Apéndice), mediante la modificación química de dichos aminoácidos. Dado que esta enzima tiene 5 residuos de Cys por cada subunidad, en este trabajo se clarifica el papel de una de sus Cys en el proceso de inactivación.

Los parámetros cinéticos de la EiTIM C232A, demostraron que esta enzima es catalíticamente competente de manera muy similar a la EiTIM wt, por lo que la mutación no promovió cambios significativos a nivel funcional. Esto se demostró, debido a que la afinidad por el sustrato y eficiencia catalítica no fueron afectadas, quedando la  $K_m$  en los mismos valores que la correspondiente enzima wt. De igual forma los valores obtenidos a nivel de la estructura secundaria y terciaria (DC y estabilidad térmica, respectivamente), demostraron que esta enzima no fue afectada significativamente ya que dichos parámetros fueron muy similares a lo reportado para la enzima silvestre. Una vez valorada y con estos parámetros de confianza, se conoció el efecto de los derivatizantes de Cys sobre la enzima. Con el MMTS la enzima se inactivó parcialmente, es decir de manera gradual fue perdiendo actividad conforme se incrementó la concentración de este reactivo, este dato fue muy similar al determinado en la enzima wt (Apéndice, Figura 30-A) así mismo este comportamiento también ha sido observado en la TIM de *Giardia lamblia* (GITIM) (Enríquez-Flores y cols., 2008) por lo que es sugerente que, debido al volumen relativamente pequeño de este compuesto así como la no polaridad, se infrinja daño parcial en el sitio activo de las enzimas. Adicionalmente, en otros trabajos se ha demostrado que este derivatizante es el



disminución de la estabilidad global en las TIMs de GITIM, TcTIM, TbTIM, etc. (Gómez-Puyou y cols., 1995; Ostoa-Saloma y cols., 1997; Rodríguez-Romero y cols., 2002; Enríquez-Flores y cols., 2008), por lo que se puede inferir para el caso de la EiTIM, que a través de sus Cys y cuando son modificadas por derivatizantes se promueven fuertes cambios tanto funcional como estructuralmente la EiTIM.

Por último, el cambio significativo en la fluorescencia extrínseca que se observó en la EiTIM C232A derivatizada, sugiere una fuerte alteración de la estructura de la enzima, debido a la disminución de la intensidad de fluorescencia (Figura 28). Así, a mayor tamaño del derivatizante la fluorescencia extrínseca fue disminuyendo gradualmente. El ANS es una molécula que se une a sitios hidrofóbicos y cuando lo hace, emite grandes cantidades de fluorescencia, el hecho de que haya disminuido dicha señal indica que en la enzima derivatizada disminuyen los sitios hidrofóbicos expuestos y por tanto el ANS emitió menor fluorescencia. Estos conjuntos de datos fueron muy similares a los que se reportan para la enzima silvestre (Apéndice, Figura 31).

Los datos presentados representan un paso adelante en la caracterización de la EiTIM como un buen blanco propuesto para el diseño de moléculas anti-encefalitozoon.

