



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA**

---

---

**“AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DEL GEN DE  
LA FRUCTOSA-1,6-BIFOSFATO ALDOLASA DEL  
PARÁSITO *Giardia lamblia*, PARA LA  
GENERACIÓN DE UNA ENZIMA  
RECOMBINANTE”.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A :**

**KARLA KARAMY VELÁZQUEZ CHICO**



**DIRECTOR DE TESIS: DR. GABRIEL LÓPEZ VELÁZQUEZ**

**ASESOR INTERNO: QFB. MARÍA DEL ROCÍO BRECEDA HERNÁNDEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

**DR. GABRIEL LÓPEZ VELÁZQUEZ**

**Q.F.B. MARÍA DEL ROCÍO HERNÁNDEZ BRECEDA**

**M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ**

**BIOL. CARLOS MONTOYA MARTÍNEZ**

**DRA. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA**

## **SUSTENTANTE**

**KARLA KARAMY VELÁZQUEZ CHICO**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE BIOQUÍMICA GENÉTICA, TORRE DE INVESTIGACIÓN “DR. JOAQUÍN CRAVIOTO”, INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, S. S.**

**LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO CONTÓ CON EL APOYO DEL PROYECTO CONACYT 62321**

## DEDICATORIAS

A mi Mamá Paty, gracias por ser ese inmenso manantial de amor, vida, conocimiento y fe, gracias por todas las enseñanzas, valores y lecciones que solo una guerrera como tú ha podido dejar en mi vida, eres la luz de mi camino, mi mejor amiga y la mejor compañera de viaje que me ha podido tocar en esta vida. Que te puedo decir, eres la mejor. Todo es gracias a ti, por ti y para ti. Te admiro, amo y respeto profundamente.

A mi Hermano Luis, gracias por ser mi mejor amigo y mi más grande cómplice, por que me has dado grandes lecciones de vida y me has enseñado a enfrentar los problemas con valentía y con la frente siempre en alto. Gracias por mis muñecos Leo y Marcia. Porque juntos hemos vencido el tiempo y la distancia y cada vez estamos más cerca, te amo “la banda”.

A mi papá José Luis, gracias por darme la vida, todo tu apoyo y tu confianza sin esperar nada a cambio, siempre llevo conmigo todo lo que me inculcaste desde pequeña. Gracias también por enseñarme que en la vida no existen los instructivos y que detrás de una situación difícil siempre vienen muy buenos momentos.

A mis tíos Jero y Maru, porque son mis segundos padres, pero además, mis grandes amigos. Gracias por el amor, la comprensión, el cuidado, en fin, por ser mis dos angeles favoritos, los amo inmensamente y estoy profundamente agradecida de contar con ustedes. Espero un día poder recompensarles aunque sea un poco de todo lo que me han dado.

Al distinguido Dr. Daniel Ascencio González, gracias por creer en mi, por brindarme todos sus sabios consejos y por enseñarme a hacer cada momento mágico y especial, pero sobre todo gracias por enseñarme el valor del “tiempo”.

A mi Phoebe, por ser mi más fiel compañera.

A mi querido Dr. Omar, porque sin tu apoyo incondicional esto no sería posible. Tú mejor que nadie sabes que viviré eternamente agradecida contigo por motivarme. Gracias también por compartir conmigo tantos y tantos momentos. Te quiero muchísimo.

A mi querido Adolfo, por ser mi primer y gran amigo de la carrera, gracias por inculcarme ese gran amor a la Biología y motivarme tantas y tantas veces. Gracias por todo lo que significas en mi vida. KTSM4Ever!

A mis grandes amigos de la carrera Isrra, Israel, Alma, Chino, esperando que algún día los planetas se vuelvan a alinear como hace mucho no lo hacen. Gracias por los grandes momentos vividos en Zaragoza Beach. Los quiero mucho.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias al Dr. Gabriel López Velázquez por el conocimiento aportado y a todo su equipo de trabajo del Laboratorio de Bioquímica Genética del Instituto Nacional de Pediatría por las facilidades otorgadas durante la realización de este trabajo.

