



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Facultad de Ciencias**

**Biología**

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL OMEPRAZOL SOBRE LA  
TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE *Giardia lamblia* *IN VITRO* E *IN SITU*  
Y EL PAPEL DE LAS CISTEÍNAS SUPERFICIALES MEDIANTE EL USO DE  
LAS MUTANTES C222A-C228A Y C202A-C222A-C228A

**TESIS**

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

**BIÓLOGA**

Presenta

**CAUDILLO DE LA PORTILLA DANIELA**

Tutora: M. en C. Cynthia Fernández Lainez

Instituto Nacional de Pediatría

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



## *Agradecimientos*

*A mi alma mater, la Universidad Nacional Autónoma de México*

*A la Facultad de Ciencias*

*A mi tutora, Cynthia Fernández Lainez*

*Al doctor Gabriel López Velázquez*

*Por haberme enseñado que la única clave del éxito es el trabajo constante.*

*Por todos los recursos que me proporcionaron para llevar a cabo este proyecto.*

*A los doctores del laboratorio*

*Dra. Itzhel García Torres, Dr. Sergio Enríquez Flores, Dr. Ignacio de la Mora de la Mora, por ser guía fundamental en mi proyecto.*

*A mis compañeros de laboratorio, Artur, Yoalli, Pau, Mercedes, Diego, Dany, por hacer mis días más amenos.*

**Este trabajo se realizó en el laboratorio de  
Biomoléculas y Salud infantil del Instituto Nacional  
de Pediatría.**

**El presente trabajo de tesis tuvo apoyo financiero de los siguientes proyectos:**

- **CONACyT 241343**
- **Fondos Federales Instituto Nacional de Pediatría 051/2014**

## *Agradecimientos*

*A Dios por guiarme en todo momento y poner en mi camino a las mejores personas para ser partícipes de mis metas.*

*A mi abuelita Virginia Rodríguez Soberanes (q.e.p.d) por ayudarme a construir los cimientos de mi vida. ¡Te amo mi bella pallo!*

*A mi mamá, Silvia de la Portilla Rodríguez, por ser el mejor ejemplo a seguir en mi vida y ser la mujer más fuerte del mundo. ¡Te amo mi chivis!*

*A mi papá, Antonio Caudillo Niño, por estar en todo momento para mí y apoyar en mi formación. ¡Te amo dadito!*

*A mi hermano, Mauricio Caudillo de la Portilla, por ser el mejor hermano del universo y por enseñarme que todo es posible. ¡Te amo carnal!*

*A mi esposo, Oscar Hernández Huerta, por ser mi motivación día a día, por estar conmigo en todo momento, por verme crecer y levantarme cuando lo necesito. Por enseñarme tanto. ¡Te amo mi gordito bello!*

*A mis hermanos, Aranzha Cárdenas de la Portilla y Alejandro Cárdenas de la Portilla, por ser incondicionales, les agradezco todos los momentos juntos.*

*A la familia Cárdenas de la Portilla, porque sin ustedes nada sería posible.*

*A mis tías, María del Carmen de la Portilla Rodríguez, Beatriz de la Portilla Rodríguez, Conchita de la Portilla Rodríguez y Alicia de la Portilla Rodríguez por apoyarme, por todo el amor infinito y por no dejarme caer en los momentos más difíciles, las amo mis segundas mamás.*

*A todos los De la Portilla, mis tíos, primos y sobrinos, porque han sido mi apoyo en todo momento, gracias por ser la mejor familia que Dios pudo regalarme.*

## ÍNDICE

Número	Descripción	Página
	Resumen	1
1.	Introducción	2
1.1	Generalidades de <i>Giardia lamblia</i>	4
1.1.2	Taxonomía de <i>Giardia lamblia</i>	4
1.1.3	Ciclo de vida e invasión del hospedero	5
1.1.4	Importancia epidemiológica	6
1.1.5	Tratamiento contra la giardiasis	8
1.2	Biología celular de <i>Giardia lamblia</i>	9
1.2.1	Morfología	11
1.2.1.1	Trofozoito	11
1.2.1.2	Quiste	12
1.3	Metabolismo de <i>Giardia lamblia</i>	13
1.3.1	Sistemas de defensa antioxidante en <i>Giardia lamblia</i>	13
1.3.2	La cisteína como parte del sistema antioxidante de <i>Giardia lamblia</i>	14
1.3.3	El contenido de cisteínas en las proteínas de <i>Giardia lamblia</i>	14
1.4	Metabolismo energético de <i>Giardia lamblia</i>	15
1.4.1	Vía de la arginina dihidrolasa	15
1.4.2	Glucólisis en <i>Giardia lamblia</i>	17
1.5	Triosafosfato isomerasa	20
1.5.1	Triosafosfato isomerasa de <i>Giardia lamblia</i>	21
1.5.2	El contenido de cisteínas en la GITIM comparado con otras especies	22
1.5.3	Cisteína 222	24
1.6	Triosafosfato isomerasa de <i>Giardia lamblia</i> como blanco anti-giardiasico de compuestos derivatizantes de cisteínas	26
2.	Justificación	29
3.	Objetivos	30
3.1	General	30
3.2	Particulares	30
4.	Material y métodos	31
4.1	Construcción de la doble mutante C222A-C228A y triple mutante C202A-C222A-C228A de GITIM	31
4.1.1	Purificación de los productos de PCR	33
4.2	Clonación de los genes gltim mutantes al vector de mantenimiento pJET 1.2/Blunt	33
4.2.1	Ligación del plásmido pJET1.2 con los genes gltim mutantes	35
4.2.2	Transformación de cepas <i>E. coli</i> TOP10 con los productos de ligación	35
4.2.3	Pruebas confirmatorias de las clonaciones	35
4.2.4	Digestión con enzimas de restricción NdeI y BamHI	36
4.3	Secuenciación de los genes gltim mutantes	37
4.4	Sub-clonación de los genes gltim mutantes al plásmido de expresión pET3aHisTev	37
4.4.1	Ligación de los genes gltim al plásmido pET3aHisTev	39
4.4.2	Transformación de cepas <i>E. coli</i> TOP10 con los productos de ligación	39
4.4.3	Pruebas confirmatorias de las clonaciones	39
4.4.4	Digestión con enzimas de restricción NdeI y BamHI	40



4.4.5	Secuenciación de los genes <i>gltim</i> C222A-C228A y C202A-C222A-C228A	40
4.5	Transformación de cepas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS competentes	40
4.6	Expresión de las enzimas GITIM mutantes	41
4.7	Purificación de las proteínas recombinantes de GITIM	42
4.8	Pruebas con Omeprazol	43
4.8.1	Cultivos de células BL21 (DE3) pLysS	44
4.8.2	Pre cultivo de células <i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS	44
4.8.3	Cultivo de células <i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS	44
4.8.4	Inducción del cultivo	45
4.8.5	Incubación de las células de <i>E. coli</i> con Omeprazol	45
4.8.6	Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)	46
4.8.7	Purificación de las proteínas recombinantes retadas con Omeprazol	47
4.8.8	Determinación de actividad enzimática de las proteínas recombinantes retadas con Omeprazol	47
4.9	Determinación de la actividad enzimática de las proteínas recombinantes <i>in vitro</i> .	48
4.9.1	Pre cultivo de células <i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS	48
4.9.2	Cultivo de células <i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS	48
4.9.3	Inducción del cultivo	49
4.9.4	Purificación de las proteínas recombinantes	49
4.9.5	Tratamiento con omeprazol a las enzimas recombinantes	49
5.	Resultados	50
5.1	Obtención de los genes de <i>gltim</i> con doble mutación C222A-C228A y triple mutación C202A-C222A-C228A	50
5.2	Expresión y purificación de las proteínas recombinantes	53
5.3	Pruebas con Omeprazol	56
5.4	Determinación de la actividad enzimática de las proteínas recombinantes con omeprazol <i>in vitro</i> .	56
5.5	Efecto <i>in situ</i> del omeprazol sobre las enzimas recombinantes (silvestre, doble y triple mutantes) provenientes de cultivos bacterianos.	59
5.5.1	Purificación de las enzimas recombinantes a partir de cultivos expuestos al omeprazol	59
5.5.2	Evaluación de actividad enzimática	61
5.5.3	Viabilidad de cepas de <i>E. coli</i> BL21 transformadas con los genes de las enzimas silvestre, doble y triple mutantes de GITIM e incubadas con omeprazol.	62
6.	Discusión	63
6.1	Ensayos <i>in situ</i>	63
6.1.1	Actividad enzimática	63
6.1.2	Unidades Formadoras de Colonia	63
6.2	Ensayos <i>in vitro</i>	64
6.2.1	Actividad enzimática	64
7.	Conclusiones	
8.	Bibliografía	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Descripción	Página
1	Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>	6
2	Ciclo celular de <i>Giardia lamblia</i>	10
3	Trofozoito de <i>Giardia lamblia</i>	12
4	Quiste de <i>Giardia lamblia</i>	13
5	Vía de la arginina dihidrolasa	17
6	Esquema de la glucólisis en <i>Giardia lamblia</i>	19
7	Estructura terciaria de TIM en formato de asas y listones	21
8	Estructura terciaria de un monómero de GITIM	22
9	Formación del puente intracatenario entre la cisteína 222 y la cisteína 228.	25
10	Actividad enzimática de diferentes mutantes sencillas de cisteína de GITIM retardas con concentraciones crecientes de omeprazol	28
11	Mutagénesis sitio dirigida	32
12	Vector de mantenimiento pJET 1.2/blunt	34
13	Sitios de corte para las enzimas de restricción NdeI y BamHI	37
14	Plásmido pET3a-HisTev	39
15	Método para la determinación de actividad enzimática	48
16	Construcción de la doble mutante de GITIM C222A-C228A	50
17	Pruebas confirmatorias por digestión enzimática con NdeI y BamHI para la triple mutante C202A-C222A-C228A	51
18	Pruebas confirmatorias por digestión enzimática con NdeI y BamHI para la doble mutante C222A-C228A	51
19	Secuenciación de la mutante C222A-C228A	52
20	Plásmido Pet3aHisTEVP linearizado con BamHI	53
21	Fracciones de purificación de la enzima recombinante GITIM con la mutación C222A-C228A por SDS-PAGE	54
22	Fracciones de purificación de la enzima recombinante GITIM con la mutación C202A-C222A-C228A por SDS-PAGE	55
23	Porcentaje de actividad residual de las enzimas recombinantes	57
24	Inactivación in vitro con omeprazol de las enzimas recombinantes WT, doble y triple mutantes de GLTIM	58
25	Comparación de los valores de porcentaje de actividad residual	61
26	UFC's	62
27	Comparación del porcentaje de actividad residual	65
28	Modelos propuestos de la interacción del omeprazol en la triple mutante	66
29	Modelos reportados para la inactivación de GITIM	67

## ÍNDICE DE TABLAS

Número	Descripción	Página
1	Clasificación de las especies del género <i>Giardia</i>	8
2	Rendimiento obtenido después de la purificación de las enzimas recombinantes	54
3	Rendimiento de proteína obtenida tras la purificación de las enzimas mutantes y la silvestre.	59
4	Actividad enzimática de las proteínas recombinantes purificadas de cultivos bacterianos que previamente fueron tratados con diferentes concentraciones de omeprazol	60

## RESUMEN

Las enfermedades causadas por microorganismos representan un problema de salud pública a nivel mundial, más aun cuando dichos organismos se vuelven resistentes a los tratamientos convencionales pues el riesgo de mortandad aumenta. Un ejemplo de este fenómeno es la giardiasis, la cual ocupa el primer lugar en las causas de diarrea provocada por parásitos protistas. Esta parasitosis es causada por el protista *Giardia lamblia*, alojándose en el intestino delgado de vertebrados e invertebrados incluyendo al hombre. Consta de dos estadios, un trofozoito siendo la forma vegetativa y un quiste la forma infectiva. Los principales fármacos que se emplean para tratar esta parasitosis son el metronidazol y la nitazoxanida, sin embargo ya se han reportado cepas resistentes a estos fármacos e incluso los efectos secundarios en los pacientes pueden ser severos. Es por ello que permanece la necesidad de generar nuevos blancos moleculares o tratamientos alternativos para tratar la giardiasis. Al respecto, durante años se han estudiado a las enzimas de la vía glucolítica de este parásito como blancos terapéuticos, pues al carecer de fosforilación oxidativa, éste parásito obtiene la energía principalmente de la glucólisis y de la ruta de la arginina-dihidrolasa. Una de las enzimas glucolíticas propuestas es la trifosfato isomerasa de *Giardia lamblia* (GITIM), enzima rica en cisteínas, han sido estas, objeto de estudio pues se descubrió que la inactivación esta mediada por su cisteína en posición 222. En este trabajo se probó como es que los demás residuos de cisteínas pueden estar participando en la inactivación de GITIM haciendo ensayos *in vitro* e *in situ*. Probando con enzimas carentes de cisteínas en diferentes posiciones, una doble mutante C222A-C228A y una triple mutante C202A-C222A-C228A además de la inactivación de dichas mutantes de GITIM usando un agente derivatizante de cisteínas, el omeprazol, para determinar la interacción de la enzima carente de cisteínas y dicho fármaco. Para esto, se construyeron dichas mutantes por mutagénesis sitio dirigida usando PCR, dichas enzimas recombinantes se caracterizaron con la medición de actividad enzimática añadiendo omeprazol en concentraciones crecientes, después de la expresión proteica en células *E.coli* BL21DE3pLysS y post purificación de las enzimas recombinantes. Se encontró que la actividad enzimática para las enzimas silvestre, C222A-C228A y C202A-C222A-C228A disminuye conforme el omeprazol aumenta su concentración en el ensayo post expresión proteica. Sin embargo, el ensayo *in situ* arrojó resultados peculiares, a dos horas de ser incubadas las enzimas con el fármaco el porcentaje de actividad residual para la doble mutante C222A-C228A se mantiene casi en su 100%, para la enzima carente de las tres cisteínas el porcentaje de actividad residual se vio afectado solo en un 20%, fenómeno similar al reportado por López-Velázquez y cols., en 2014, a nivel celular, el fármaco afecta el desarrollo de Unidades Formadoras de Colonia conforme la concentración de omeprazol se incrementa. Se concluye que el omeprazol logra traspasar barreras membranales en la célula, que las cisteínas superficiales son las primeras en encontrarse con el fármaco, pero además también con las cisteínas que están más al centro de la enzima, la Cys 127 y la Cys 14.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las parasitosis intestinales constituyen un problema de salud pública en todo el mundo, particularmente en los países con clima tropical, subtropical, condiciones sociodemográficas y económicas con deficiente educación en salud, con mayor riesgo de diseminación de parásitos entre los que se encuentra México (Zarate, 2016). Cuando estos padecimientos son causados por microorganismos resistentes al tratamiento convencional, el periodo de la enfermedad se prolonga y el riesgo de muerte aumenta. Además, la eficacia de los tratamientos utilizados se ve reducida, puesto que los pacientes, permanecen mayor tiempo con la infección y pueden contagiar a otras personas con microorganismos resistentes (Reyes-Vivas, et al. 2014, Adam, *et al.* 2016).

La OMS reportó que para el 2011 por lo menos 46 millones de niños de los países en vías de desarrollo corrían el riesgo de padecer infecciones parasitarias. En el caso de los niños infectados, los parásitos intestinales causan anemia, deficiencia de vitamina A, retraso en el crecimiento, malnutrición, y trastornos del desarrollo físico y cognitivo (OMS, 2011)

Estas enfermedades causadas por parásitos pueden afectar a personas de cualquier grupo de edad y socioeconómico de manera indistinta, sin embargo, la población infantil en edad escolar ha resultado ser una de las más afectadas debido a la exposición a factores de riesgo como son: vulnerabilidad inmunológica, convivencia estrecha por periodos prolongados con otros niños, hábitos higiénicos

deficientes, ingesta de agua y alimentos contaminados, carencia de profilaxis antiparasitaria, convivencia estrecha con perros y gatos no desparasitados, entre otros (Zarate, 2016)

Un ejemplo de este fenómeno es la giardiasis, la cual, es la enfermedad que ocupa el primer lugar en las causas de diarrea provocada por parásitos protistas (López-Velázquez *et al*, 2004)

Esta parasitosis es causada por el protista *Giardia lamblia*, organismo cuyo ciclo de vida consta de dos principales estadios, el quiste (forma infectiva) y el trofozoito (forma vegetativa). *G. lamblia* se aloja en el intestino delgado de invertebrados y vertebrados incluyendo al hombre (Ankarklev, 2010).

Entre los fármacos que se utilizan para tratar la giardiasis se encuentran la nitazoxanida, el benzimidazol, la quinacrina y la furazolidona, los cuales son compuestos derivados del 5-nitroimidazol. El metronidazol y la nitazoxanida son los fármacos de primera línea que se emplean para su tratamiento; sin embargo, el uso de estos compuestos no siempre es el adecuado, pues se ha reportado la existencia de cepas resistentes, además de que algunos pacientes pueden presentar susceptibilidad a algunos de ellos y sus efectos adversos pueden llegar a ser muy severos (Reyes-Vivas *et al*. 2014). Es por ello que permanece la necesidad de generar nuevos blancos moleculares o tratamientos alternativos para tratar la giardiasis. En este sentido, se han propuesto enzimas de la vía glucolítica de *G. lamblia* como blancos terapéuticos, pues al carecer de fosforilación oxidativa, éste parásito obtiene la energía principalmente de la glucólisis y de la ruta de la Arginina-dihidrolasa (Jarrol *et al*, en Luján, 2011).