## 8. Conclusiones

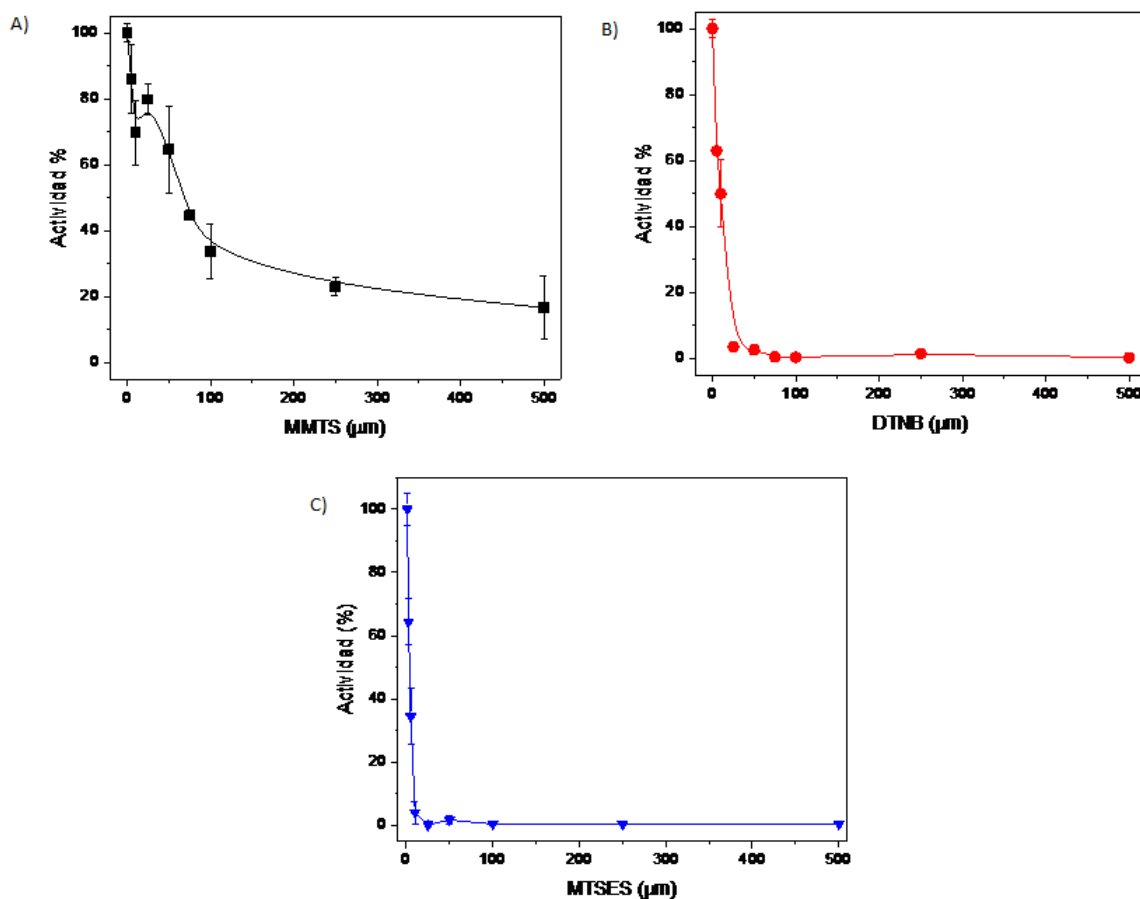
- a) La EiTIM C232A es inactivada con los derivatizantes de Cys, de manera muy similar a la EiTIM wt.
- b) La EiTIM C232A se altera de manera significativa a nivel estructural con los derivatizantes de Cys, análogamente la EiTIM wt.
- c) La Cys 232 no es responsable de la inactivación promovida con los derivatizantes de Cys, aunque está involucrada en la estabilidad térmica de la enzima ante la derivatización.
- d) Por tanto, alguna de las otras 4 cys sería la responsable de promover inactivación en la EiTIM wt al ser tratada con derivatizantes de Cys.