Gracias a la Q.F.B. María del Rocío Breceda Hernández por todo el apoyo brindado y sus valiosas aportaciones a este trabajo. Gracias por creer en mi Profesora y regalarme su tiempo y consejos.

Gracias al M. en C. Luis Sánchez Sánchez por orientarme y apoyarme en los momentos más difíciles. Por siempre Gracias.

Gracias al Biol. Carlos Montoya Martínez por su apoyo incondicional y ayuda para culminar esta importante etapa de mi vida.

Gracias a la Dra. Lucila Álvarez Barrera por su apoyo y sus valiosas aportaciones en este trabajo. Gracias por el tiempo dedicado.

Gracias a todos los visibles e invisibles que directa e indirectamente han hecho posible esta tesis.

Gracias a ti que siempre estás ahí...

# ÍNDICE

<b>I. RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
i. GIARDIASIS	8
ii. CICLO DE VIDA <i>GIARDIA LAMBLIA</i> Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN	10
iii. MORFOLOGÍA	14
iv. ENQUISTACIÓN	15
v. DESENQUISTACIÓN	16
vi. METABOLISMO EN GENERAL	16
vii. METABOLISMO DE <i>Giardia lamblia</i>	20
viii. PROPIEDADES DE LA FRUCTOSA-1,6-BIFOSFATO ALDOLASA	21
ix. MECANISMO CATALÍTICO	22
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>25</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	<b>27</b>
<b>V. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
i. OBJETIVO GENERAL	27
ii. OBJETIVOS PARITCULARES	27
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
i. PURIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO DE <i>Giardia lamblia</i>	28
ii. CUANTIFICACIÓN DE DNA POR ESPECTROFOTOMETRÍA	29
iii. PURIFICACIÓN DE RNA DE GIARDIA LAMBLIA	30
iv. IDENTIFICACIÓN DEL GEN	31
v. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA, PCR	31
vi. DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS	32
vii. AMPLIFICACIÓN DEL GEN POR PCR	33
viii. GELES DE AGAROSA PARA ELECTROFORESIS DE DNA	33
ix. PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE FRAGMENTOS DE GEL DE AGAROSA	34
x. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR	35
xi. DIGESTIONES	36

xii.	LIGACIONES	36
xiii.	CLONACIÓN EN UN VECTOR DE REPLICACIÓN	36
xiv.	CLONACIÓN EN UN VECTOR DE SOBREEXPRESIÓN	39
xv.	SECUENCIACIÓN DE LAS CLONAS POSITIVAS	42
xvi.	PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN	42
xvii.	PURIFICACIÓN DE DÑA A PARTIR DE PLACAS Y CULTIVOS BACTERIANOS	43
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
i.	IDENTIFICACIÓN DEL GEN	45
ii.	SECUENCIA DEL GEN DE FRUCTOSA-1,6-BIFOSFATO ALDOLASA, FBPA	46
iii.	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	47
iv.	AMPLIFICACIÓN DEL GEN	47
v.	LIGACIONES Y DIGESTIONES	49
vi.	EXPERIMENTOS ADICIONALES	53
vii.	SOBREEXPRESIÓN DE LA ENZIMA	53
viii.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO TOTAL	53
ix.	GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES	54
VIII.	CONCLUSIONES	55
IX.	REFERENCIAS	56

## RESUMEN

La giardiasis es una parasitosis intestinal causada por el protozoo *Giardia lamblia* de distribución cosmopolita, con mayor impacto en países en vías de desarrollo, la cual provoca un efecto adverso en el crecimiento y estado nutricional, especialmente, durante la infancia.

Actualmente para el tratamiento de esta enfermedad existen diversos fármacos, entre los que destacan: los 5-nitroimidazoles, los nitrofuranos, la quinacrina y los benzimidazoles; sin embargo, hasta el momento no se cuenta con uno que reúna todas las características ideales como son: alta eficacia, mínimos efectos adversos y utilidad reconocida en dosis única. Aunado a esta condición, se han reportado cepas de *G. lamblia* resistentes al medicamento, por lo tanto es de gran importancia desarrollar nuevas y mejores terapias contra la infección.