## **1.1 Generalidades de *Giardia lamblia***

*G.lamblia* es un organismo eucarionte parásito flagelado causante de Giardiasis, enfermedad mundial que afecta a millones de personas, principalmente a niños (López-Velázquez *et al*, 2004). Las especies de este género tienen dos principales estadios en su ciclo de vida, trofozoito y quiste. La infección comienza con la ingesta de quistes, estos pueden sobrevivir a condiciones cambiantes en el medio, luego en el intestino se convierten en trofozoitos que son la forma vegetativa de este parásito (Adam, 2001). Los síntomas de la infección son gastrointestinales, incluyen diarrea, hinchazón abdominal, entre otros, también existen infecciones asintomáticas (Adam *et al*, 2016). La infección comienza con la ingesta de quistes ya sea en agua contaminada, por contacto persona-persona, contacto animal-persona o incluso por la práctica sexual oral-anal. Con 10 quistes que se ingieran como mínimo, se producirá la infección, esta comienza con la llegada de los quistes al intestino delgado y sufriendo un desenquistamiento pasarán a su segundo estadio de vida, el trofozoito que se alojará y multiplicará por fisión binaria en el intestino. (Theel *et al*. 2016).

### **1.1.2 Taxonomía de *Giardia lamblia***

El descubrimiento de este parásito fue en 1681 por Antony van Leeuwenhoek, así fue como comenzó una línea de investigación para la época y hasta ahora sobre este parásito, pues tiene características morfológicas específicas que hicieron difícil su clasificación taxonómica. Después de varios años se posicionó al parásito dentro del Phylum Metamonada, Clase Trepomonadea, Orden Diplomonadida y del Suborden Hexamitidae. Los miembros de esta familia se caracterizan por ser

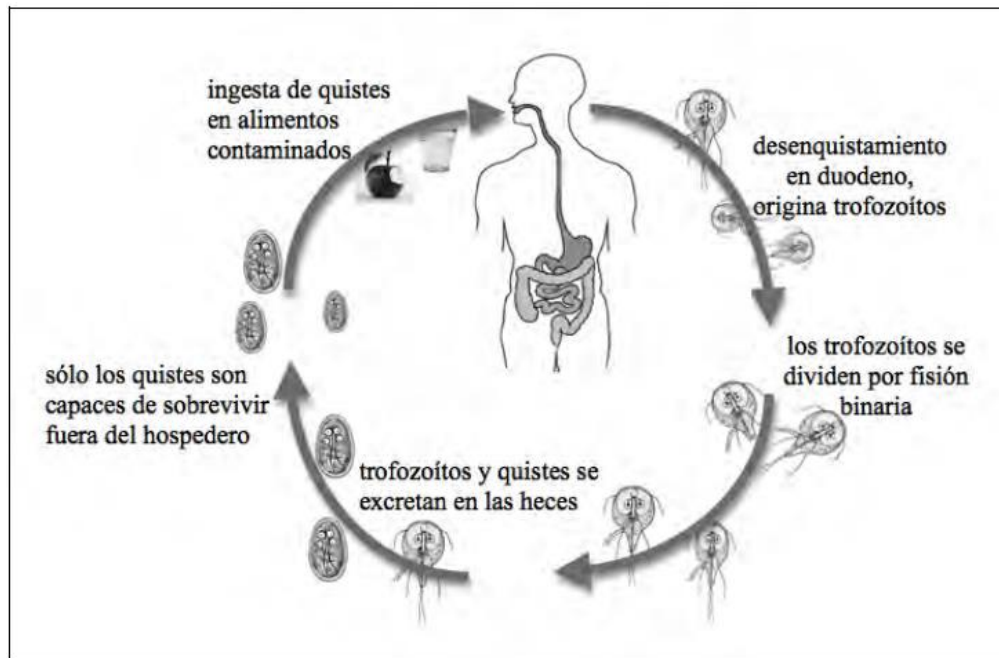
protozoarios flagelados, poseer dos núcleos, carecer de mitocondrias y tener un disco ventral adhesivo. Lambl, en 1859 describió por primera vez detalladamente la morfología del parásito, así fue que el epíteto específico del género *Giardia* es *lamblia* en honor a este científico (Thompson *et al.* 2011).

### **1.1.3 Ciclo de vida e invasión del hospedero**

*G. lamblia* en su ciclo de vida tiene dos formas bien diferenciadas, un trofozoito móvil que se encarga de invadir el intestino y un quiste que es la forma de transmisión del parásito.

Se considera que los quistes se ingieren de muchas maneras, entre ellas, persona-persona, agua contaminada, comida, contacto con animales, la mayor incidencia de casos es por agua contaminada, incluso el agua de albercas de uso común (Figura 1) (Adam, 2016). Se han reportado casos donde la infección no se presenta de la misma manera, como el caso de un hombre de 40 años que al regreso de un campamento presentó fiebre, diarrea y espasmos abdominales. Otro caso donde una familia fue contagiada por uno de los hijos. Incluso el caso de un hombre mexicano residente del estado de Virginia en Estados Unidos, trabajador de un restaurante de comida rápida, este hombre no presentaba síntomas evidentes de alguna infección, sino después de un tiempo preparando la comida de este lugar, su tratamiento consistió en metronidazol, albendazol, y nitazoxanida, sin embargo, este tratamiento no tuvo éxito y se tuvo que combinar al metronidazol con paromomicina (Nash, 2013)





**Figura 1. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*.** Una vez que el hospedero ingiere los quistes, estos pasan al intestino, en la región del duodeno, ahí desenquistan y se originan los trofozoitos que se dividirán por fisión binaria. Algunos trofozoitos y quistes se desechan en las heces. Los quistes son los únicos que sobreviven fuera del hospedero. El ciclo se completa cuando los quistes vuelven a ser ingeridos (Tomada de Enríquez-Flores, 2012).

#### 1.1.4 Importancia epidemiológica

Este parásito afecta a millones de personas al año por lo fácil que es su transmisión, pues se encuentra en agua, comida, superficies de uso cotidiano como el baño. Sin embargo, aún no se puede controlar en su totalidad, pues se ha demostrado que la ruta de infección más rápida es por agua contaminada, en su gran mayoría se debe por almacenamientos prolongados de agua pluvial o un almacenaje de agua limpia en exteriores. Otro problema, es que *Giardia* está asociado a otros parásitos, lo que dificulta su diagnóstico y control.

Esta parasitosis es cosmopolita, incluso Estados Unidos, reporta miles de casos al año, pero ya se hacen estudios relacionados y programas de registro de personas

infectadas para tener un control sobre la prevalencia de esta enfermedad y monitorear si esta aumenta o disminuye (Adam *et al.* 2016).

En México se considera a la giardiasis dentro de las 20 principales enfermedades causadas por parásitos intestinales y se considera que tiene una distribución uniforme en el país, teniendo graves implicaciones en el estado nutricional de la población infantil y en la tasa de crecimientos de esta (Enríquez Flores, 2005).

Para los años 2015 y 2016 según el boletín epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud, para México en estos dos años se considera a la Giardiasis dentro de las 10 enfermedades parasitarias más comunes, teniendo un acumulado de 21, 616 nuevos casos siendo Chiapas, Ciudad de México y Sinaloa los estados con mayor frecuencia de casos nuevos (Vigilancia epidemiológica, 2016).

Una de las rutas para entender la epidemiología de este parásito es que existe una “zoonosis-reversa” esto se refiere a que un humano puede infectar a algunos mamíferos, como primates, marsupiales, coyotes, entre otros, incluso en algunas regiones de Australia los perros son infectados por algún descuido del manejo de heces fecales de los niños. No todas las especies del género infectan a los mismos organismos, algunas especies infectan aves, otras a mamíferos, como es el caso de *G. lamblia* (*G. duodenalis*) (Tabla 1). (Thompson, 2011)

**Tabla 1.** Clasificación de las especies del género *Giardia*. (Tomada de Thompson, 2011)

<b>Especies</b>	<b>Hospederos</b>
<b><i>G. lamblia</i></b>	Mamíferos domésticos y silvestres incluyendo al humano.
<b><i>G. entérica</i></b>	Humanos, primates, perros y algunas especies de mamíferos silvestres.
<b><i>G. agilis</i></b>	Anfibios
<b><i>G. muris</i></b>	Roedores
<b><i>G. ardeae</i></b>	Aves
<b><i>G. psittaci</i></b>	Aves
<b><i>G. microti</i></b>	Roedores
<b><i>G. canis</i></b>	Perros y otros canes
<b><i>G. cati</i></b>	Gatos
<b><i>G. bovis</i></b>	Ganado
<b><i>G. simondi</i></b>	Ratas

### **1.1.5 Tratamiento contra la giardiasis**

Una vez que el parásito se adhiere al duodeno, el sistema inmune del hospedero es estimulado, pero la respuesta es local, pues este parásito no invade tejidos. Aunque el sistema inmune del hospedero sea eficiente, aún no se ha demostrado que la infección provoque la liberación de sustancias químicas que lo ayuden a protegerse. Se considera que la eficiencia de este parásito infectando al hospedero tiene que ver con la liberación de proteasas de serina y cisteína, que actúan sobre la barrera epitelial del intestino, así se origina la inflamación y una respuesta inmune del hospedero. Actualmente no se sabe cómo se induce la respuesta inmune. (Enríquez-Flores, 2012).

El uso de Tinidazol, Metronidazol y Nitazoxanidas es común para el tratamiento de la giardiasis, es bueno, pero no tienen una eficacia perfecta. También se usa la Quinacrina, Paromomicina, sin embargo, estos fármacos no son tan eficaces. En

cambio se emplean tratamientos combinando algunos fármacos para una mejor respuesta. (Nash, 2013).

## **1.2 Biología celular de *Giardia lamblia***

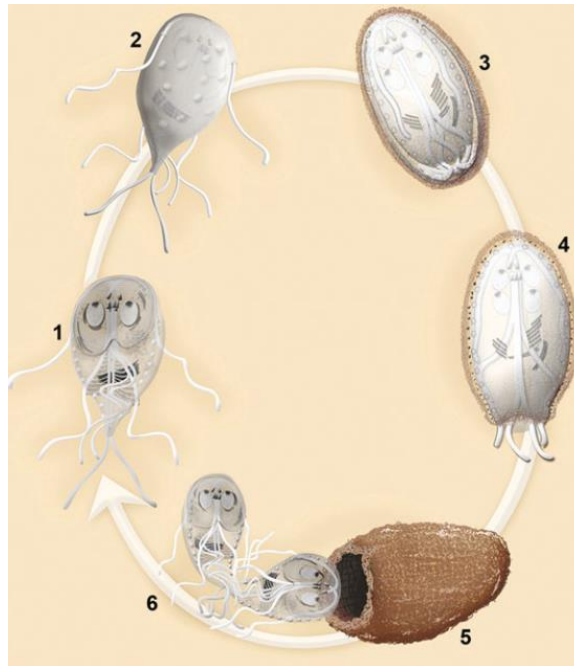
Después de analizar al parásito gracias a técnicas moleculares, hay consenso en que *G. lamblia* es un parásito de divergencia temprana, comparado con otros géneros de parásitos. No solo *G. lamblia* si no las especies del grupo *Hexamitidae* son considerados los grupos más basales en la rama de los eucariontes. Se pensaba que *Giardia lamblia* no tenía organelos como aparato de Golgi o mitocondrias, pero se descubrió que si tiene aparato de Golgi y que además es característico cuando las células comienzan a formar quiste, también se probó que tiene remanentes de mitocondrias denominados mitosomas (Adam, 2001). Estos mitosomas, son organelos carentes de ADN, rodeados por una doble membrana, participan en la maduración de proteínas hierro-azufre, pero hasta ahora no se les considera que participen en el metabolismo energético.

Todas las teorías hasta ahora propuestas sugieren que estos organelos vestigiales, los mitosomas, sufrieron un evento de endosimbiosis en las células, considerados dichos mitosomas como relictos de las mitocondrias. Estos organelos son muy reducidos en tamaño y perdieron las funciones de generar energía, durante la evolución independiente de los Diplomonádidos porque el ancestro estaba adaptado a un nicho microaerófilico más marcado en el ambiente. (Hehl *et al.* 2007)

*G. lamblia* es considerado un buen modelo eucarionte para el estudio de procesos celulares como la diferenciación celular y procesos de óxido-reducción, como ya se

mencionó, este parásito tiene características únicas como la ausencia de mitocondrias y de peroxisomas.

El ciclo celular comprende dos estadios, el trofozoito y el quiste, comenzando el ciclo con el trofozoito que sufre diversos cambios para poder enquistarse, todo gracias a proteínas, cambios en el medio como pH, sales, etc. (Benchimol, *et al.* en Luján, 2011) (Figura 2).



**Figura 2. Ciclo celular de *Giardia lamblia*.** 1: Trofozoito; 2: Enquistamiento, donde se forman ESV's (vesículas específicas del enquistamiento); 3: Quiste: Los flagelos de internalizan por completo, el cuerpo medio se fragmenta, se presentan de 2 a 4 núcleos, se forma la pared del quiste; 4: Desenquistamiento temprano: La pared del quiste se abre por la parte de los flagelos con ayuda de proteínas que rompen la pared; 5: Desenquistamiento tardío: El quiste está preparado para formar a los trofozoitos; 6: Por fisión binaria se forman los trofozoitos (Tomada de Benchimol, *et al.* en Luján, 2011)

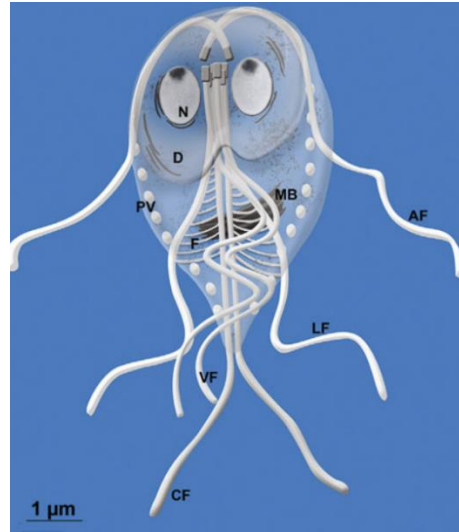
## 1.2.1 Morfología

### 1.2.1.1 Trofozoito

Los trofozoitos de *G. lamblia* son la forma invasiva de las células epiteliales del intestino y miden de 12 a 15 micras de largo y de 5 a 9 micras de ancho. El citoesqueleto incluye un cuerpo medio, cuatro pares de flagelos en posición anterior, posterior, caudal y ventral de tal manera que en cada región hay dos flagelos, también tienen un disco ventral, que sirve como una ventosa para adherirse a la superficie del intestino.

Tienen dos núcleos ubicados simétricamente en la parte anterior del cuerpo, por esto se conoce como el parásito que “sonríe” pues el cuerpo medio está justo debajo de los núcleos a manera de línea. Alrededor de los núcleos se encuentra el retículo endoplásmico. También tiene vacuolas lisosomales, gránulos de glicógeno y ribosomales, estos se encuentran en el citoplasma. Existe el aparato de Golgi, sin embargo, no está presente en el estado vegetativo, es decir, en el trofozoito. (Figura 3). (Benchimol *et al.* en Luján, 2011)

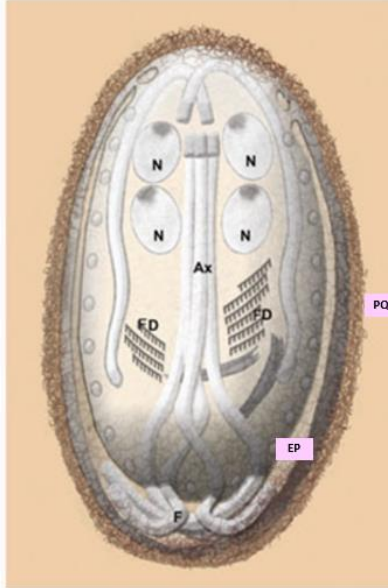
Los flagelos y el disco ventral están compuestos de proteínas de citoesqueleto clásicas como  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina, junto con proteínas derivadas de la giardina como la  $\alpha$ -giardina,  $\beta$ -giardina,  $\gamma$ -giardina y  $\delta$ -giardina, que pertenecen a una familia única para el género *Giardia*. (Ankarklev, 2010).



**Figura 3. Trofozoito de *Giardia lamblia*.** D: Disco ventral adhesivo, N: Núcleo, MB: Cuerpo mediano, PV: Vesículas periféricas, AF: Flagelo anterior, LF: Flagelo posterior, VF: Flagelo ventral, CF: Flagelo caudal, F: Funis, microtúbulos conectados a la altura del cuerpo mediano (Tomada de Benchimol *et al.* en Luján, 2011).

#### 1.2.1.2 Quiste

El quiste es la forma infectiva del parásito, de forma ovalada, mide de 5 a 10 micras de diámetro, contiene cuatro núcleos. Está cubierto por una pared gruesa que va de 0.3 a 0.5 micras y se compone por una red de filamentos, esta pared lo hace soportar condiciones adversas incluso de desecación. Se necesita de un mínimo de 10 quistes ingeridos para que el hospedero pueda contraer la infección (Figura 4) (Ankarklev *et al.* 2010)



**Figura 4. Quiste de *Giardia lamblia*.** N: Núcleo, Ax: Axonemas, FD: Disco ventral fragmentado, F: Flagelos, EP: Espacio peritrófico, PQ: Pared del quiste.

### 1.3 Metabolismo de *Giardia lamblia*

#### 1.3.1 Sistemas de defensa antioxidante en *G. lamblia*

*G. lamblia* es un microorganismo microaerófilico, no tolera niveles elevados de oxígeno. En el intestino superior donde éste parásito reside durante la infección la concentración de oxígeno es de aproximadamente 60  $\mu\text{M}$ . *Giardia* es capaz de soportar hasta 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{O}_2$  disuelto. El mecanismo detallado de por el cual puede desintoxicar el medio de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas durante un estímulo como el estrés, aún no está claro. Además, un fenómeno curioso es que las enzimas ROS detoxificantes como la superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, glutatión o la glutatión reductasa están ausentes en *G. lamblia*.