## 9. Perspectivas

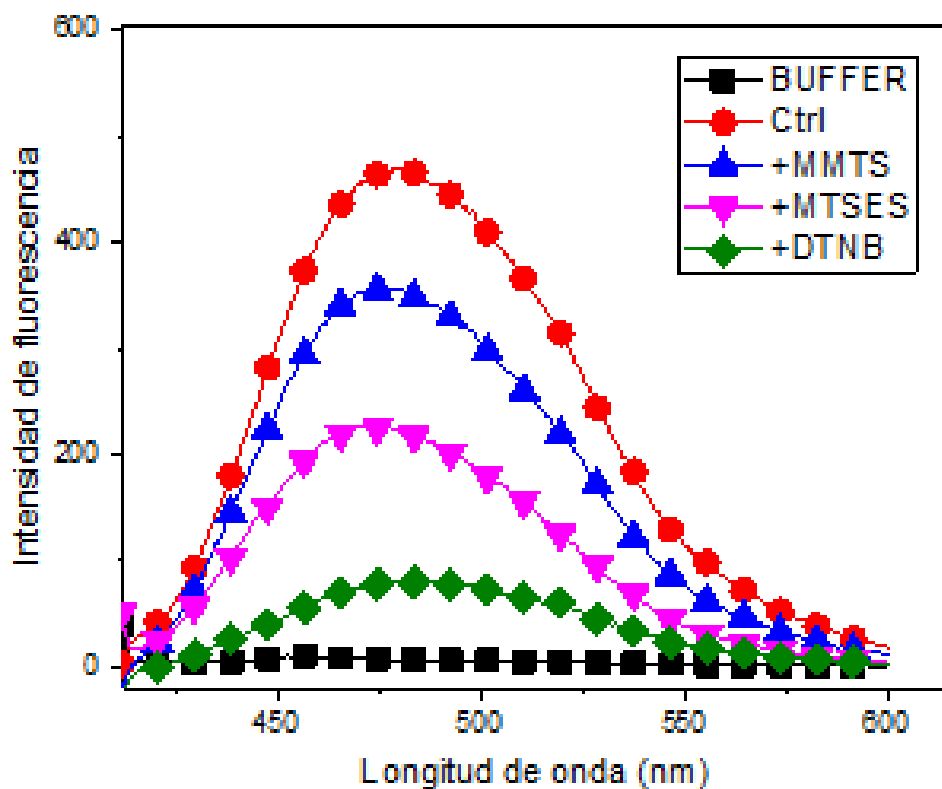
Demostrar el papel de las demás Cys en el proceso de inactivación de la EiTIM.

Evaluar la efectividad *in vitro* del efecto de distintas moléculas análogas a los derivatizantes sobre *E. intestinalis*.

## Apéndice



**Figura 30. Porcentaje de actividad residual de la EiTIM wt incubada con diferentes concentraciones de A) MMTS; B) DTNB y C) MTSES.** Para cada punto, se hicieron incubaciones de 2 horas a 37 °C, los ensayos fueron individuales, y consistieron de EiTIM 0.5 mg/mL con diferentes concentraciones de compuesto derivatizante. Posteriormente se midió la actividad específica. Se tomó como el 100% de la actividad a la enzima en ausencia de los compuestos derivatizantes. Se calculó la IC<sub>50</sub> para cada compuesto, MMTS: 29.15 μM; DTNB: 2.74 μM; MTSES 1.65 μM (Tomado de Ríos-Pérez, Tesis en preparación).



**Figura 31. Fluorescencia extrínseca.** Espectros de emisión de fluorescencia del ANS después de agregar EiTIM wt incubada con MMTS, MTSES y DTNB; y excitar a 395 nm. Se siguió el espectro de 420 a 600 nm. (Tomado de Ríos-Pérez, Tesis en preparación).