*Giardia lamblia* es un organismo flagelado que se caracteriza por no llevar a cabo fosforilación oxidativa, por ello, su metabolismo energético se basa principalmente en la vía glucolítica. Las enzimas de la glucólisis, entre ellas la fructosa-1,6-bifosfato aldolasa, se presentan como potenciales blancos para el diseño de compuestos inhibidores o inactivadores específicos de especie.

En este trabajo se amplificó por PCR el gen de la fructosa 1-6 bifosfato Aldolasa (FBPA) de *G. lamblia* para su inserción en un vector de sobre-expresión proteica, lo cual es muy importante en el abordaje del diseño racional de fármacos utilizando a la enzima recombinante fructosa-1,6-bifosfato Aldolasa de *G. lamblia* como potencial blanco de nuevos fármacos anti-giardiasicos.

## INTRODUCCIÓN

### GIARDIASIS

La giardiasis es una patología cosmopolita, se estima que cerca de 200 millones de personas se infectan anualmente por *Giardia lamblia* en Asia, Africa y América Latina (Sullivan et al., 1992). Debido a las diferencias en las condiciones sanitarias en zonas en vías de desarrollo es mayor su prevalencia lo que constituye un grave problema de salud pública para estos países (Minenoa y Avery, 2003; Quihui, 2006). La infección producida por este flagelado ocurre desde el trópico hasta la región de los polos, sin embargo la incidencia es mayor en regiones de clima templado (Oberhuber y Stolte, 1990), que varía entre 0.5 a 20%; con una prevalencia de 20 a 30% en países en desarrollo y de 2 a 5% en países industrializados, por ejemplo en Estados Unidos (Farthing, 1997; Marshall *et al.*, 1997).

Nueva Zelanda es el país que cuenta con mayor presencia de infección por este parásito comparado con otros países desarrollados, durante el periodo de 1997 a 2006, la tasa media anual notificada fue de 44.1 casos por cada 100,000 habitantes (Snel 2009). En Alemania también fue observado un incremento de casos entre 2002 y 2007, la incidencia más alta fue reportada en niños de 1 a 5 años de edad (tasa de incidencia de 11.5 por cada 100,000 habitantes) y Berlín fue considerada una de las ciudades más afectadas con una tasa de incidencia 17.5 por cada 100,000 habitantes (Sagebiel *et al.*, 2009).

Pequeñas cantidades de quistes ingeridos por el huésped, durabilidad de los quistes y la variedad de animales como reservorios, contribuyen para su distribución global y determinan la epidemiología

(Heresi y Cleary, 1997). Grandes epidemias han ocurrido infectando en algunos casos a miles de personas, en algunos países en vías de desarrollo, la giardiasis en niños afecta a cerca del 100% de la población. La mayoría de las veces la transmisión es directa: fecal-oral, mediante alimentos y aguas contaminadas o de persona a persona a través de contacto sexual (principalmente en homosexuales) y de animales al hombre (Addis, 1992; Boreham, 1990; Thompson, 2004). También se observa una mayor prevalencia de diarrea causada por *G. lamblia* en pacientes portadores de VIH, debido a la depresión que ocurre en el sistema inmune (Moolasart, 1999; Nash *et al.*, 2001).

En México, un estudio reciente reportó una seroprevalencia de 55.3% para *G. lamblia*, mostrando que la exposición al parásito se produce a una edad temprana y que los principales factores de riesgo de seropositividad son la edad y el sexo, la cual fue mayor de en hombres (58.6%) que en mujeres (50.2%) (Cedillo, 2009). Adicionalmente, se ha registrado la presencia de infecciones por *Giardia*, tanto en población urbana como rural (Díaz, 2002).