A pesar de no contar con dichas enzimas para detoxificar el medio, posee una NADH oxidasa característica de los procariontes, que produce  $\text{H}_2\text{O}$ . También, una



disulfuro reductasa de tipo tiorredoxina y tioles de bajo peso molecular como L-cisteína, tioglicolato, sulfito y coenzima A. (Raj, *et al.* 2014).

### **1.3.2 La cisteína como parte del sistema antioxidante de *Giardia lamblia***

La cisteína gracias a su grupo tiol tiene una gran capacidad de donar electrones y oscilar entre un estado reducido a diversos estados oxidados, le permiten a este residuo participar en muchas funciones celulares. Así, los residuos de cisteína tienen un papel importante en la estabilidad, plegamiento, unión de metales, catálisis enzimática y en la regulación proteica (González-Segura, *et al.* 2003)

La L-cisteína es el principal tiol de bajo peso molecular en *G. lamblia* y los tioles reducidos sirven como defensa contra el estrés oxidativo y como mecanismo para mantener un entorno intracelular reducido. Este aminoácido tiene propiedades antioxidantes, y se utiliza para la biosíntesis de glutatión, que se encuentra en la mayoría de los eucariotas incluido el ser humano (Raj, *et al.* 2014)

### **1.3.3 El contenido de cisteínas en las proteínas de *Giardia lamblia***

*G. lamblia* tiene 5 proteínas disulfuro isomerasas, estas enzimas están implicadas en procesos como formación de puentes disulfuro y reacciones de intercambio tiol-disulfuro, para el correcto plegamiento de proteínas de secreción, previo a modificaciones posteriores y transporte (McArthur, *et al.* 2001).

Las proteínas de *G. lamblia* son consideradas ricas en cisteínas, de tal manera que están presentes en procesos claves como el enquistamiento. La cisteína forma parte de las proteínas de la pared del quiste (CWP's) o las proteínas de superficie variables (VSP's), formando parte de diversos motivos estructurales de las

proteínas de este protozoario. Un dato importante es que, en estudios bioinformáticos se encontró que el 0.63% del genoma de *Giardia lamblia* codifica para proteínas con alto contenido en cisteínas. Además 173 proteínas de este protozoario tienen más del 10% de cisteínas. (Davids, *et al.* 2006).

#### **1.4 Metabolismo energético de *Giardia lamblia***

Este protozoario no genera de *novo* lípidos, purinas y pirimidinas y al carecer de mitocondrias y fosforilación oxidativa, los trofozoitos usan glucólisis y la ruta de la arginina dihidrolasa para la producción de energía, en forma de ATP (Jarrol, *et al.* en Luján, 2011)

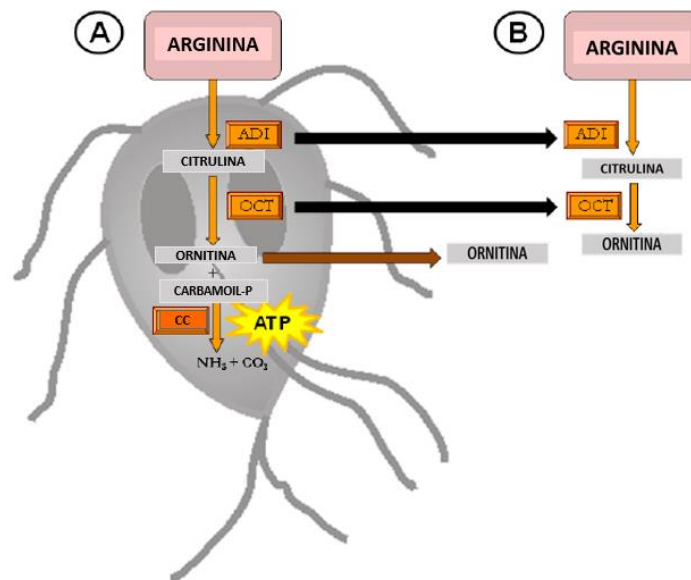
##### **1.4.1 Vía de la arginina dihidrolasa**

*G. lamblia* utiliza la vía de la arginina dihidrolasa para la obtención de energía cuando las condiciones en el medio son anaerobias. Los intermediarios de esta vía también son importantes para otras funciones como la regulación de VSP's (Touz *et al.* 2008)

En esta ruta la arginina se convierte en citrulina y amonio, posteriormente se lleva a cabo la transferencia de un grupo carbamil de la citrulina al ortofosfato, por último se da la fosforilación del ADP para generar ATP. (Jarrol, *et al.* en Luján, 2011). Esta vía de obtención de energía representa una fuente significativa de ATP, debido a que aunque la ganancia neta es de 1 molécula de ATP, el rendimiento energético obtenido a partir de la arginina, es de 7 a 8 veces mayor que el obtenido a partir de la glucosa (Figura 5) (Schofield, *et al.* 1992, Li *et al.* 2009).

Schofield y colaboradores en 1990 demostraron en medio de cultivo de *Giardia lamblia* que existía un agotamiento rápido de arginina en el medio y una producción concurrente de amonio y ornitina, todas las pruebas que se llevaron a cabo fue con la detección de ciertos compuestos como la propia arginina deiminasa o la ornitina. Gracias a todos estos experimentos se corroboró la existencia de esta ruta de obtención de energía en *G. lamblia*. (Jarrol, *et al.* en Luján, 2011)

Además de *G. lamblia*, la vía de la arginina dihidrolasa se ha encontrado hasta el momento en otros dos organismos eucariontes, *Trichomonas vaginalis* y *Trichomonas foetus* (Knodler, *et al.* 1997)



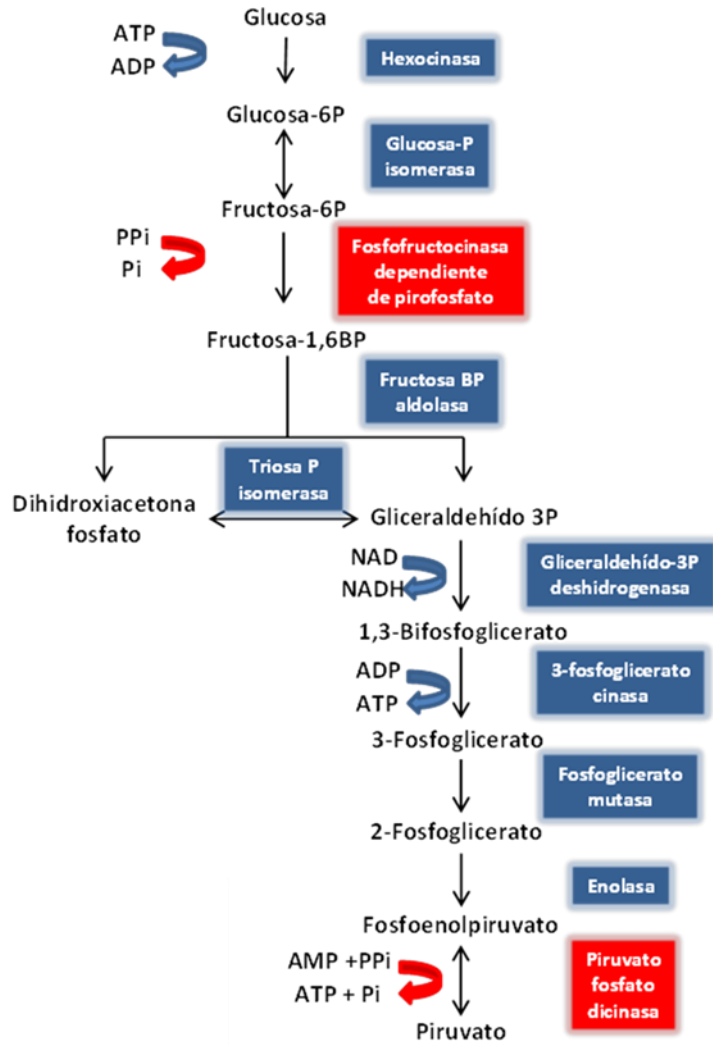
**Figura 5. Vía de la arginina dihidrolasa.** A: *Giardia lamblia* toma la arginina del lumen intestinal del hospedero para producir ATP, secretando ornitina. B: La arginina deiminasa (ADI) y la ornitina carbamil transferasa (OCT) se liberan al lumen intestinal para consumir la arginina del medio (Modificada de Rópolo, 2010).

Algo curioso de *Giardia lamblia* es que, es capaz de exportar a las enzimas ADI y OCT para consumir la arginina del lumen intestinal para que de esta manera el hospedero no pueda producir óxido nítrico, que inhibe el crecimiento o incluso el enquistamiento de este parásito (Rópolo, *et al.* 2010).

#### **1.4.2 Glucólisis en *Giardia lamblia***

Como ya se mencionó *Giardia* es un organismo basal en la rama de los eucariontes, otro punto que apoyó esto es que las proteínas glucolíticas conservadas en eucariontes también se encontraron en el genoma de *Giardia lamblia* (Han *et al.* 2012).

La vía de la glucólisis llevada a cabo por la mayoría de los eucariontes es la vía Embden-Meyerhof-Parnas en donde se obtienen dos moléculas de ganancia neta de ATP. Sin embargo, hay algunos organismos que utilizan el pirofosfato (ppi) como donador de grupos fosfato, a esta glucólisis se le conoce como dependiente de pirofosfato (ppi), tal es el caso de *Giardia* que sustituye a las enzimas fosfofructo cinasa y piruvato cinasa por la fosfofructo cinasa y piruvato fosfato dicinasa (PPDK) dependientes de ppi; de esta manera la ganancia neta de ATP es de 5 moléculas, haciendo a esta vía más eficiente que la glucólisis clásica (Figura 6) (Feng, *et al.* 2008), Fernández-Lainez, 2017) Esta parte no me queda clara, pues hasta donde recuerdo también contiene PK y PPDK . Pero en el programa del KEGG no aparecen activas



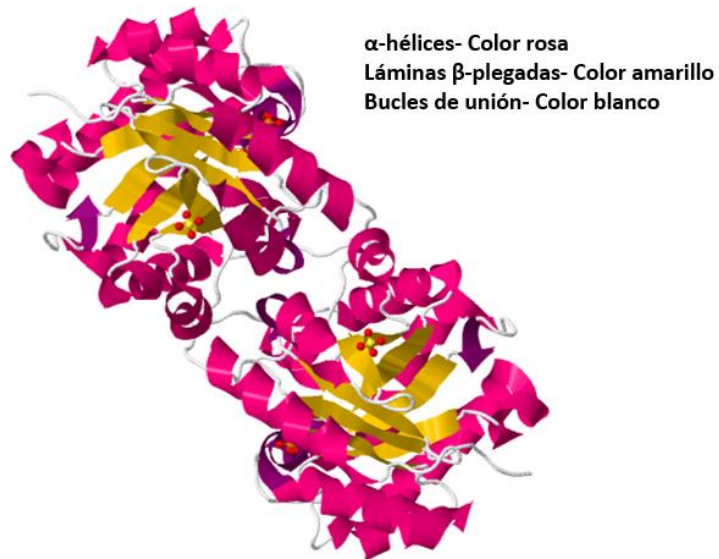
**Figura 6. Esquema de la glucólisis en *Giardia lamblia*.** (Tomada de Fernández-Lainez, 2017)

Uno de los pasos claves en la glucólisis es la isomerización de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a gliceraldehído 3-P (GAP), siendo este último el único en seguir la ruta. Dicha isomerización está mediada por la enzima triosafosfato isomerasa (TIM). La deficiencia de esta enzima, resultaría en que la ganancia de energía en forma de ATP se vería comprometida, lo cual afectaría incluso a la supervivencia del parásito (Fernández-Lainez, 2017)

Grupos de investigadores como el de López-Velázquez y colaboradores han propuesto a esta enzima glucolítica como posible blanco para generar agentes anti-giardíacos más específicos (Reyes-Vivas, *et al.* 2014).

### **1.5 Triosafosfato isomerasa**

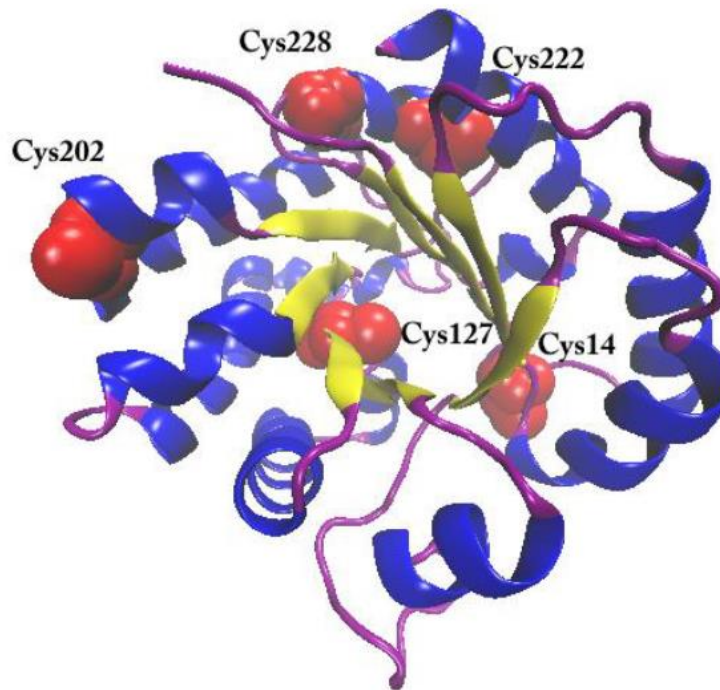
Esta enzima tiene un motivo estructural barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, el cual está formado por ocho láminas  $\beta$ , rodeadas de ocho  $\alpha$ -hélices unidas por bucles, los residuos del sitio activo pertenecen a la misma cadena polipeptídica, son la Lisina 13, Histidina 95 y el ácido glutámico 170, estos se encuentran situados en la región central del barril y se han conservado entre diferentes especies (Figura 7) (Richard *et al.* 2014)



**Figura 7. Estructura terciaria de TIM en formato de asas y listones (Cristal PDB 2DP3)**

### **1.5.1 Triosafosfato isomerasa de *Giardia lamblia***

La TIM de *Giardia lamblia* (GITIM) consta de 257 amino ácidos con un peso de 27.9 kDa. Tiene un total de 5 cisteínas por monómero, distribuidas de tal manera que la cisteína 14 se encuentra en la interfase, la cisteína 127 es un residuo altamente conservado además de estar ubicado en el núcleo hidrofóbico de la proteína, por último 3 cisteínas superficiales en posición 202, 222 y 228 (Figura 8) (Reyes-Vivas, *et al.* 2007)



**Figura 8. Estructura terciaria de un monómero de GITIM.** Se observa la distribución de las 5 cisteínas que contiene (Fernández-Lainez, 2017)

### 1.5.2 El contenido de cisteínas en la GITIM comparado con otras especies

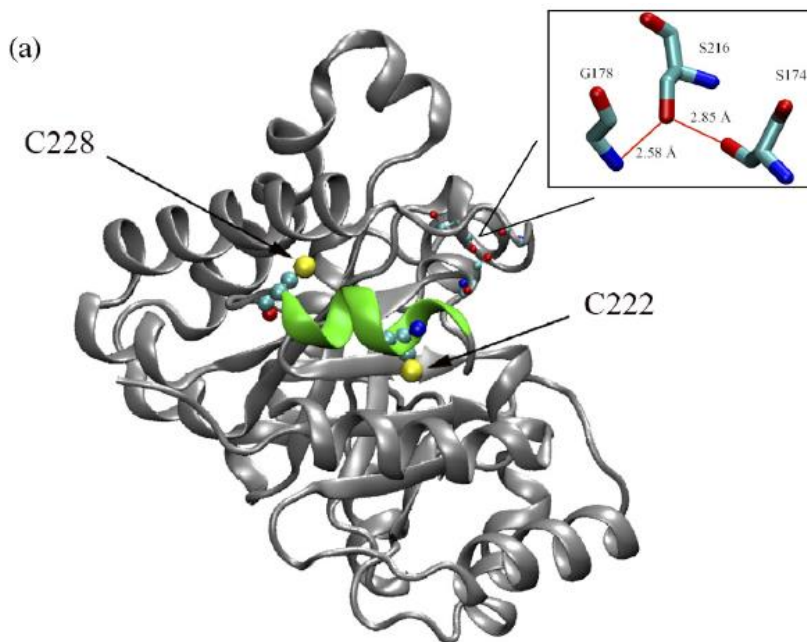
Davids y colaboradores analizaron 13 diferentes organismos con el objetivo de comparar el número de residuos de cisteínas promedio entre las diferentes especies evaluadas. Se analizó el genoma de *G. lamblia* encontrando que 173 proteínas conformadas por más de 400 aminoácidos, tienen un contenido de más del 10 % de cisteína, además reportan también que 152 son proteínas integrales de membrana. Lo que más llama la atención de los datos de este análisis es que el 0.63% de todo el genoma de *G. lamblia* codifica para proteínas con alto contenido de cisteína, siendo este porcentaje el más alto de entre todos los organismos analizados (Davids, *et al.* 2006). En 2004 López-Velazquez y colaboradores realizaron un estudio donde evaluaron el porcentaje de identidad de GITIM con otros organismos,