## Referencias

- Akiyoshi D.E, Morrison H.G, Lei S, Feng X, Zhang Q, Corradi N, Mayanja H, Tumwine J.K, Keeling P.J, Weiss L.M, Tzipori S. (2009). Genomic survey of the non-cultivable opportunistic human pathogen, *Enterocytozoon bieneusi*. *PLOS Pathogens*, 5(1): e1000261.
- Alvarez G., Martínez J., Aguirre-López B., Cabrera N., Pérez-Díaz L., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A., Pérez-Montfort R., Garat B., Merlino A., González M., Cerecetto H. (2013). New chemotypes as *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase inhibitors: a deeper insight into the mechanism of inhibition. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 1-7.
- Anane S. y Attouchi H. (2010). Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol Clin Biol*, 34: 450-64.
- Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, & Stockinger H. (15 de Febrero de 2017). *LALIGN*. Obtenido de ExpASY: SIB bioinformatics resource portal: [http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html)
- Ayinmode A.B., Ojuromi O.T. & Xiao L. (2011). Molecular identification of *Enterocytozoon bieneusi* isolates from Nigerian children. *Journal of Parasitology Research*, 129542.
- Becerril F.M.A. (2011). Aspectos generales de la parasitología. En B. F. A, *Parasitología médica 3ra Ed* (págs. 11-16). México: McGraw Hill.
- Becerril-Velasco L.A. (2015). *Caracterización fisicoquímica de la Triosafofosfato isomerasa de especies representativas de regiones poco exploradas del dominio Eukarya*. Tesis de licenciatura: Facultad de Medicina, UNAM. Ciudad de Mexico.
- Beckers P.J.A., Derks G.J.M., van Gool T., Rietveld F.J., Sauerwein R.W. (1996). *Encephalitozoon intestinalis*-Specific Monoclonal Antibodies for Laboratory Diagnosis of Microsporidiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(2): 282-285.
- Bedoya K., Montoya M. N., Botero J. y Galván A.L. (2008). Primer aislamiento de *Encephalitozoon intestinalis* a partir de muestra de materia fecal de un paciente colombiano con SIDA. *Biomédica*, 28: 441-7.
- Bonafonte M.T., Stewart J. y Mead J.R. (2001). Identification of two putative ATP-cassette genes in *Encephalitozoon intestinalis*. *International Journal for Parasitology*, 31: 1681-1685.
- Botero-Garces J. y Montoya-Palacio M.N. (2002). Microsporidiosis intestinal: una visión integral. *Infectio*, 6(4): 213 - 225.
- Bryan R.T. y Schwartz D.A. (1999). Epidemiology of Microsporidiosis. En *The Microsporidia and Microsporidiosis* (págs. 502-516). Washington, EUA: American Society of Microbiology.

- Burri L., Williams B.A.P, Bursac D, Lithgow T. y Keeling P. (2006). Microsporidian mitochondria retain elements of the general mitochondrial targeting system. *PNAS*, 103 (43): 15916–15920.
- Cali A. y Takvorian P.M. (2004). The microsporidia: Pathology in man and the occurrence in nature. *S. E. Asian J. Trop. Med. Public Health*, 35 Suppl: 58-64.
- Chilón-Cornejo V.J. (2014). *Seroprevalencia de Encephalitozoon cuniculi en conejos destinados como mascotas en la provincia de Lima*. Tesis de Licenciatura: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Conteas C.N., Berlini O.G.W., Ash L.R. & Pruthi J.S. (2000). Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 63(3, 4): 121-127.
- Corradi N, Pombert JF, Farinelli L, Didier E.S, Keeling P.J. (2010). The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nature Communications*, 1:77.
- Costa L.N.G., Marson F.A.L., Teixeira A.T.L.S, Sales C.R.M. & Levy C.E. (2013). Intestinal microsporidiosis in a reference center. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 17(6):724-725.
- Creighton T. (1993). Proteins, structure and molecular properties 2nd Ed. *W.H. Freeman*.
- Da Silva A., Schwartz D.A., Visvesvara G.S., De Moura H., Slemenda S.B. & Pieniazek N.J. (1996). Sensitive PCR diagnosis of infections by *Enteroocytozoon bienersi* (Microsporidia) using primer based on the region coding for small-subunit rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(4): 986-987.
- de la Mora-de la Mora I, Torres-Larios A, Enríquez-Flores S, Méndez ST, Castillo-Villanueva A, Gómez-Manzo S, López-Velázquez G, Marcial-Quino J, Torres-Arroyo A, García-Torres I, Reyes-Vivas H, Oria-Hernández J. (2015). Structural effects of protein aging: terminal marking by deamination in human triosephosphate isomerase. *PLoS One*, 10(4): e0123379.
- DeLano W.L. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System. *Schrödinger, LLC*.
- Didier E.S, Weiss L.M. (2006). Microsporidiosis: Current status. *Curr Opin Infect Dis*, 19(5): 485 - 492.
- Didier E.S. y Weiss L.M. (2008). Overview of microsporidia and microsporidiosis. *Protistology*, 5(4): 243-255.
- Didier E.S., Stovall M.E., Green L.C., Brindley P.J., Sestak K. y Didier P.J. (2004). Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology*, 126: 145-166.
- Dworkin M.S., Buskin S.E., Davidson A.J., Cohn D.L., Morse A., Inungu J., Adams M.R., McCombs S.B., Jones J.L., Moura H., Visvesvara G., Pieniazek N. & Navin T.R. (2007). Prevalence of intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with diarrhea in major United States cities. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 49(6): 339-342.