De acuerdo con datos del Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica (Secretaría de Salud, 2007) en nuestro país, la incidencia fue de 25.77 por cada 100 000 habitantes, es decir, 27 266 casos, siendo los niños de 1 a 5 años el grupo de edad más afectado y Campeche el estado de la República dónde se concentra un mayor índice de casos.

La giardiasis es considerada altamente contagiosa, cuándo uno de los miembros de la familia la contrae normalmente otros también se infectan (Minenoa y Avery, 2003). En general los niños pequeños son más susceptibles al organismo debido a las prácticas de higiene, se calcula que existen tres veces más probabilidades de contagio en comparación con los adultos. Se ha observado que los niños que acuden a guarderías tienen un mayor riesgo para contraer la enfermedad.

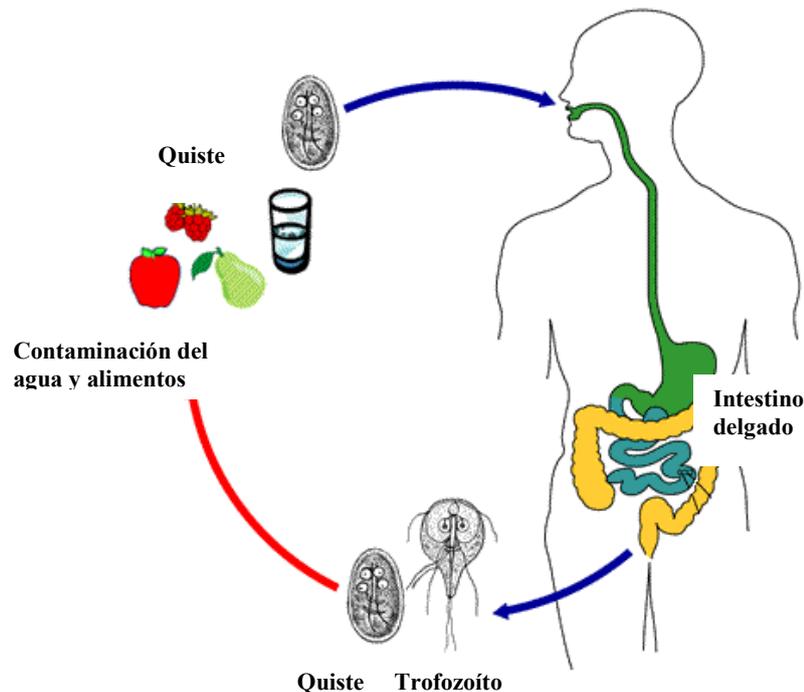
La enfermedad asociada con malabsorción de nutrientes aguda o crónica puede causar alteraciones en el desarrollo de recién nacidos y niños (Farthing 1996; Minenoa y Avery, 2003). Se inicia por la ingestión de los quistes del parásito, los cuales se desenquistan durante su pasaje por el contenido ácido del estómago, liberando los trofozoítos. Estos colonizan el intestino delgado superior y se adhieren a la superficie del epitelio intestinal (Adam, 2001).

### **Ciclo de vida de *Giardia lamblia* y manifestaciones clínicas de la infección**

Debido a que *Giardia lamblia* es una de las células eucariotas más primitivas que se conocen, su estudio es de gran interés en biología (Sogin, 1989). En el ciclo de vida *G. lamblia* sufre cambios significativos bioquímicos y morfológicos que le permiten sobrevivir en ambientes y condiciones que de otro modo lo destruirían. Para sobrevivir fuera del intestino del hospedador, los trofozoítos de *Giardia* se diferencian a quistes, los que se caracterizan por poseer una rígida pared externa de glicoproteína que les permiten sobrevivir inclusive frente a la acción de los medicamentos más comunes, entre ellos el metronidazol (Lujan, 2006). El mecanismo de adaptación de *G. lamblia* conocido como enquistamiento es esencial para que el parásito pueda sobrevivir fuera del intestino del hospedador, ya que los trofozoítos son sumamente sensibles a los cambios de temperatura, humedad y a la presencia de agentes químicos. En este proceso, los trofozoítos descienden por el intestino del hospedador, y al encontrar un ambiente pobre en colesterol, se induce su diferenciación a quiste, los cuales son eliminados con las heces (Adam, 2001).