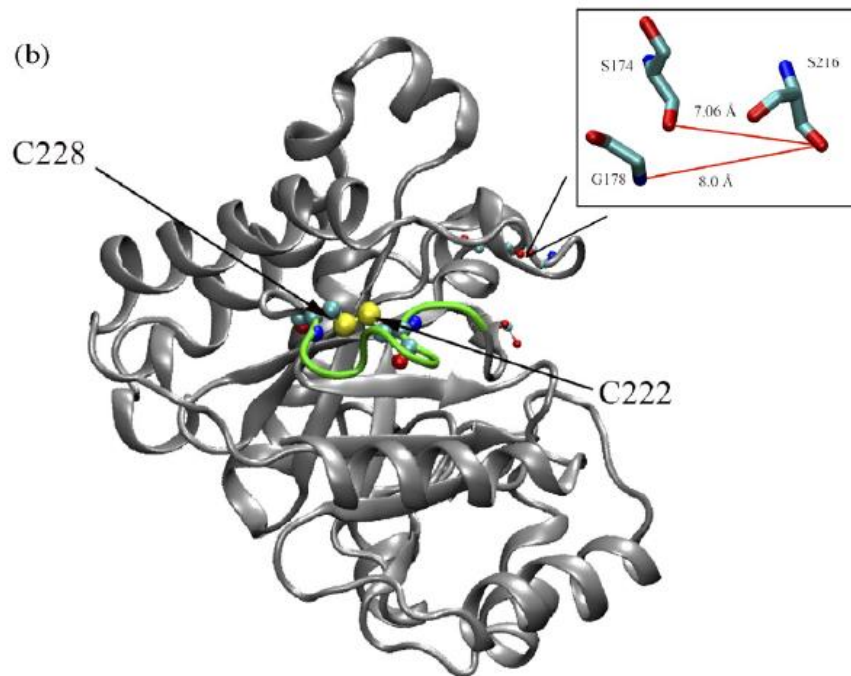


las TIM's de los organismos comparados fueron *Entamoeba histolytica* (EhTIM), *Plasmodium falciparum* (PfTIM), *Trypanosoma brucei* (TbTIM), *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), *Termitoga maritima* (TmTIM) y la de humano (HuTIM). Los datos a resaltar de este trabajo son que las cisteínas entre PfTIM y GITIM tienen cisteínas en diferentes posiciones en su secuencia primaria, esto es porque GITIM tiene una inserción de siete residuos, sin embargo las posiciones de las cisteínas entre ambos organismos son equivalentes. Por otro lado los porcentajes de identidad entre los organismos evaluados y la GITIM, oscilan entre el 41 y el 46 %. Sin embargo, aunque las TIM's de estos organismos presentan residuos de cisteína, *G. lamblia* presenta un mayor número de cisteínas tanto en TIM como en sus demás proteínas (López-Velázquez, *et al.* 2004) La función de esta enzima es esencial para la producción de ATP en la glucólisis, es por ello que se han propuesto a los aminoácidos que la conforman como blancos moleculares. Se han propuesto precisamente a los residuos de cisteínas en TIM's de diferentes organismos, por ejemplo en la región no conservada. Dicho residuo de cisteína existe en la TIM de patógenos como *T. brucei* en posición Cys 14, en *T. cruzi* en posición Cys 15 (Rodríguez-Romero, 2002)

### 1.5.3 Cisteína 222

A pesar que a partir de la cisteína 202 se propuso el modelo de oligomerización, el mismo grupo de trabajo propone también a la cisteína 222 capaz de formar un puente disulfuro intracatenario con la cisteína 228 y que estaría influyendo en la disminución de la *k<sub>cat</sub>*. Incluso proponen que este puente intracatenario promueve la pérdida de dos puentes de hidrógeno, afectando a la Serina 216, este aminoácido forma parte de un motivo que tiene contacto con el asa catalítica. Este fenómeno puede ser responsable de la afectación de la enzima (Figura 9) (Reyes-Vivas, et al. 2007).





**Figura 9. Formación del puente intracatenario entre la cisteína 222 y la cisteína 228.**  
 A: posición de las cisteínas implicadas y el arreglo estructural donde participa la serina 216.  
 B: formación del puente disulfuro entre la Cys 222 y Cys 228, donde el motivo que tiene contacto con el asa catalítica se modifica, es este cambio conformacional lo que se propone como consecuencia del enlace formado entre los residuos de cisteínas (Tomada de Reyes-Vivas *et al.* 2007).

Posterior a este trabajo, Enríquez-Flores y colaboradores reportan que la inactivación de GITIM se da por la derivatización de la cisteína en posición 222, además describen que la cisteína equivalente en la TIM de humano, Cys 127, no sufre la misma inactivación, lo que demostró que el blanco sería la cisteína 222 (Enríquez-Flores, *et al.* 2011)

Para 2013, el mismo grupo de investigación probó modificar este sitio de GITIM, cambiando a la cisteína 222 por otros residuos aminoácidos para probar de qué manera afectaba a la derivatización y estructura el que no esté la cisteína en su posición. Concluyendo que este residuo de cisteína si es un buen blanco para el desarrollo de antiangiogénicos (Hernández-Alcántara, *et al.* 2013)

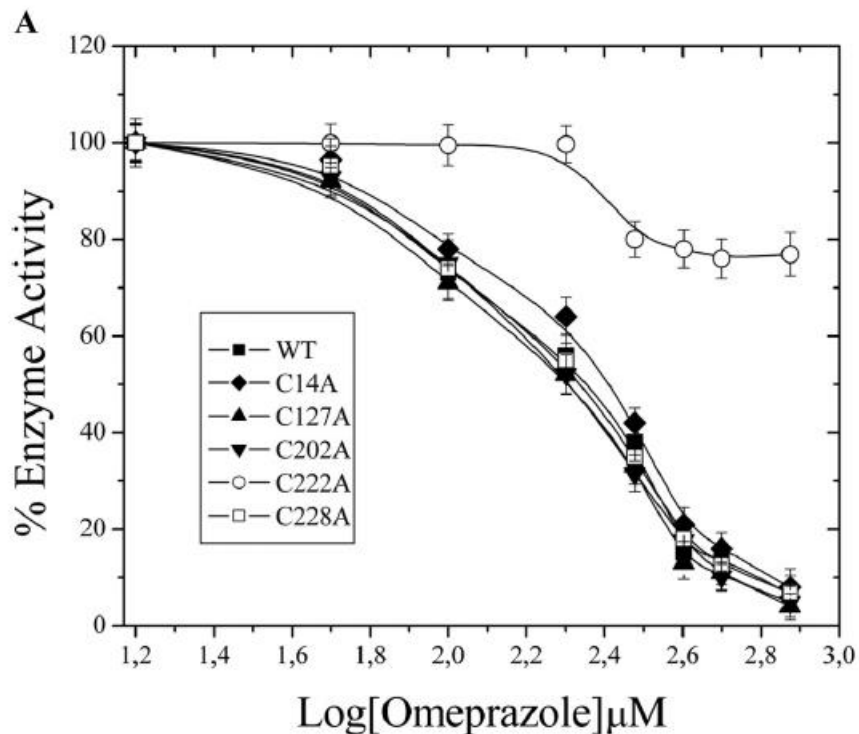
## **1.6 Triosafosfato isomerasa de *Giardia lamblia* como blanco anti giardiásico de compuestos derivatizantes de cisteínas**

Ahora que los antecedentes nos muestran que la TIM de este parásito intestinal ha sido objeto de estudio y que tiene características específicas que lo vuelven un buen blanco anti giardiásico, tales como su capacidad de inactivación mediante la modificación de uno de sus residuos superficiales de cisteína, de tal manera que las modificaciones que sufra tengan implicación a nivel estructural y funcional.

Se han probado distintos compuestos derivatizantes de cisteínas para poder inactivar a la enzima, tales como DTNB, MMTS, MTSCE, etc, sin embargo dichos compuestos no serían viables para el consumo regular por el humano. Posteriormente se propone a otro grupo de compuestos derivatizantes de cisteínas denominados benzimidazoles, para probar su efecto en la proteína. Los benzimidazoles son un grupo de inhibidores de la bomba de protones (PPI's) que se emplean para controlar la producción excesiva de ácido gástrico, actuando de manera antagonista a los receptores de las células del epitelio intestinal. A finales de los años 70 se descubrió al omeprazol, compuesto que inhibe la bomba de protones de las células parietales del estómago y con esto impide la secreción de ácido gástrico. Dicho compuesto fue el primero en ser usado clínicamente como PPI para tratar úlceras gástricas, reflujo o acidez estomacal, este fue el compuesto parental que posteriormente dio lugar a sus derivados, el esomeprazol, pantoprazol, lanzoprazol y rabeprazol. Se ha demostrado que su uso es seguro para el humano. Por otro lado, se propuso que su mecanismo de acción, se lleva a cabo por unirse covalentemente a los residuos de cisteína 813 y 892 de la enzima H<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPasa

(Olbe, *et al.* 2003). Reyes-Vivas y colaboradores consideraron que dicho mecanismo de acción podría ser útil para el uso de los PPI's como agentes inactivadores de otras enzimas que sean susceptibles por contener residuos de cisteína en su secuencia de aminoácidos (García-Torres, *et al.* 2016), y fue así que propusieron al omeprazol como un nuevo agente anti-giardíasis debido a que encontraron que es capaz de inactivar a GITIM mediante la derivatización del residuo de Cisteína en posición 222 (Reyes-Vivas, *et al.* 2014, García-Torres, *et al.* 2016).

El hallazgo del residuo de cisteína sobre el cual actúa el omeprazol, está basado en el análisis de la actividad enzimática de las mutantes sencillas de GITIM en los diferentes residuos de cisteína que contiene. En el gráfico se pudo observar que la mutante carente de cisteína en posición 222 fue la única que resistió la inactivación a concentraciones crecientes de omeprazol (Figura 10) (Reyes-Vivas, *et al.* 2014).



**Figura 10. Actividad enzimática de diferentes mutantes sencillas de cisteína de GITIM retadas con concentraciones crecientes de omeprazol.** Se observa que la inactivación es contundente conforme aumenta el omeprazol para las mutantes incluyendo a la silvestre, sin embargo se observa que no pasa lo mismo con la mutante carente de la cisteína en posición 222 (Enríquez-Flores *et al*, 2011)

Sin embargo, la resistencia a la inactivación en la mutante C222A no fue constante al 100%, si observamos el gráfico, podemos ver que la curva de la mutante C222A registra una disminución del 20% en su actividad residual. Esto sugiere fuertemente que otras cisteínas diferentes a la de la posición 222 podrían estar interactuando con el omeprazol y contribuir la inactivación observada para dicha mutante.

## 2. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con el análisis de la evidencia presentado en la introducción, sabemos que la triosafosfato isomerasa de *G. lamblia* representa un potencial blanco para el diseño de nuevos anti $giardi$ ásicos y que el omeprazol y otros PPI's podrían ser utilizados de manera segura y eficaz para ello. Sin embargo, existen aún huecos de conocimiento en cuanto al uso efectivo del omeprazol como anti $giardi$ ásico. A este respecto, quedan al menos dos preguntas más por resolver:

1. ¿Qué sucedería si en un proceso de adquisición de resistencia a fármacos *Giardia* pudiera mutar alguna (s) de sus cisteínas más superficiales (tomando en cuenta el mecanismo de acción conocido para el omeprazol contra GITIM)?
2. Hasta ahora no se ha demostrado de manera contundente que el omeprazol logre atravesar las barreras membranosas hasta llegar a GITIM y ejerza su acción de inactivación.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 General

Caracterizar el efecto del omeprazol sobre la triosafosfato isomerasa de *Giardia lamblia* *in vitro* e *in situ* y el papel de las cisteínas superficiales mediante el uso de las mutantes C222A-C228A y C202A-C222A-C228A.

#### 3.2 Particulares

- ♣ Generar cepas de *Escherichia coli* BL21 que sobre expresen la GITIM mutantes C222A-C228A y C202A-C222A-C228A.
- ♣ Determinar el efecto del omeprazol sobre la actividad enzimática de las mutantes C222A-C228A y C202A-C222A-C228A de GITIM *in vitro*.
- ♣ Determinar el efecto del omeprazol sobre la actividad enzimática de las mutantes C222A-C228A y C202A-C222A-C228A de GITIM *in situ* (en bacterias transformadas).
- ♣ Determinar la viabilidad celular de un modelo bacteriano tras incubación con omeprazol posterior a la inducción de la sobre expresión proteica de GITIM.



#### **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

El proyecto comenzó con la construcción las mutantes de GITIM C222A-C228A y C202A-C222A-C228A, continuando con las pruebas con omeprazol.

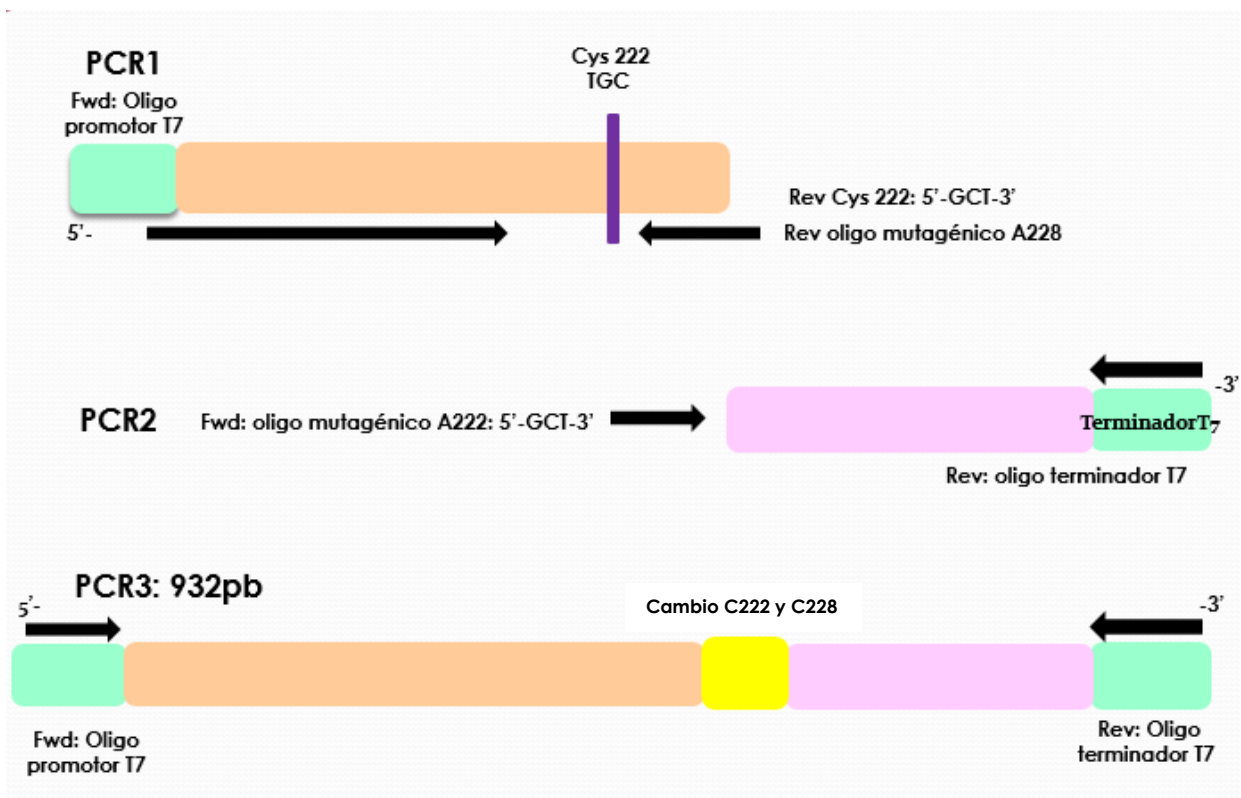
##### **4.1 Construcción de la doble mutante C222A-C228A y triple mutante C202A-C222A-C228A de GITIM**

La construcción se llevó a cabo con el método de PCR por solapamiento y extensión. Esta técnica, implica la generación de fragmentos de DNA que, en virtud de haber incorporado cebadores oligonucleicos complementarios en reacciones de PCR independientes, pueden ser efectivamente 'fusionados' en cualquier lugar a lo largo de la secuencia génica combinándolos en una segunda reacción de extensión de cebador. En PCR's separadas se amplifican dos fragmentos de la secuencia génica molde. Cada reacción utiliza un cebador flanqueante que se hibrida en un extremo de la secuencia molde y un cebador interno que se hibrida en el sitio de la mutación y contiene las bases no coincidentes (Ho, 1988).

El cambio de aminoácido en la posición C222 se logra con mutagénesis sitio dirigido usando PCR, partiendo de una construcción C228A previamente obtenida en el laboratorio, un primer PCR con oligos T7-promotor y 222-Reverse, el segundo PCR con T7-terminador y 222-forward. Los oligonucleótidos mutagénicos 222, generarán un cambio de bases añadiendo un triplete GCT que corresponda a una alanina. Por último un tercer PCR donde ya están los cambios en un solo producto. Dichos oligonucleótidos mutagénicos que se usaron son los reportados por Enríquez-Flores y cols., para generar el cambio en la posición 222 son:

**Fwd: 5'-GGAAGCAACGCTGAGAAGC-3'- Rev: 5' GCTTCTCAGCGTTGCTTCC-3'.**

Para construir la mutante triple C202A-C222A-C228A, se usó como DNA templado una construcción doble mutante C202A-C228A y de igual manera los oligonucleótidos que se utilizaron fueron para generar el cambio en posición 222 (Figura 11).



**Figura 11. Mutagénesis sitio dirigida.** Utilizando reacciones de PCR para generar el cambio en posición Cys 222 de GITIM.

Las condiciones que se utilizaron para las 3 PCR fueron las siguientes:

25 ciclos totales. 5 min a 95°C- 1 min a 95°C (correspondiente a la desnaturalización)- 1 min a 55°C (alineamiento)- 1 min a 72°C (amplificación).

Después de estos 25 ciclos, pasan 10 min a 72°C. Cada fragmento que se obtienen en los diferentes PCR es de 806 pb para PCR1, 126 pb para el segundo PCR y por último 906 pb.