- Edlind T.D., Li J., Visvesvara G.S., Vodkin M.H., McLaughlin G.L. y Katiyar S.K. (1996). Phylogenetic analysis of B-tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5(2): 359-367.
- Eeffinck-Schattenkerk J.K., van Gool T., van Ketel R.J., Bartelsman J.F., Kuiken C.L., Terpstra W.J. y Reiss P. (1991). Clinical significance of small-intestinal microsporidiosis in HIV-1-infected individuals. *Lancet*, 337(8746): 895-8.
- Eligio-García L, Cano-Estrada A, Cortés-Campos A, Medina-Sansón A, Jiménez-Cardoso E. (2013). Identification of *Microsporidium* spp in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 70(1): 26-30.
- Enriquez F.J., Taren D., Cruz-López A., Muramoto M., Palting J.D. & Cruz P. (1998). Prevalence of Intestinal Encephalitozoonosis in Mexico. *Clinical Infectious Diseases*, 26(5): 1227-9.
- Enríquez-Flores S, Rodríguez-Romero A, Hernandez-Alcántara G, De la Mora-De la Mora I, Gutiérrez-Castellón P, Carvajal K, López-Velázquez G. y Reyes-Vivas H. (2008). Species-specific inhibition of *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase by localized perturbation of the homodimer. *Mol Biochem Parasitol*, 157: 179-186.
- Enríquez-Flores S., Rodríguez-Romero A, Hernández-Alcántara, Oria-Hernández J, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Hernández G, de la Mora-de la Mora I, Castillo-Villanueva, García-Torres I, Méndez S, Gómez-Manzo S, Torres-Arroyo A, López-Velázquez, Reyes-Vivas H. (2011). Determining the molecular mechanism of inactivation by chemical modification of triosephosphate isomerase from the human parasite *Giardia lamblia*: A study for antiparasitic drug design. *Proteins*, 79: 2711-24.
- Fast N.M., Logsdon J.M. y Doolittle W.F. (1999). Phylogenetic analysis of the TATA Box Binding Protein (TBP) gene from *Nosema locustae*: Evidence for a Microsporidia-Fungi relationship and spliceosomal intron loss. *Mol Biol Evol*, 16(10): 1415-1419.
- Franzen C. (2008). A review of 250 years of research. *The Open Parasitology Journal*, 2: 1-34.
- Franzen C. y Müller A. (1999). Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clinical Microbiological Reviews*, 12(2): 243-285.
- Franzen C. y Müller A. (2001). Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes and Infection*, 3: 389-400.
- Franzen C. y Salzberger B. (2008). Analysis of the beta-tubulin gene from *Vittaforma corneae* suggests benzimidazole resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2): 790-793.
- Gamboa-Dominguez A., De Anda J., Donis J., Ruiz-Maza F, Visvesvara G.S. & Diliz H. (2003). Disseminated *Encephalitozoon cuniculi* infection in a mexican kidney transplant recipient. *Transplantation*, 75(11): 1898-1900.
- Gao X.G., Garza-Ramos G., Saavedra-Lira E., Cabrera N., Gómez-Puyou M.T., Perez-Montfort R., Gómez-Puyou A. (1998). Reactivation of triosephosphate isomerase from three trypanosomatids and human: effect of Suramin. *Biochem. J.*, 332: 91-96.



- García-Torres I., de la Mora-de la Mora I., Marcial-Quino J, Gómez-Manzo S, Vanoye-Carlo A, Navarrete-Vázquez G, Colín-Lozano B, Gutiérrez-Castrellón, Sierra-Palacios E, López-Velázquez G. y Enríquez-Flores S. (2016). Proton pump inhibitors drastically modify triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* at functional and structural levels, providing molecular leads in the design of new anti-giardiasis drugs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1860: 97-107.
- Garza-Ramos G., Cabrera N., Saavedra-Lira E., Tuena de Gómez-Puyou M., Ostoa-Saloma P., Pérez-Montfort R. y Gómez-Puyou. (1998). Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Eur. J. Biochem.*, 253: 684-691.
- Ghosh K. y Weiss L.M. (2012). T cell response and persistence of the microsporidia. *FEMS Microbiol Rev*, 36: 748-760.
- Gómez-Puyou A., Saavedra-Lira E., Becker I., Zubillaga R.A., Rojo-Domínguez A. y Pérez-Montfort R. (1995). Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action- studies with triosephosphate isomerase. *Chemistry & Biology*, 2(12): 847-855.
- Gosh K, Schwartz D. y Weiss L.M. . (2014). Ch17 Laboratory Diagnosis of Microsporidia. En W. L. J.J., *Microsporidia: Pathogens of Opportunity 1th Ed* (págs. 421-456). Reino Unido: John Wiley & Sons, Inc.
- Greenfield N. J. (2006). Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat. Protoc.*, 1(6): 2527-2535.
- Groß U. (2003). Treatment of microsporidiosis including albendazole. *Parasitol Res*, 90: S12-S18.
- Hacker C., Howell M., Bhella D., Lucocq J. (2014). Strategies for maximizing ATP supply in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*: direct binding of mitochondria to the parasitophorous vacuole and clustering of the mitochondrial porin VDAC. *Cellular Microbiology*, 16(4): 565-579.
- Heinz E, Williams T.A, Nakjang S, Noël C.J, Swan D.C, Goldberg A.V, Harris S.R, Weinmaier T, Markert S, Becher D, Bernhardt J, Dagan T, Hacker C, Lucocq J.M, Schweder T, Rattei T, Hall N, Hirt R.P, Embley T. M. (2012). The genome of the obligate intracellular parasite *Trachipleistophora hominis*: New insights into microsporidian genome dynamics and reductive evolution. *PLOS Pathogens*, 8(10): : e1002979.
- Hernández-Alcántara G., Torres-Larios A., Enríquez-Flores S., García-Torres I., Castillo-Villanueva A., Méndez S.T., de la Mora-de la Mora I., Gómez-Manzo S., Torres-Arroyo A., López-Velázquez G., Reyes-Vivas H., Oria-Hernández J. (2013). Structural and Functional Perturbation of *Giardia lamblia* Triosephosphate isomerase by modification of a non-catalytic, non-conserved region. *PLoS ONE*, 8(7): e69031.