#### **4.1.1 Purificación de los productos de PCR**

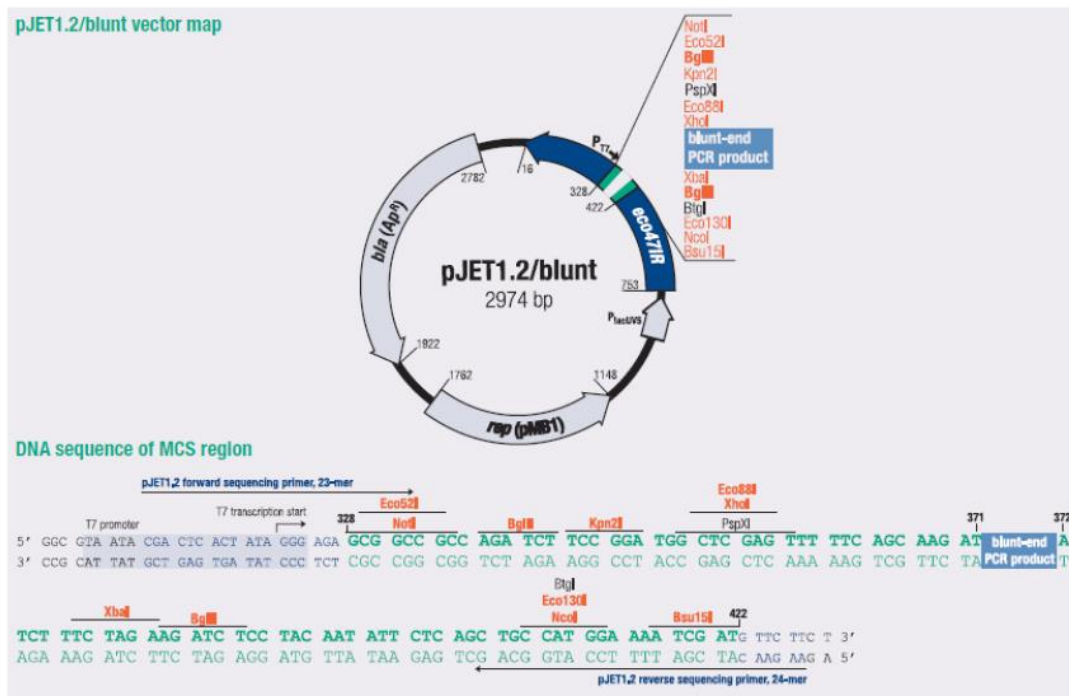
El producto de PCR 3 se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, y las bandas que se obtuvieron se purificaron usando un kit comercial, cuyo principio se basa en la retención del DNA por columnas de sílice para que todo desecho pase por la columna y el DNA quede adherido a la superficie de sílice, esto ocurre solo en presencia de una alta concentración de sales caotrópicas y pH, a un pH menor o igual que 7.5 la purificación será mejor. Estos amplicones purificados se cuantificaron usando un NanoDrop a 260 nm para saber la cantidad de DNA obtenido.

#### **4.2 Clonación de los genes gltim mutantes al vector de mantenimiento pJET**

##### **1.2/Blunt**

El DNA que se obtuvo después de la purificación, se ligó al primer plásmido pJET 1.2/blunt (Figura 12) un plásmido de mantenimiento, este plásmido está linearizado además de tener extremos romos lo que permite que no se religue, aunque en este paso se debe tener mucha precaución con las condiciones de los experimentos para que permitan seguir con los demás pasos, pues durante el proceso experimental se obtuvo en algunas pruebas colonias transformadas pero sin el inserto de interés.

Dicho plásmido además, tiene un marcador de selección por resistencia a ampicilina, también tiene otro marcador para la interrupción de un gen letal para *E.coli*, esto asegura que las colonias bacterianas que crecieron fueron aquellas que tenían el plásmido con el inserto de interés y no solo con el plásmido religado.



**Figura 12. Vector de mantenimiento pJET 1.2/blunt.** Plásmido que se utilizó para la clonación de los genes *gltim* mutantes (Thermo Scientific).

#### **4.2.1 Ligación del plásmido pJET1.2 con los genes *gltim* mutantes**

Para la ligación de los genes, tanto los genes de la doble mutante como para los genes de la triple mutante, se utilizaron aproximadamente 150 ng del producto del PCR 3, esto como ya se mencionó se calcula después de haber cuantificado el DNA total en la muestra; la concentración de plásmido es de 50 ng de pJET1.2/Blunt esto debe tomarse muy en cuenta pues siempre se debe añadir más producto de PCR que de plásmido para poder asegurar que todo el plásmido pueda incorporar los insertos. El uso de la enzima ligasa para llevar a cabo este proceso es de 5U de T4 DNA ligasa. Dicha ligación, se lleva a cabo a 22°C por dos horas.

#### **4.2.2 Transformación de cepas *E. coli* TOP10 con los productos de ligación**

Una vez teniendo el producto de la ligación se incorporaron a células competentes de *E. coli* TOP 10 usando choque térmico para la doble y triple mutante. Dichas células se inocularon en placas con ampicilina una noche a 37°C sin agitación. Posteriormente se tomaron las colonias resistentes a ampicilina que lograron crecer en la placa.

#### **4.2.3 Pruebas confirmatorias de las clonaciones**

Las pruebas confirmatorias comenzaron con un PCR de cultivo de las colonias que crecieron después de la transformación a las células *E.coli* TOP 10, disolviendo aproximadamente 1µL en agua; esta dilución se tomó como DNA templado para una reacción de PCR usando oligonucleótidos T7-forward y C228A-reverse esto para las dos mutantes, C222A-C228A y C202-C222A-C228A. Los productos de

PCR se sometieron a electroforesis usando geles de agarosa al 1% para verificar la amplificación de los genes *gltim*.

#### **4.2.4 Digestión con enzimas de restricción NdeI y BamHI**

Las reacciones de PCR en donde se amplificó un producto correspondiente al tamaño del gen *gltim*, se propagaron en medio de cultivo en placa, posteriormente se purificó DNA plasmídico y una muestra se corrió en un gel de agarosa por electroforesis para poder asegurar que el plásmido estaba íntegro.

Recordando, el gen *gltim* que se empleó está diseñado de tal manera que se flanquea con dos sitios de reconocimiento para enzimas de corte específico, 5'-NdeI y 3'-BamHI (Figura 13) ya con los plásmidos purificados se pusieron reacciones con las enzimas de restricción y las purificaciones, por 45 minutos aproximadamente, en este paso es importante tener en cuenta las especificaciones del distribuidor de las enzimas, pues en las instrucciones aseguran que las reacciones se pueden llevar en solo 5 minutos; sin embargo, esto no es del todo cierto. Los 45 minutos fueron estandarizados después de hacer pruebas piloto, pero si las reacciones se dejan por más tiempo es probable que no se libere el inserto esperado de manera íntegra, de tal manera que se puede dar como resultado negativo que la enzima corte de manera inespecífica el plásmido, obteniendo fragmentos de tamaños variados. Estas reacciones se dejan a 37°C.

El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% por electroforesis para observar la liberación del inserto de 774 pb. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio al 0.01%.



**Figura 13. Sitios de corte para las enzimas de restricción NdeI y BamHI.** Dichos sitios de corte específico flanquean al gen.

### 4.3 Secuenciación de los genes *gltim* mutantes

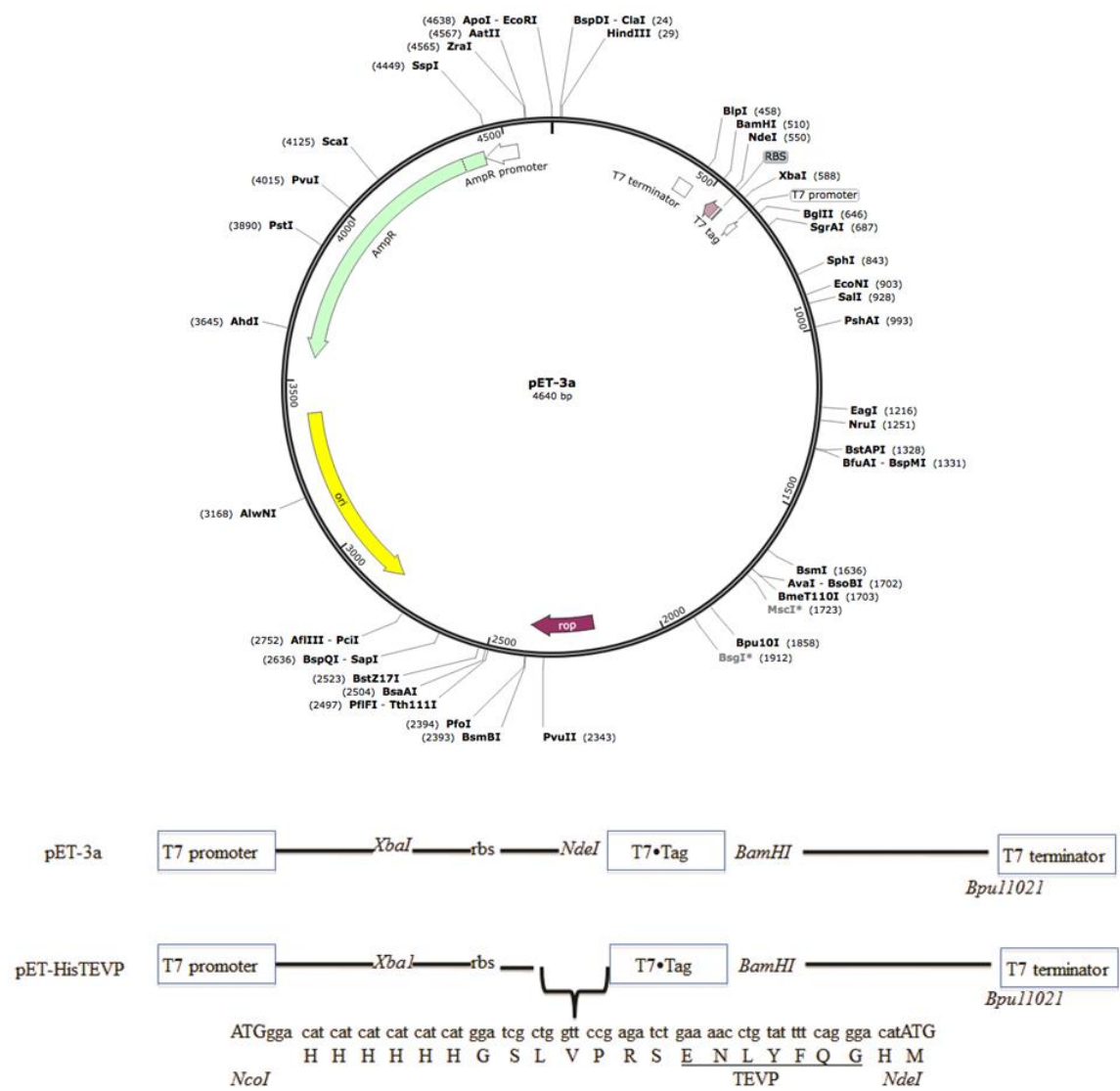
Aquellas clonas cuyas pruebas confirmatorias resultaron positivas se sometieron a secuenciación automatizada mediante el método de Sanger, utilizando los oligonucleótidos T7 promotor y terminador.

Para conservar las clonas positivas, se dejaron crecer en medio de cultivo hasta llegar a una D.O de 0.6, se almacenaron en tubos de 1 ml con ampicilina 100µg/mL y glicerol al 9% a -70°C.

### 4.4 Sub-clonación de los genes *gltim* mutantes al plásmido de expresión pET3aHisTev

Para la subclonación de los genes *gltim* con los respectivos cambios, se utilizaron los productos que dieron positivo para todas las pruebas y fueron almacenados en glicerol. Para obtener de nuevo el inserto de interés se sometieron a una digestión con las enzimas NdeI y BamHI, además el plásmido pET3aHisTev que introduce una secuencia de 6 Histidinas (His-Tag) en el extremo amino terminal y una secuencia de reconocimiento para la proteasa del virus del tabaco, también se sometió a una digestión con las mismas enzimas para linearizarlo (Figura 14)

(Enríquez-Flores, 2011). También para estas reacciones se ocuparon 50 ng del plásmido que se sometieron a dicha digestión 45 minutos a 37°C. Ambos productos de digestión fueron purificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.



**Figura 14. Plásmido pET3a-HisTev.** Vector que contiene el gen GITIM con el cambio C228A. La flecha amarilla indica el sitio donde el gen se inserta en el plásmido, esto además flanqueado por sitios de reconocimiento para enzimas NdeI y BamHI, para pruebas de confirmación de la presencia del gen (Imagen modificada de Enríquez-Flores, 2012)



#### **4.4.1 Ligación de los genes *gltim* al plásmido pET3aHisTevP**

Para esta ligación se usaron las mismas condiciones que para el primer plásmido, con una relación 3:1 de genes *gltim* contra el plásmido. Usando la misma ligasa, T4 ligasa, un total de dos horas a 22°C.

#### **4.4.2 Transformación de cepas *E. coli* TOP10 con los productos de ligación**

Con los productos de ligación se transformaron células *E. coli* TOP 10 competentes mediante el método de choque térmico, luego se inocularon en placa y se dejaron crecer una noche a 37°C. Se tomaron como clonas positivas aquellas resistentes a ampicilina que lograron crecer en la placa.

#### **4.4.3 Pruebas confirmatorias de las clonaciones**

Las pruebas confirmatorias empezaron de igual manera con un PCR siguiendo las mismas condiciones que con el primer plásmido empleado para cada una de las mutantes, C222A-C228A y C202-C222A-C228A. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa por electroforesis para verificar la amplificación de los genes *gltim*.

#### **4.4.4 Digestión con enzimas de restricción NdeI y BamHI**

Las reacciones de PCR en donde se amplificó un producto correspondiente al tamaño del gen *gltim*, se propagaron en medio de cultivo en placa, posteriormente se purificó DNA plasmídico y luego una alícuota se corrió en un gel de agarosa al 1% por electroforesis para corroborar la integridad del plásmido.

Posterior a esto, se pusieron reacciones con el DNA y las enzimas NdeI y BamHI a 37°C durante 45 minutos el inserto que se libera es de 774 pb. El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% por electroforesis.

#### **4.4.5 Secuenciación de los genes *glTim* C222A-C228A y C202A-C222A-C228A**

Aquellas colonias seleccionadas cuyas pruebas confirmatorias resultaron positivas se sometieron a secuenciación automatizada mediante el método de Sanger, utilizando los oligonucleótidos T7 promotor y terminador.

Para conservar las clonas positivas, se dejaron crecer en medio de cultivo hasta llegar a una D.O. a 600 nm de 0.6, se almacenaron en criotubos de 2 ml con ampicilina 100µg/mL y glicerol al 9% a -70°C.

#### **4.5 Transformación de cepas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS competentes**

Los plásmidos pET3aHisTev con las diferentes construcciones de los genes *glTim* mutantes se purificaron utilizando un kit comercial y se corrieron en geles de agarosa al 1% por electroforesis para asegurarnos de la integridad del plásmido.

La transformación de las células *E.coli* BL21(DE3)pLysS se llevó a cabo con 2µL de los plásmidos purificados, se seleccionó una colonia para hacer las pruebas confirmatorias por digestión con NdeI y BamHI.

El producto de las digestiones se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente se tomaron alícuotas de las clonas positivas que se hayan probado y se dejan crecer hasta llegar a una D.O a 600 nm de 0.6 y se almacenaron a -70°C en medio LB con ampicilina a una concentración de 100µg/mL y glicerol al 9%.

#### **4.6 Expresión de las enzimas GITIM mutantes**

Una vez que se realizaron las confirmaciones necesarias para asegurar que el gen tenía la mutación, se transformaron las células con las construcciones que estaban clonadas en el plasmido pJET, estas células tienen un promotor LacUV5 de tal manera que la proteína se comenzará a producir con una inducción con isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), es un compuesto análogo de lactosa, que permite la transcripción del gen que codifica para la RNA Polimerasa T7 y con esto la producción de la enzima recombinante.

Para empezar, se inocularon 15 mL de medio LB con ampicilina con una alícuota de las cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas con los genes *gltim* mutantes, estos precultivos se incubaron a 37° durante 12 a 15 horas en agitación constante a 160rpm. Posteriormente se centrifugó el precultivo y las células se resuspendieron en 1mL de medio LB, el cual fue utilizado para inocular medio litro de medio LB con ampicilina, la D.O. a 600 nm se ajustó a 0.1 y se incubó durante el tiempo necesario para alcanzar una D.O a 600nm de entre 0.8 y 1. Una vez que se alcanzó el crecimiento deseado de las células, se indujo la expresión de las proteínas añadiendo al medio de cultivo IPTG a una concentración de 0.4mM, se incubó durante 12 a 15 horas a 30°C en agitación constante a 160rpm.

#### **4.7 Purificación de las proteínas recombinantes de GITIM**

La purificación se realizó mediante la técnica de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC por sus siglas en inglés), utilizando una resina la cual contiene átomos de Níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ). El principio de separación se basa en la afinidad del  $\text{Ni}^{2+}$  por la etiqueta de 6 histidinas que contienen las proteínas recombinantes en su extremo amino terminal.

Una vez que se completaron las 12 horas de inducción de la sobre expresión de las proteínas recombinantes, las células se recolectaron mediante centrifugación, el sobrenadante se desechó y el botón celular se re suspendió en 40 mL de solución amortiguadora de lisis que contenía Tris 50mM, NaCl 50 mM ajustado a un pH 8 y fluoruro de metil-sulfonilo (PMSF) 0.2mM (101 $\mu$ l) como inhibidor de proteasas.

En esta primera etapa metodológica las proteínas fueron purificadas en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (7 $\mu$ l) el cual se adicionó solución de buffer de lisis y PMSF, con el objeto de evaluar la influencia de un agente reductor sobre la capacidad de oligomerización de GITIM.