- Jiménez-González G.B., Martínez-Gordillo M., Caballero-Salazar S., Peralta-Abarca G.E., Cárdenas-Cardoz R., Arzate-Barbosa P. & Ponce-Macotela M. (2012). Microsporidiosis en pacientes pediátricos con leucemia o linfoma. *Revista de Investigación Clínica*, 64(1): 25-31.
- Kamaishi T., Hashimoto T., Nakamura Y., Masuda Y., Nakamura F., Okamoto K., Shimizu M. y Hasegawa M. (1996). Complete nucleotide sequences of the genes encoding translation elongation factors 1 alpha and 2 from a microsporidian parasite, *Glugea plecoglossi*: implications for the deepest branching of eukaryotes. *J. Biochem.*, 120: 1095-1103.
- Keeling P. (2009). Five questions about Microsporidia. *PLoS Pathogens*, 5(9): e1000489.
- Keeling P.J. y McFadden G.I. (1998). Origins of microsporidia. *Trends in Microbiology*, 6(1): 19-23.
- Keeling P.J., Corradi N., Morrison H.G., Haag K.L., Ebert D., Weiss L.M., Akiyoshi D.E. y Tzipori S. (2010). The Reduced Genome of the Parasitic Microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* lacks genes for core carbon metabolism. *Genome Biol. Evol.*, 2: 304–309.
- Klokouzas A., Shahi A., Hladky S.B., Barrand M.A. y van Veen H.W. (2003). ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22: 301-317.
- Kotkova M., Sak B., Kvetonova D. & Kvac M. (2013). Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: A murine model desmotrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole. *PLoS ONE*, 8(4): e60941.
- Lakowicz J. L. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy 3rd Ed.* Singapore: Springer.
- Lobo M.L., Xiao L., Antunes F. y Matos O. (2012). Microsporidia as emerging pathogens and the implication for a public health: A 10-year study on HIV-positive and -negative patients. *International Journal for Parasitology*, 42: 197 -205.
- Lores B., López-Miragaya I., Arias C., Fenoy S., Torres J. & del Águila C. (2002). Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human immunodeficiency virus-negative patients from Vigo, Spain. *Clinical Infectious Diseases*, 34: 918-21.
- Mathis A., Weber R. y Deplazes P. (2005). Zoonotic potential of the Microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(3): 423-445.
- Matos O., Lobo M.L. & Xiao L. (2012). Epidemiology of *Enterocytozoon bieneusi* infection in humans. *Journal of Parasitology Research*, 2012: 1-19.
- Müller M., Mentel M., van Hellemond J.J., Henze K., Woehle C., Gould S.B., Yu R., van der Giezen M., Tilens A.G.M. y Martin W. (2012). Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76 (2): 444-495.

- Naila A, Sinan B, Nikolaos K, Roya B, Margit H, Klará B, Susan H. y Paul J. (2003). Increased formation of methylglyoxal and protein glycation, oxidation and nitrosation in triosephosphate isomerase deficiency. *Biochim Biophys Acta*, 1639: 121-32.
- Noda-Albelo A.L., Cañete R. y Brito-Pérez K. (2013). Microsporidiosis gastrointestinal: una actualización. *Rev Méd Electrón*, 2: 167-181.
- Olivares-Ilana V., Rodríguez-Romero A., Becker I., Berzunza M., García J., Pérez-Montfort R., Cabrera N., López-Calahorra F., Tuena de Gómez-Puyou M. y Gómez-Poyou A. (2007). Perturbation of the dimer interface of triosephosphate isomerase and its effect on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 1(1): e01.
- Ostoa-Saloma P., Garza-Ramos G, Ramírez J, Becker I, Berzunza M, Landa A, Gómez-Poyou A, Tuena de Gómez-Poyou M. y Pérez-Montfort R. (1997). Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.*, 244: 700-705.
- Pace C. N., Vajdos F., Grimsley G. y Gray T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*, 4: 2411-2423.
- Pagornrat W., Leelayoova S., Rangsin R., Tan-Ariya P., Naaglor T. & Mungthin M. (2009). Carriage rate of *Enterocytozoon bieneusi* in an orphanage in Bangkok, Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11): 3739-3741.
- Peyretailade E, Parisot N, polonais V, Terrat S, Denonfoux j, Dugat-Bony E, Wawrzyaniak I, Biderre-Petit C, Mahui A, Romour, Oliver Gonçalves, Bornes S, Delbac, Chebance B, Duprat S, Samson G, Katinka M, Weissenbach J, Wincker P, Peyret P. (2012). Annotation of microsporidia genomes using transcriptional signals. *Nature Communications*, 3: 1137.
- Pombert JF, Mohammed S, Burki F, Bardell F.T, Farinelli L, Solter L.F, Whitman D.W, Weiss L.M, Corradi N, Keeling P.J. (2012). Gain and loss of multiple functionally related, horizontally transferred genes in the reduced genomes of two microsporidian parasites. *PNAS*, 109(31): 12638-12643.
- Pombert JF, Xu J, Smith R.S, Heinman D, Young S, Coumo C.A, Weiss L.M, Keeling P.J. (2013). Complete genome sequences from three genetically distinct strains reveal high intraspecies genetic diversity in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Eucaryotic Cell*, 12(4): 503-5011.
- Ramanan P. y Pritt B.S. (2014). Extraintestinal Microsporidiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(11): 3839 - 3844.
- Reyes-Vivas H., de la Mora-de la Mora I., Castillo-Villanueva A., Yépez-Mullia L., Hernández-Alcántara G., Figueroa-Salazar R., García-Torres I., Gómez-Manzo S., Méndez S., Vanoye-Carlo A., Marcial-Quino J., Torres-Arroyo A., Oria-Hernández J., Gutiérrez-Cas. (2014). Giardial triosephosphate isomerase as possible target of the cytotoxic effect of omeprazole in *Giardia lamblia*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 58(12): 7072-7082.
- Ríos-Pérez J.L. (Tesis en Preparación (2017)). *Sobreexpresión y caracterización de la triosafofosfato isomerasa del microsporidia Encephalitozoon intestinalis como blanco*

potencial para el desarrollo de compuestos antiparasitarios. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

- Rodríguez-Romero A., Hernández-Santoyo A., del Pozo Y.L., Kornhauser A. y Fernández-Velasco D.A. (2002). Structure and inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.*, 322: 669-675.
- Sak B., Kváč M., Kučerová Z., Květoňová D. & Saková K. (2010). Latent microsporidial infections in immunocompetent individuals - A Longitudinal Study. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(5): e1162.
- Samanta M, Banerjee M, Murthy M.R.N, Balaram H. y Balaram P. . (2011). Probing the role of the fully conserved Cys126 in triosephosphate isomerase by site-specific mutagenesis - distal effects on dimer stability. *FEBS Journal* , 278: 1932-1943.
- Shadduck J.A. y Greeley E. (1989). Microsporidia and human infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 2(2):158-165.
- Stentiford G.D., Becnel J.J., Weiss L.M., Keeling P.J., Didier E.S., Williams B.A.P., Bjorson S., Kent M.L., Freeman M.A., Brown M.J.F., Troemel E.R., Sokolova Y., Snowden K.F. y Solter L. (2016). Microsporidia - Emergente Pathogens in the Global Food Chain. *Trends Parasitology*, 32(4): 336-348.
- Tumwine J.K., Kekitiinwa A., Bakera-Kitaka S., Ndeezi G., Downing R., Feng X., Akiyoshi D. & Tzipori S. (2005). Cryptosporidiosis and Microsporidiosis in ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the human immunodeficiency virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73(5): 921-925.
- Van de Peer Y., Ben Ali A., Meyer A. (2000). Microsporidia: accumulating molecular evidence that a group of amitochondriate and suspectedly primitive eukaryotes are just curious fungi. *Gene*, 246: 1-8.
- Vávra J y Lukes J. (2013). Microsporidia and 'The Art of Living Together'. *Advances in Parasitology*, 82: 253-319.
- Voet D. y Voet J.G. (2011). *Biochemistry 4th ed*. USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Weber R, Bryan R.T., Schwartz D.A. y Owen R.L. (1994). Human Microsporidial Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4):426-461.
- Weiss L. y Schwartz D.A. (2006). Microsporidiosis. En *Tropical Infectious Diseases Principles, Pathogens & Practice 2nd Ed* (págs. 1126-1140). USA: Elsevier.
- Williams B.A., Dolgikh V.V. y Sokolova Y.Y. (2014). Microsporidian Biochemistry and Physiology. En W. L. J.J, *Microsporidia: Pathogens of Opportunity* (págs. 245-260). Reino Unido: Wiley Blackwell.
- Xu Y. y Weiss L.M. (2005). The microsporidian polar tube: A highly specialised invasion organelle. *Int J Parasitol*, 35(9): 941 - 953.
- Yazar S., Koru Ö., Hamamci B., Çetinkaya Ü., Karaman Ü., Kuk S. (2013). Mikrosporidialar ve Mikrosporidiozis. *Turkiye Parazit Derg*, 37: 123-34.