Esto se resuspendió muy bien y se guardó una alícuota de 50  $\mu$ l y se etiquetó como “células”. Posteriormente las células se lisaron mediante sonicación dando 5 pulsos de 45 seg con descansos de un minuto con 15 segundos a 4°C. Se realizó en un equipo marca Branson y se ajustó a una intensidad de entre 3 y 4, de este paso se colectó una fracción como “lisado”; las fracciones celulares soluble y membranal se separaron mediante centrifugación a 9000 rpm durante media hora y se colectó una fracción como “sobrenadante”.

La fracción soluble se hizo pasar por una columna que contenía la resina de níquel, esta fue previamente equilibrada con solución amortiguadora de lisis; se colectó la primera fracción que corresponde al producto que no se unió a la resina (not binding NB) este paso se repitió por dos veces más, luego se hizo un lavado con la misma solución amortiguadora. El último paso fue coleccionar la proteína con una solución amortiguadora que contenía imidazol 250mM de esta solución se pasaron 25 mL, de los pasos anteriores también se reservan alícuotas de 50  $\mu$ L.

El último paso se dializa con ayuda de ultra filtros Amicon, a 4000 rpm por periodos de 15 minutos a 4°C, posteriormente se pasaron 10 mL de solución amortiguadora de lisis y por ultimo 5 mL de una solución amortiguadora trietanolamina 100mM, con un pH 7.4, EDTA 10mM (buffer TE) y se concentró a un volumen final de 250-500  $\mu$ L.

Se determinó la concentración de la proteína mediante su coeficiente de absorptividad a 280nm. Las proteínas se almacenaron a 4°C.

#### **4.8 Pruebas con Omeprazol**

Las pruebas con omeprazol se dividieron en dos etapas, por un lado el ensayo *in situ*, donde se retaron a las células que sobre expresan a las enzimas recombinantes y el ensayo *in vitro* donde las enzimas recombinantes se retaron con el omeprazol hasta después de haber sido purificadas.

#### **4.8.1 Cultivos de células BL21 (DE3) pLysS**

En cuanto a las pruebas con omeprazol, se probaron las enzimas recombinantes *wt*, C222A-C228A y C202A-C222A-C228A, para esto se realizó una estrategia experimental para organizar las actividades a seguir, todos los experimentos se llevaron a cabo en un aproximado de 15 días para cada una de las enzimas recombinantes.

#### **4.8.2 Pre cultivo de células *E.coli* BL21 (DE3) pLysS**

Cultivo de células *E.coli* BL21(DE3)pLysS transformadas con los genes *gltim* mutantes, para esto se inocularon 15 ml de medio LB con 15 µl de ampicilina (100µg/ml), para depositar las células se toma con un palillo estéril una pequeña cantidad de un cultivo celular en fase exponencial de crecimiento, almacenado en glicerol al 9% en ultracongelación, y se deposita en el medio de cultivo. Este cultivo se dejó un mínimo de 15 horas a 37°C en agitación suave.

#### **4.8.3 Cultivo de células *E.coli* BL21 (DE3) pLysS**

Una vez pasado el tiempo de incubación se procede a centrifugar este cultivo a 3,000 rpm por 15 minutos, se descarta el medio de cultivo y el botón se reserva.

En un matraz Erlenmeyer de 1 litro con 500 ml de medio LB previamente esterilizado, se depositó el botón celular obtenido, con 500 µl de ampicilina (100µg/ml), este cultivo se dejó un aproximado de 5 horas a 37°C en agitación suave o hasta llegar a una densidad óptica de 0.8-1. Este cultivo debe estar en constante vigilancia.

#### **4.8.4 Inducción del cultivo**

Una vez que este cultivo llegó a la densidad óptica esperada y dependiendo del momento del día en que se quiera inducir el cultivo con IPTG, se reservó en refrigeración o a temperatura ambiente si la hora de inducción era próxima. Se indujo la expresión de las proteínas añadiendo al medio de cultivo IPTG a una concentración de 0.4mM, incubando durante un mínimo de 12 horas a 30°C en agitación constante.

#### **4.8.5 Incubación de las células de *E. coli* con Omeprazol**

Pasadas las horas necesarias para la expresión de las proteínas, al cultivo bacteriano se le hizo recambio de medio fresco, para esto se centrifugó el cultivo dividiéndolo en 10 tubos "Falcon" de 50 ml con aproximadamente 30-35 ml de cultivo por tubo, a 3,000 rpm por 20 minutos a 4°C. Posteriormente a los botones celulares se les añadió 30 ml de medio LB fresco Porque le cambiaron el medio?y se disolvió el botón celular. A cada tubo se le adicionó la cantidad necesaria de una solución concentrada de omeprazol (200mM) para tener cultivos con omeprazol en concentraciones crecientes (100 µg, 250 µg, 500 µg y 750 µg) teniendo para cada una de las concentraciones dos tubos de cultivo celular y de igual manera dos tubos sin omeprazol.

Estos cultivos celulares se incubaron un total de 24 horas a temperatura ambiente en agitación constante a 180 rpm.

#### **4.8.6 Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)**

Después de las 24 horas de interacción de las células con el omeprazol, se centrifugaron todos los tubos Falcon con el cultivo celular a 3500 rpm por 20 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante.

La técnica de conteo de UFC's se basa en contar las "unidades formadoras de colonias" o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que se desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una UFC.

Uno de los botones celulares para cada concentración de omeprazol se utilizó para hacer conteo de UFC, para esto en una placa con medio LB sólido con ampicilina, se hace una propagación de cada uno de los 6 botones celulares. Se hizo una dilución 1:2000 para poder hacer un conteo más controlado de las UFC, para cada concentración de omeprazol. Estas placas se dejan a 37°C un mínimo de 15 horas.

Para hacer el recuento de colonias bacterianas, se utilizó una cuadrícula de 4 cm<sup>2</sup>, para determinar la cantidad de UFC exacta en 1 ml de muestra, se multiplica: (n° de colonias) \* (factor de dilución).

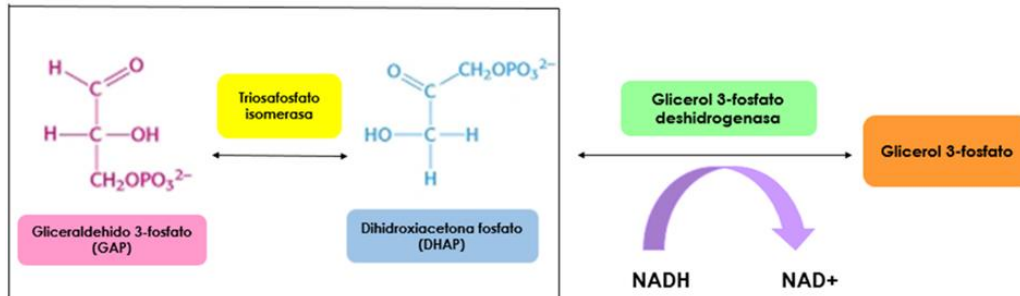


#### **4.8.7 Purificación de las proteínas recombinantes retadas con omeprazol**

La purificación se llevó a cabo por la técnica IMAC, el segundo botón celular de cada uno de los tratamientos con omeprazol se resuspendió en 20 mL de solución amortiguadora de lisis con Tris 50mM, NaCl 50 mM ajustado a un pH 8 y PMSF 0.2mM como inhibidor de proteasas. Los siguientes pasos fueron los mismos que ya se describieron previamente para la purificación de las proteínas, finalizando con la determinación de la concentración mediante su coeficiente de absorción a 280nm.

#### **4.8.8 Determinación de actividad enzimática de las proteínas recombinantes retadas con Omeprazol**

Posterior a obtener las proteínas tratadas con las diferentes concentraciones de Omeprazol y determinar su concentración se determinó su actividad enzimática utilizando el ensayo acoplado observando el consumo de NADH previamente reportado por Enríquez-Flores, *et al.* 2011 (Figura 15). La estrategia experimental se planeó de tal manera que cada una de las proteínas tratadas con omeprazol se trabajó un día a la vez.



**Decaimiento de absorbancia del NADH a 340 nm**

- ❖ GAP 1mM
- ❖ NADH 0.2 mM
- ❖ TIM 5ng/μl
- ❖ α-GDH 0.9 U

25°C

**Figura 15. Método para la determinación de actividad enzimática.** (Enríquez-Flores, *et al.* 2011)

#### 4.9 Determinación de la actividad enzimática de las proteínas recombinantes *in vitro*.

##### 4.9.1 Pre cultivo de células *E.coli* BL21 (DE3) pLysS

Cultivo de células *E.coli* BL21(DE3)pLysS transformadas con los genes *gltim* mutantes, para esto se inocularon 15 ml de medio LB con 15 μl de ampicilina (100μg/ml), para depositar las células se toma con un palillo estéril una pequeña cantidad de un cultivo celular en fase exponencial de crecimiento, almacenado en glicerol al 9% en ultracongelación, y se deposita en el medio de cultivo. Este cultivo se dejó un mínimo de 15 horas a 37°C en agitación suave.

#### **4.9.2 Cultivo de células *E.coli* BL21 (DE3) pLysS**

Una vez pasado el tiempo de incubación se procede a centrifugar este cultivo a 3,000 rpm por 15 minutos, se descarta el medio de cultivo y el botón se reserva.

En un matraz Erlenmeyer de 500 ml y con 250 ml de medio LB previamente esterilizado, se depositó el botón celular obtenido, con 250 µl de ampicilina (100µg/ml), este cultivo se dejó un aproximado de 5 horas a 37°C en agitación suave hasta llegar a una densidad óptica de 0.8-1. Este cultivo debe estar en constante vigilancia.

#### **4.9.3 Inducción del cultivo**

Una vez que este cultivo llegó a la densidad óptica esperada y dependiendo del momento del día en que se quiera inducir el cultivo con IPTG, se reservó en refrigeración o a temperatura ambiente si la hora de inducción era próxima. Se indujo la expresión de las proteínas añadiendo al medio de cultivo IPTG a una concentración de 0.4mM, incubando durante un mínimo de 12 horas a 30°C en agitación constante.

#### **4.9.4 Purificación de las proteínas recombinantes**

La purificación se llevó a cabo por la técnica IMAC previamente descrita usando PMSF 0.2mM como inhibidor de proteasas. Los siguientes pasos fueron los mismos que ya se describieron previamente para la purificación de las proteínas, finalizando con la determinación de la concentración mediante su coeficiente de absorptividad a 280nm.

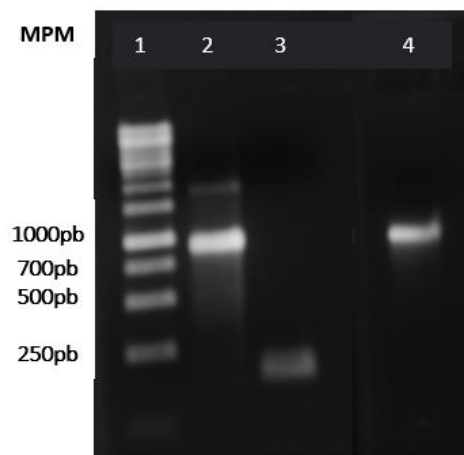
#### **4.9.5 Tratamiento con omeprazol a las enzimas recombinantes**

Una vez que se obtuvieron las enzimas recombinantes se incubaron con el omeprazol en concentraciones crecientes, 0, 100, 250, 500 y 750  $\mu\text{M}$ . La incubación se hizo a una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de GITIM, por dos horas a 25°C o por 24 h a 37°C. Las lecturas de actividad se hicieron en un volumen final de 600  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción con 5  $\text{ng}/\text{mL}$  de GITIM, a 25°C.

## 5. RESULTADOS

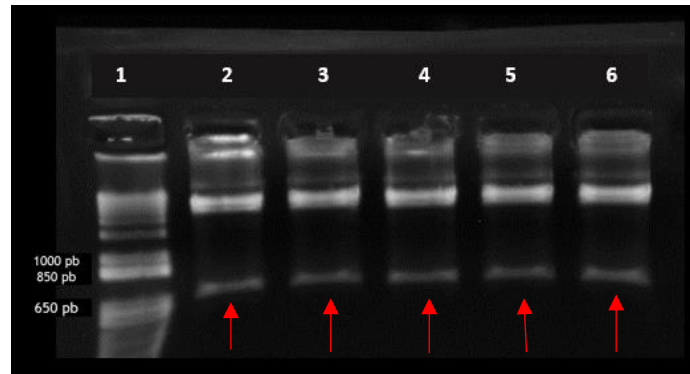
### 5.1 Obtención de los genes de *glTim* con doble mutación C222A-C228A y triple mutación C202A-C222A-C228A.

El resultado de los pesos esperados fue el mismo para la triple mutante C202A-C222A-C228A, un PCR 1 de 806 pb, PCR 2 de 126 pb y un PCR 3 de 906 pb. (Figura 16)

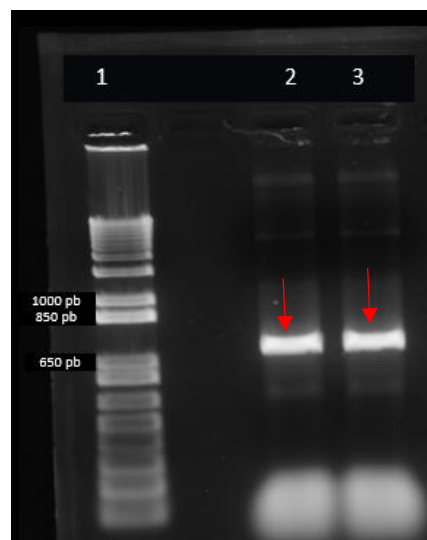


**Figura 16. Construcción de la doble mutante de GITIM C222A-C228A.** Pozo 1: Marcador de peso molecular; Pozo 2: PCR 1 purificado, producto de 806pb; Pozo 3: PCR 2 purificado, producto de 126pb; Pozo 4: PCR 3 purificado, producto de 906 pb.

El producto del PCR3 para ambas mutantes tanto doble como triple, se ligó por separado al vector pJet1.2/Blunt y con el producto de ligación se transformaron células *E.coli* TOP10. Posteriormente se realizaron pruebas de digestión con las enzimas NdeI y BamHI recordando que el gen está flanqueado por sitios de reconocimientos para las enzimas de corte antes mencionadas, de tal manera que al hacer una prueba confirmatoria por digestión de dichas enzimas el producto será del tamaño de nuestro gen de interés. (Figura 17 y 18)



**Figura 17. Pruebas confirmatorias por digestión enzimática con NdeI y BamHI para la triple mutante C202A-C222A-C228A.** Pozo 1: Marcador de peso molecular; Pozos 2-6: pruebas positivas con los insertos liberados correspondientes al peso molecular *gltim* (754pb) señalados con flechas rojas.



**Figura 18. Pruebas confirmatorias por digestión enzimática con NdeI y BamHI para la doble mutante C222A-C228A.** Pozo 1: Marcador de peso molecular; Pozo 2-3: pruebas positivas con los insertos liberados correspondientes al peso molecular *gltim* (754pb) señalados con flechas rojas.

Posterior a las pruebas confirmatorias el DNA plasmídico tanto para a triple mutante como la doble mutante se sometieron a secuenciación automatizada por el método enzimático de Sanger para asegurarnos que los cambios en los genes

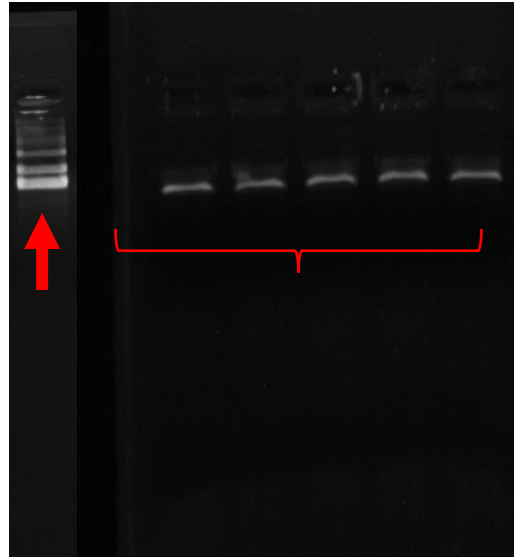
correspondientes tenían los cambios en las posiciones adecuadas además de tener íntegros el inicio y el final del gen (Figura19)

>7308 sequence exported from 7308.D6Rab1.ab1

```
GACAWAAGGGWAATGRKGMATGCCAAGAGATGACGMCCCCATCAGTACCCACATCGGACTTGCCACCG
AWAGCCAACRCCGAWAAACAAGCGCTCATGAGCYCGAAGYCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGR
CGATATAGGGCCAGCAACCCGACCTWGTGGCGCCGGTGWTCGRACACGATCGCTCCGGCGTAGAGGATC
GAGATCTCGATCCCGCAAATTAACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTCCCTCTAGAAATAATTTGT
TTAACTTTAAGAAGGAGATATATCCATGGGACATCATCATCATCATGGATCGCTGGTTCCGAGATCTGAAAC
CTGTATTTTCAGGGCATATGCCTGCTCGTCCCMTTTCATCGGCGGTAACCTCAAGTGTAAACGGCTCTTTGAC
TTTATCAAGAGCCACGTGGCGCAATTGCTGCCATAAGATCCCTGATTCCGTGGACGTCGTCATTGCCCTTCC
GCCGTACACCTGTCAACAGCCATTGCGGCAACACGTCAAAAACAGTTGAGGATAGCAGCGCAGAATGTGTACCT
AGAGGGGAACGGGGCGTGGACTGGCGAGACAAGTGTGAGATGCTTACGACATKGTTTTGAAGCATGTGAT
AGTAGGGCACTCTGAAAGACGCAGAATCATGGGGGAGACCGACGAGCAAAGCGCCAAGAAGGCTAAGCGTG
CCCTGAAAAGGGGATGACGGTCATCTTMTGCGTCGGAGAGACCTTGGACGAGCGCAAGGCCAACCGCACCA
TGGAGGTGAACATCGCCAGCTTGAGGCGCTTGGCAAGGAGCTCGGAGAGTCCAAGATKCTCTGGAAGGAGG
TTGTCATTGCTTACGAGCCCGTGTGGTCCATTGGCACGGGGCTGGTGGCCACGCCGAGCAGGACAGAGGAGGT
CCATGTGGGGCTCCGAAAGTGGTTTGGGAGAAGGTTTGTGCCGAGGGCGCACAGCATATCCGTATCATTACG
GGGGATCGGCCAATGGAAGCAACGCTGAGAAGCTTGGCCAGGCTCCGAATATTGACGGCTTCCCTTGTGGTGG
CGCTTCCCTCAAGCCGGAGTTTATGACGATGATCGACATTCTACGAAGACCCGTACATAGGATCCWGMASCC
MMCSA
```

**Figura 19. Secuenciación de la mutante C222A-C228A.** En color azul se marcan los sitios de reconocimiento para las enzimas NdeI y BamHI, en color verde la secuencia de 6 histidinas y en color morado los cambios correspondientes de cisteína a alanina.

Una vez confirmados los cambios necesarios en la secuencia de GITIM las mutantes se subclonaron en el plásmido pET3aHisTEVP (previamente lo escribías sin la última P y creo tev con minúsculas), recordando que a este plásmido es necesario linearizarlo para poder introducir los genes, en este caso se hizo el corte con la enzima BamHI-NdeI y de esta manera quede abierto para el momento de la ligación (Figura 20)



**Figura 20. Plásmido Pet3aHisTEVP linearizado con BamHI.** Marcado con flecha roja se observa el plásmido sin ningún corte.

## 5.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

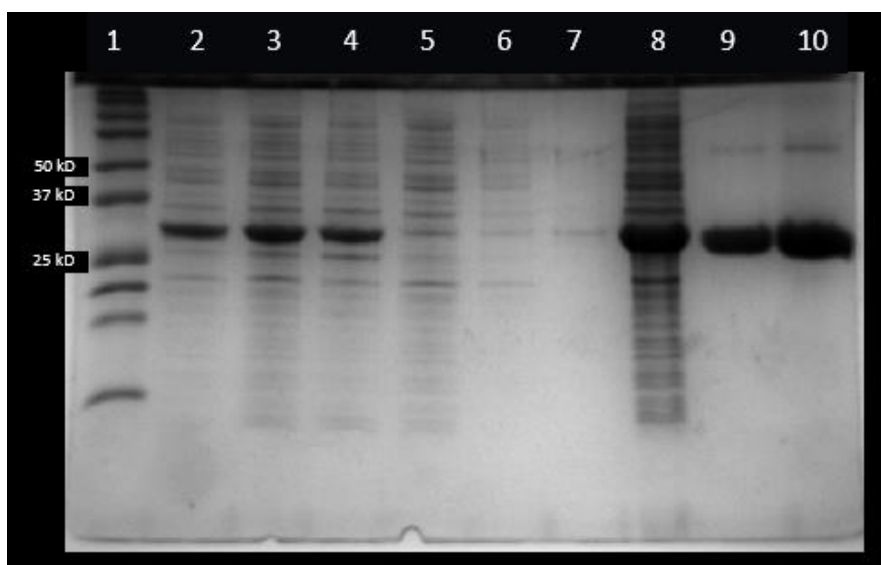
A partir de cultivos de células BL21 DE3 pLysS en medio LB con ampicilina 1 mg/ml de 500 mL aproximadamente, después de inducción con IPTG y haciendo una purificación por IMAC se obtuvieron diferentes rendimientos para las enzimas recombinantes (Tabla 2).

**Tabla 2.** Rendimiento obtenido después de la purificación de las enzimas recombinantes.

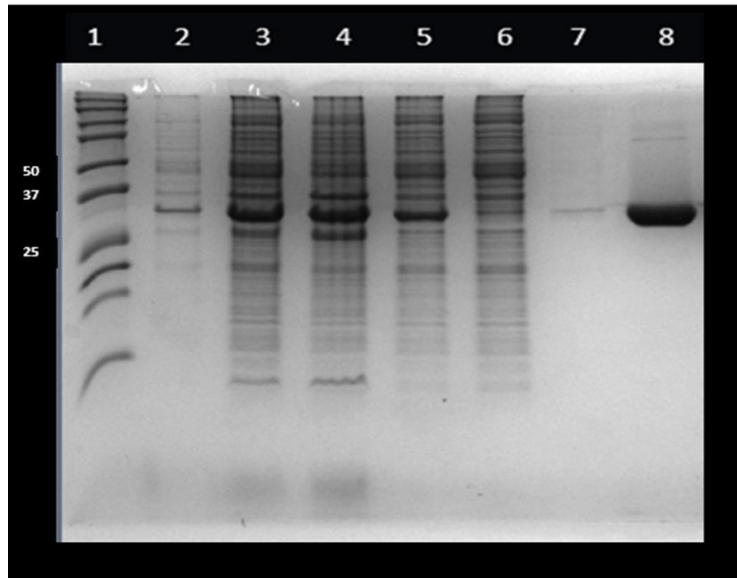
GITIM mutante	Concentración de proteína (mg/L)
C222A-C228A (DM)	258
C202A-C222A-C228A (TM)	189.6
Silvestre	172



Durante la purificación de las proteínas se guardaban alícuotas de 100  $\mu$ l de cada paso de purificación, esto con la finalidad de poder seguir el enriquecimiento de la proteína en las fracciones de purificación (Figuras 21 y 22).



**Figura 21. Fracciones de purificación de la enzima recombinante GITIM con la mutación C222A-C228A por SDS-PAGE.** Pozo 1: Marcador de peso molecular en kDa; Pozo 2. Lisado celular; Pozo 3. Fracción membranal; Pozo 4. Fracción celular soluble; Pozo 5. Fracción que no fue retenida en la columna; Pozo 6. Primera fracción de lavado; Pozo 7. Segunda fracción de lavado, Pozo 8. Fracción de elución; Pozo 9. Proteína concentrada y dializada (10  $\mu$ g); Pozo 10. Proteína concentrada y dializada (20  $\mu$ g).

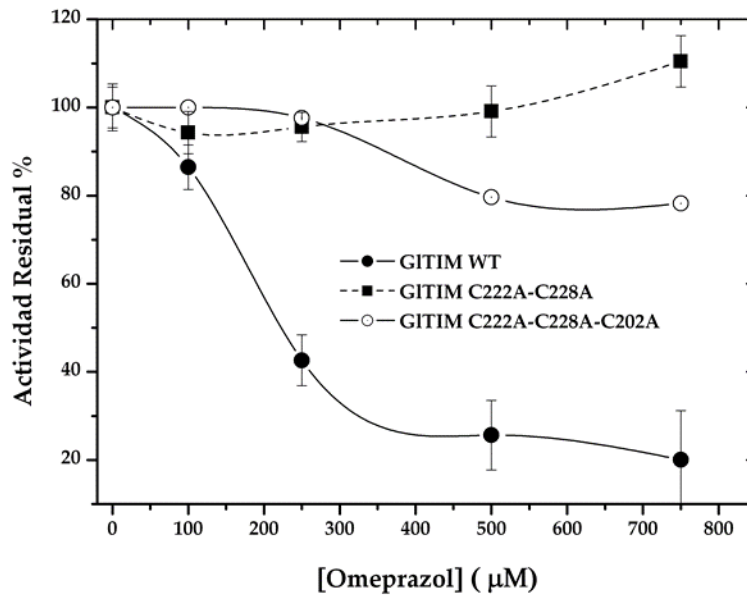


**Figura 22. Fracciones de purificación de la enzima recombinante GITIM con la mutación C202A-C222A-C228A por SDS-PAGE.** Pozo 1: Marcador de peso molecular en kDa; Pozo 2. Lisado celular; Pozo 3. Fracción membranal; Pozo 4. Fracción celular soluble; Pozo 5. Fracción que no fue retenida en la columna; Pozo 6. Primera fracción de lavado; Pozo 7. Fracción de elución; Pozo 8. Proteína concentrada y dializada (10  $\mu$ g).

### **5.3 Pruebas con Omeprazol**

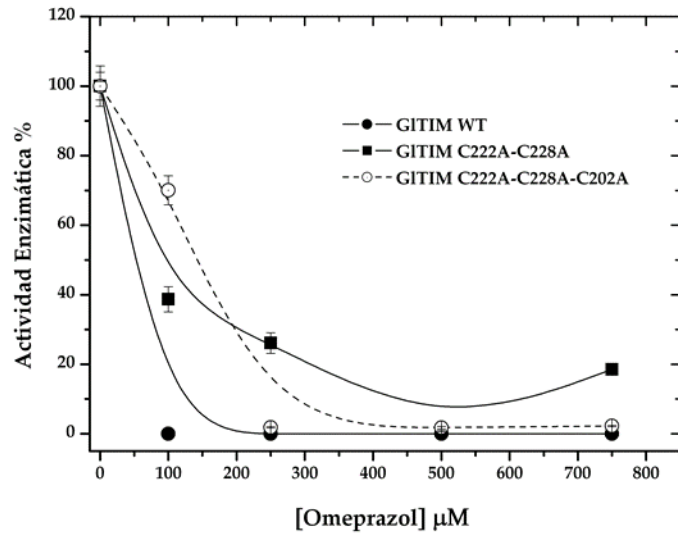
#### **5.4 Determinación de la actividad enzimática de las proteínas recombinantes con omeprazol *in vitro*.**

El porcentaje de actividad residual de las enzimas recombinantes tras ser incubadas con omeprazol dos horas a 25°C, mostró algo peculiar, por un lado para el caso de la enzima silvestre (WT) la actividad disminuyó proporcionalmente conforme la concentración de omeprazol aumentó; sin embargo, para el caso de la doble y triple mutante no sucedió el mismo fenómeno. La enzima C222A-C228A mantuvo la actividad casi en su 100%. La enzima C202A-C222A-C228A bajó un 20% su actividad enzimática conforme aumentó la concentración del omeprazol (Figura 23); este fenómeno es parecido al reportado por López-Velázquez y cols. en 2014, donde se probó el omeprazol en la enzima recombinante carente de la cisteína 222. Es precisamente dicho antecedente el que marca la pauta para aseverar que dicho residuo aminoacil es el implicado principal en la inactivación de GITIM.



**Figura 23. Porcentaje de actividad residual de las enzimas recombinantes.** Incubadas 2 horas con omeprazol a 25°C.

Después de conocer los resultados *in situ* con las células BL21 transformadas, se planteó un experimento que asemejara las condiciones que se usaron con dichas células. Se incubaron *in vitro*, con omeprazol, las enzimas recombinantes previamente purificadas de células BL21. La incubación *in vitro* fue por 24 horas a 37° C, para tratar de imitar las condiciones a las que se sometieron las enzimas que se probaron añadiendo el omeprazol en el cultivo. Se obtuvo una respuesta de inactivación dosis dependiente (Figura 24), semejante a la observada por la exposición de los cultivos de *E. coli* transformados con los genes para las enzimas de *G. lamblia* (ver más adelante).



**Figura 24. Inactivación *in vitro* con omeprazol de las enzimas recombinantes WT, doble y triple mutantes de GITIM. Incubadas 24 horas a 37°C.**

### **5.5 Efecto *in situ* del omeprazol sobre las enzimas recombinantes (silvestre, doble y triple mutantes) provenientes de cultivos bacterianos.**

#### **5.5.1 Purificación de las enzimas recombinantes a partir de cultivos expuestos al omeprazol**

Una vez que se llevó a cabo la inducción de la expresión de las enzimas, los cultivos celulares independientes se pusieron en contacto con el omeprazol en diferentes concentraciones durante 24 horas, posteriormente se llevó a cabo la lisis celular para la purificación de las proteínas recombinantes, el rendimiento obtenido de dichas enzimas se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3.** Rendimiento de proteína obtenida tras la purificación de las enzimas mutantes y la silvestre.

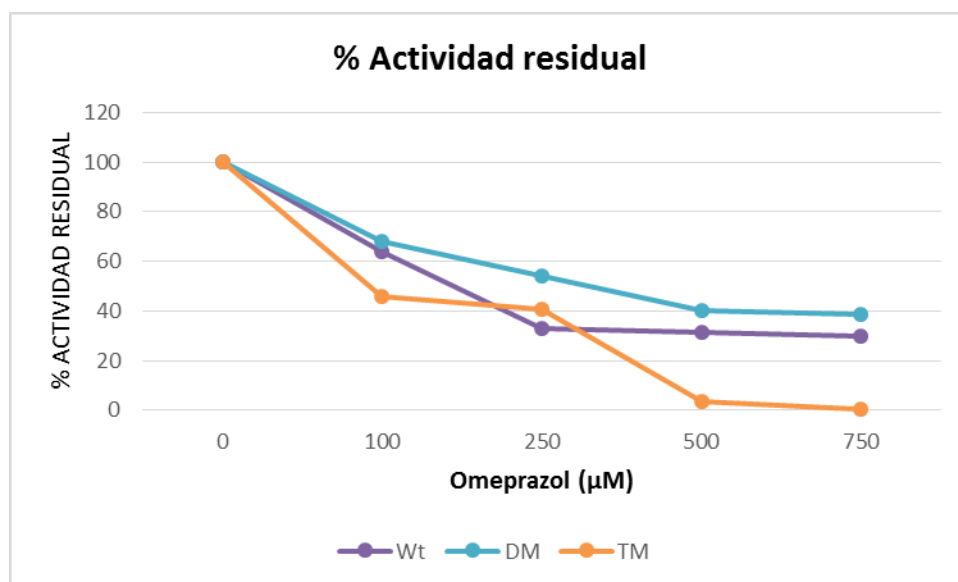
Concentración de omeprazol en el cultivo	Wt	DM (C222A-C228A)	TM (C202A-C222A-C228A)
0 $\mu\text{M}$	256 mg/L	386 mg/L	55.6 mg/L
100 $\mu\text{M}$	224mg/L	270 mg/L	40 mg/ml
250 $\mu\text{M}$	140 mg/L	756.8 mg/L	49.2 mg/L
500 $\mu\text{M}$	124.8 mg/L	311.2 mg/L	41.2 mg/L
750 $\mu\text{M}$	486.8mg/L	42.8 mg/L	40.4 mg/L

**Tabla 4.** Actividad enzimática de las proteínas recombinantes purificadas de cultivos bacterianos que previamente fueron tratados con diferentes concentraciones de omeprazol.

	Omeprazol ( $\mu\text{M}$ )	GITIM wt	C222A-C228A	C202A-C222A-C228A
Actividad enzimática	0	1992.497	3928.189	659.164
	100	1274.384	2664.523	303.323
	250	654.877	3306.538	269.025
	500	630.225	6336.549	24.652
	750	1049.303	1525.188	4.287
% Actividad residual	0	100	100	100
	100	63.96	67.83	46.02
	250	32.87	84.17	40.81
	500	31.63	161.31	3.74
	750	52.66	38.83	0.65

### 5.5.2 Evaluación de actividad enzimática

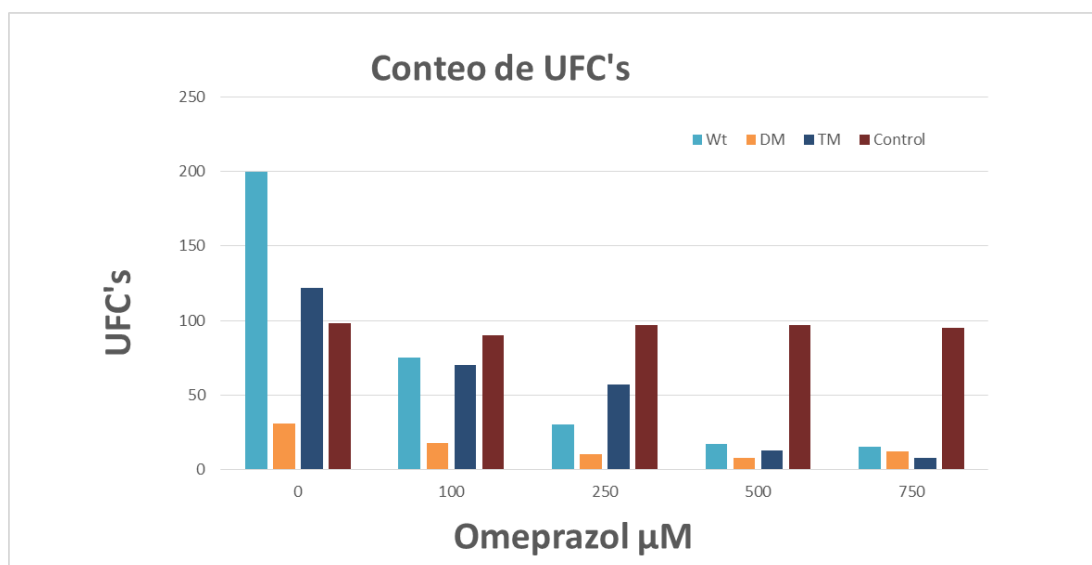
La actividad enzimática para las tres enzimas recombinantes se observa que los valores para cada una bajaron conforme el fármaco aumentó su concentración (Figura 25)



**Figura 25. Comparación de los valores de porcentaje de actividad residual.** Comparando los valores de las tres diferentes mutantes de cisteínas de GITIM. (DM: C222A-C228A, TM: C202A-C222A-C228A)

### 5.5.3 Viabilidad de cepas de *E. coli* BL21 transformadas con los genes de las enzimas silvestre, doble y triple mutantes de GITIM e incubadas con omeprazol.

El conteo de unidades formadoras de colonias (UFC's) mostró un comportamiento dosis dependiente del omeprazol. Como control para este ensayo, se utilizó una cepa de *E. coli* BL21 DE3 pLysS sin ser transformada y sin antibiótico. Para dicho control, se observó que las UFCs se mantienen relativamente constantes a pesar de añadir omeprazol (Figura 26).



**Figura 26. UFC's.** Conteo de Unidades Formadores de Colonia para el caso del cultivo wt, doble y triple mutante después del tratamiento con omeprazol. (DM:C222A-C228A, TM:C202A-C222A-C228A)



## **6. Discusión**

### **6.1 Ensayos *in situ***

#### **6.1.1 Actividad enzimática**

El porcentaje de actividad residual para las tres enzimas recombinantes, Wt, C222A-C228 y C202A-C222A-C228A después de haber sometido el cultivo celular 24 horas con omeprazol posterior a la expresión proteica, disminuyó conforme la concentración de omeprazol aumentaba, este fenómeno propone que las enzimas recombinantes se ven afectadas por haberse sometido tantas horas al fármaco, uniéndose a las cisteínas restantes que tenga la enzima. Por un lado la enzima silvestre se ve afectada pues se propone que todas sus cisteínas superficiales tengan unido al omeprazol y de esta manera la actividad enzimática disminuye. Para la doble mutante, su cisteína en posición 202 queda libre para que el omeprazol se le una, por ultimo para el caso de la enzima carente de sus tres cisteínas superficiales supone que, recordando que GITIM tiene 5 cisteínas por monómero, el omeprazol se le una a las dos cisteínas que quedan libres.

#### **6.1.2 Unidades Formadoras de Colonia (UFC's)**

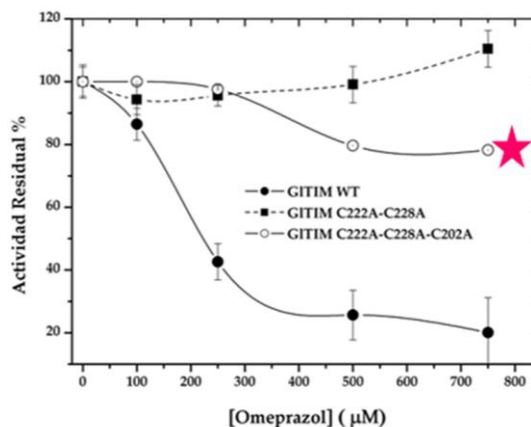
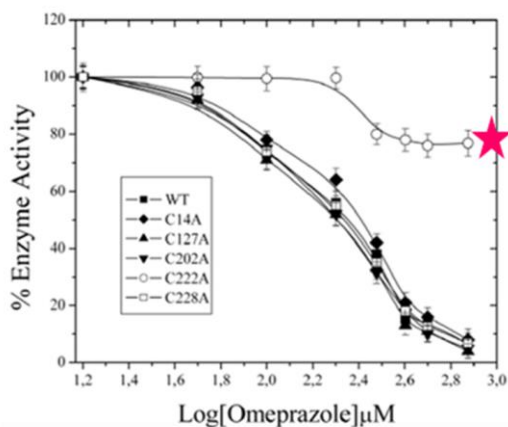
Para el conteo de las UFC's se demostró que el omeprazol si logra internalizar a la célula, en 2014 López-Velázquez y cols., reportaron que el omeprazol afecta la supervivencia de trofozoitos de *Giardia lamblia*, en este trabajo se corrobora dicho fenómeno, pues tomando como control positivo se retaron a las células *E.coli* BL21 sin ningún inserto y sin antibiótico arrojando que el crecimiento bacteriano no se ve afectado aun cuando la concentración del fármaco aumenta.

## **6.2 Ensayos *in vitro***

### **6.2.1 Actividad enzimática**

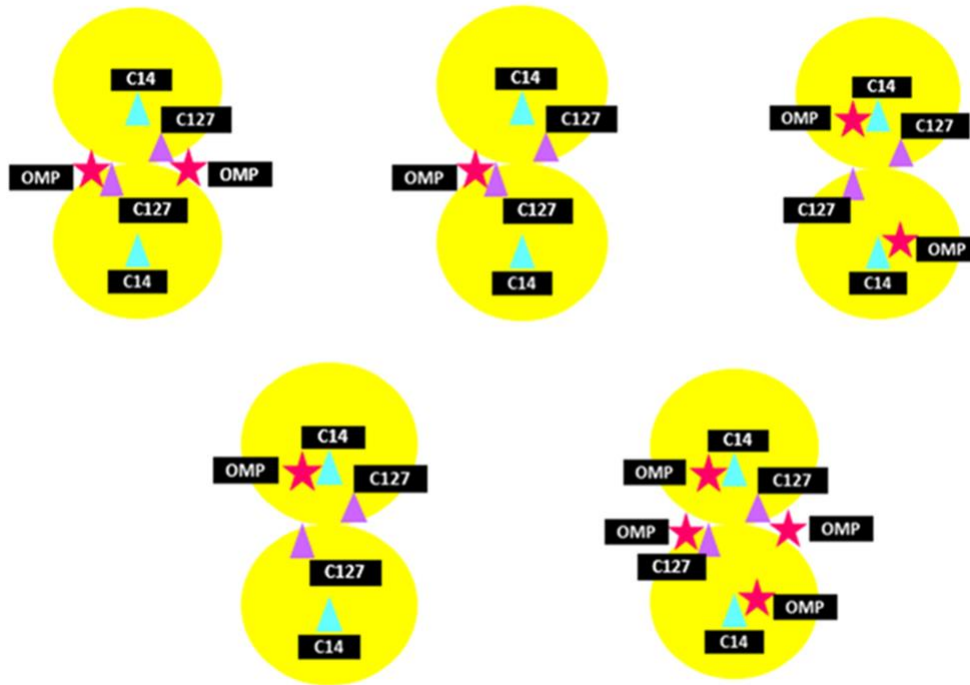
Después de incubar las enzimas recombinantes purificadas dos horas con omeprazol, el porcentaje de actividad residual tuvo comportamientos particulares, comenzando con la enzima silvestre que tuvo un comportamiento como en el caso del ensayo *in vivo*, bajando el porcentaje de actividad conforme aumentó la concentración de omeprazol, para la doble mutante C222A-C228A el porcentaje se mantuvo relativamente en el 100% incluso a concentraciones elevadas del fármaco este fenómeno confirma lo que López-Velázquez y cols., en 2014 donde probaron mutantes sencillas y para el caso de la recombinante C222A no se inactivó por completo la enzima corroborando que la cisteína en posición 222 es la responsable de la inactivación de GITIM, entonces para el caso de la doble mutante al no estar el blanco del omeprazol la enzima no se inactiva aun cuando el fármaco aumenta su concentración.

Para finalizar y el caso más peculiar, está el porcentaje de actividad residual de la triple mutante C202A-C222A-C228A los valores son idénticos al fenómeno reportado en 2014 por López-Velázquez para la mutante sencilla C222A, comparando los dos gráficos podemos observar dicho fenómeno (Figura 27)



**Figura 27. Comparación del porcentaje de actividad residual.** Izquierda: resultados obtenidos por López-Velázquez marcando con estrella en color rosa los valores para la mutante sencilla C222A. Derecha: resultados obtenidos en el presente trabajo marcando con estrella en color rosa los valores para la triple mutante C202A-C222A-C228A.

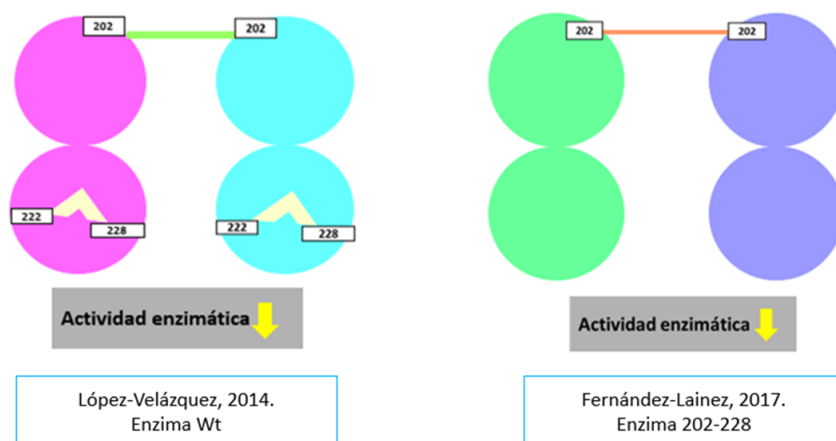
Para explicar dicho fenómeno, se propone entonces un modelo de posibles escenarios en los que se encuentra la enzima y el omeprazol, donde el hecho de no tener ninguna cisteína superficial supone que el omeprazol de cierta manera “encuentra” a las dos cisteínas que aún quedan libres en la enzima, Cys 14 o Cys 127, pudiéndose unir a todos los residuos de cisteína o en algunos casos solo a la cisteína en una posición por monómero o a las dos cisteínas por dímero (Figura 28)



**Figura 28. Modelos propuestos de la interacción del omeprazol en la triple mutante.** Se propone que el omeprazol interactúa con las dos cisteínas libres en posición 14 y 127 en el caso de la enzima que carece de sus tres cisteínas superficiales.

Como antecedentes a este fenómeno tenemos el reportado por López-Velázquez en 2014, que reportó una baja del 20% en la actividad residual de la enzima recombinante sin la cisteína 222. También reporta que para la enzima silvestre la unión entre las cisteínas en posición 202 y la formación de un puente intracatenario son los responsables de la bajada del porcentaje de actividad residual, y el reportado por Fernández-Lainez en 2017, que aunque no probó el omeprazol como agente derivatizante si observó y concluyó que GITIM necesita de un “agente preparador de cisteínas” para su oligomerización y esto se debe a que las cisteínas en posición 202 necesitan el estado redox para poder oligomerizar y que la actividad

enzimática también disminuye probando mutantes dobles C202A-C228A y C202A-C222A (Figura 29)



**Figura 29. Modelos reportados para la inactivación de GITIM.**

Después de todos los resultados evaluados y todos los antecedentes hasta ahora recabados, se puede proponer que el omeprazol logra internalizar no solo a nivel celular, sino también a nivel enzima, es decir, llegar a las cisteínas más internas de GITIM, sin embargo dicho fenómeno no afecta la actividad enzimática para el caso de la doble mutante y afecta sólo en un 20% a la triple mutante, sin embargo esto ocurre a las 2 horas de incubación del omeprazol con las enzimas recombinantes, fenómeno que no permanece a 24 horas de incubación con el fármaco donde la actividad se ve afectada casi al 0%, siendo entonces que el primer contacto del fármaco con la proteína es crucial para su efecto en esta, la doble mutante al aun tener la cisteína 202 el omeprazol entra en contacto de primera con dicho residuo que no es el implicado en la inactivación de GITIM, al paso de las horas además de

estar en contacto con la Cys 202 también afecta a los dos residuos restantes de cisteína. En la triple mutante dicho fenómeno no se repite de la misma manera sin embargo tampoco la actividad enzimática se ve afectada de manera contundente, esto porque al omeprazol le cuesta más llegar a los dos residuos libres de esta recombinante, por ello tiene un “umbral” de una bajada del 20% de actividad residual porque está afectando ya sea a las cisteínas de la interfase o logrando llegar a la cisteína 14 que está muy internalizada.

## **7. Conclusiones**

### **7.1 Ensayos *in situ***

El efecto del omeprazol en GITIM a nivel celular usando como modelo *E.coli* es contundente pues la actividad enzimática y la viabilidad de las células se ven afectadas por el fármaco, lo que comprueba que el omeprazol si traspasa barreras membranales y además uno de sus blancos es GITIM.

### **7.2 Ensayos *in vitro***

El omeprazol no afecta la actividad enzimática de GITIM al no estar las cisteínas superficiales de la enzima en su totalidad, sin embargo baja un 20% lo que demuestra que las dos cisteínas en posición 14 y 127 contribuyen a esta disminución de actividad enzimática.

## 7. Bibliografía

- Adam RD. Biology of Giardia lamblia. Clin Microbiol Rev. 2001;14(3):447-475.
- Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of Giardia species. Nat Rev Microbiol. 2010;8(6):413-22.
- Benchimol M, De Souza W. The ultrastructure of Giardia during growth and differentiation. En: Luján HD, Svard S (eds). Giardia: A model organism. Springer Science + Business Media, New York, EUA, 2011.
- Boletín epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud. 2016; 33(46): 25. Dirección de internet: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd\\_boletin.html](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd_boletin.html). Consultado el 15 de agosto de 2017.
- Davids BJ, Reiner DS, Birkeland SR, Preheim SP, Cipriano MJ, McArthur AG, Gillin FD. A new family of giardial cysteine-rich non-VSP protein genes and a novel cyst protein. PLoS One 2006;1:e44.
- Enríquez-Flores S. Reactividad de los residuos de cisteínas de la Triosafofato isomerasa de Giardia lamblia a agentes derivatizantes específicos de cisteína, Maestro en Ciencias UNAM, 2005.
- Enríquez-Flores S, Rodríguez-Romero A, Hernández-Alcántara G, Oriá-Hernández J, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Hernández G, de la Mora-de la Mora I, Castillo-Villanueva A, García-Torres I, Méndez ST, Gómez-Manzo S, Torres-Arroyo A, López-Velázquez G, Reyes-Vivas H.



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* 2011;79(9):2711-24.

- Enríquez Flores Sergio, Mecanismos de inactivación selectiva de la Triosafofosfato isomerasa de *Giardia lamblia* dirigida al diseño de anti-giardiasicos, Doctor en Ciencias UNAM, 2012.
- Feng XM, Cao LJ, Adam RD, Zhang XC, Lu SQ. The catalyzing role of PPDK in *Giardia lamblia*. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;367(2):394-8.
- Fernández-Lainez C. 2017. Caracterización funcional y estructural in vitro e in situ de las mutantes sencillas y múltiples de cisteínas de la triosafofosfato isomerasa de *Giardia lamblia* Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, México.
- Hehl AB. Intracellular protein tracking. En: Luján HD, Svard S (eds). *Giardia: A model organism*. Springer Science + Business Media, New York, EUA, 2011.
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 1989;77(1):51-9.
- Jarroll EL, van Keulen H, Paget TA, Lindmark DG. *Giardia Metabolism*. En: Luján HD, Svard S (eds). *Giardia: A model organism*. Springer Science + Business Media, New York, EUA, 2011.

- Li Z, Kulakova L, Li L, Galkin A, Zhao Z, Nash TE, Mariano PS, Herzberg O, Dunaway-Mariano D. Mechanisms of catalysis and inhibition operative in the arginine deiminase from the human pathogen *Giardia lamblia*. *Bioorg Chem* 2009;37(5):149-61.
- López-Velázquez G, Molina-Ortiz D, Cabrera N, et al. An unusual triosephosphate isomerase from the early divergent eukaryote *Giardia lamblia*. *Proteins* 2004;55:824-834.
- López-Velázquez G, Reyes-Vivas H, Hernández-Alcántara G, de la Mora-de la Mora I, Enríquez-Flores S, Ortiz C, Castillo-Villanueva A, Méndez ST, García-Torres I, Marcial J, Torres-Arroyo A, Oria-Hernández J, Vanoye-Carlo A, Gómez-Manzo S. Las crónicas de *Giardia*. El parásito, la molécula y el fármaco. En: Mensaje bioquímico. Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E, Vázquez Meza H (Eds). Volumen XXXVII, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México DF, ISSN-0188-137x, pp.196-212.
- Maes D, Zeelen JP, Thanki N, Beaucamp N, Alvarez M, Thi MH, Backmann J, Martial JA, Wyns L, Jaenicke R, Wierenga RK. The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins* 1999;37(3):441-53.
- McArthur AG, Knodler LA, Silberman JD, Davids BJ, Gillin FD, Sogin ML. The Evolutionary Origins of Eukaryotic Protein Disulfide Isomerase

Domains: New Evidence from the Amitochondriate Protist *Giardia lamblia*.  
Mol Biol Evol 2001;18(8):1455–1463.

- Raj D, Ghosh E, Mukherjee AK, Nozaki T, Ganguly S. Differential gene expression in *Giardia lamblia* under oxidative stress: significance in eukaryotic evolution. Gene 2014;535(2):131-9.
- Reyes-Vivas H, Díaz A, Peon J, Mendoza-Hernández G, Hernández-Alcántara G, De la Mora-De la Mora I, Enríquez-Flores S, Domínguez-Ramírez L, López-Velázquez G. Disulfide bridges in the mesophilic triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* are related to oligomerization and activity. J Mol Biol 2007;365(3):752-63.
- Reyes-Vivas H et al, Giardial triosephosphate isomerase as possible target of the cytotoxic effect of omeprazole in *Giardia lamblia*, Antimicrobial Agents and Chemoyherapy, 2014.
- Richard JP, Zhai X, Malabanan MM. Reflections on the catalytic power of a TIM-barrel. Bioorg Chem 2014;57:206-12.
- Rópolo AS, Touz MC. A lesson in survival, by *Giardia lamblia*. ScientificWorldJournal 2010;10:2019-31.
- Theel ES, Pritt BS. ParasitesMicrobiol Spectrum 2016;4(4).doi: 10.1128/microbiolspec. DMHI2-0013-2015.
- Thompson RCA, Monis PT. Taxonomy of *Giardia* Species. En: Luján HD, Svard S (eds). *Giardia: A model organism*. Springer Science + Business Media, New York, EUA, 2011.

- Touz MC, Rópolo AS, Rivero MR, Vranych CV, Conrad JT *et al.*, Arginine deiminase has multiple regulatory roles in the biology of *Giardia lamblia*, *Journal of Cell Science* 121, 2930-2938, 2008.