El ciclo de vida de *G. lamblia* (Fig. 1), consiste en un quiste infectivo y un trofozoíto vegetativo. La transmisión del quiste es por vía feco-oral, principalmente a través de agua y alimentos

contaminados. Una vez que el quiste es ingerido, se desenquista en el intestino delgado dando origen a dos trofozoítos. Las condiciones de desenquistamiento son provistas en el estómago. Los trofozoítos se dividen por fisión binaria en el intestino delgado y causan los síntomas de la giardiasis. Algunos de los trofozoítos son inducidos a enquistarse, completándose así el ciclo, cuando los quistes son ingeridos por otro hospedero (Margulis, 1989).



<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm>

**Figura 1.** Ciclo de Vida *G. lamblia*, La infección se inicia con la ingesta de los quistes, los que desenquistan en el intestino superior liberando los trofozoítos, la forma del parásito que prolifera en el intestino y es responsable de los síntomas de la enfermedad. Al descender por la luz intestinal, algunos trofozoítos comienzan a enquistarse, lo cual se manifiesta por la aparición de gránulos de secreción específicos que transportan los materiales que luego formarán la pared del quiste maduro y que protegen al parásito fuera del intestino del hospedador.

Los efectos clínicos de la infección por *G. lamblia* van desde un estado asintomático del portador hasta un síndrome de malabsorción severo y diarrea crónica. Diversos factores contribuyen a la amplia variación de síntomas, incluyendo la virulencia de la cepa de *G. lamblia*, el número de quistes ingeridos, la edad del hospedero, y el estado del sistema inmune del hospedero al momento de la infección (Farthing, 1996).

La mayoría de los niños con giardiasis son asintomáticos, sin embargo con anomalías funcionales y morfológicas en el tracto gastrointestinal (Sullivan et al., 1992). Entre las manifestaciones de la enfermedad aguda se encuentran: diarrea acuosa o pastosa, esteatorrea (evacuaciones generalmente explosivas, grasosas y fétidas), dolor epigástrico postprandial, anorexia, distensión abdominal, flatulencia y ocasionalmente, cefalea, febrícula, manifestaciones alérgicas (artralgias, mialgias, urticaria). La enfermedad aguda suele resolverse en unas semanas, aún sin tratamiento, pero un porcentaje importante de pacientes (30-50%) desarrolla una parasitosis crónica, con diarrea recurrente, esteatorrea, evidencia bioquímica de malabsorción de grasas, lactosa y otros disacáridos, vitamina A y vitamina B12, disminución de peso y deficiencias en el crecimiento y desarrollo infantil (Faure et al., 1993; SSA, 2007; Takahashi et al., 2001). Ciertos factores como inmunodepresión, hipogamaglobulinemia y desnutrición pueden aumentar el riesgo de infección por este parásito (Alparo, 2005).

La Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades décima edición (CIE-10), publicada por la Organización Mundial de la Salud, encargada de proveer los códigos para clasificar las enfermedades, menciona al fármaco Metronidazol como el estándar de oro para el tratamiento de la giardiasis (OMS, CIE-10). Metronidazol es un agente antimicrobiano con un amplio espectro de actividad frente a bacterias anaerobias y protozoarios que actúa como inhibidor de la enzima Piruvato Ferredoxin Oxirreductasa (PFOR) y bloquea el mecanismo energético anaeróbico del parásito provocándole la muerte (Adam 2001).

Existen varios medicamentos aprobados o comúnmente empleados para la erradicación del organismo, sin embargo, ya que en cada individuo ha variado la sensibilidad y los efectos secundarios a estos medicamentos, al evaluar la eficacia clínica de los agentes utilizados contra *G.*

*lamblia* es difícil comparar estudios ya que varían en cuanto a la metodología, el tratamiento, la población estudiada y el seguimiento. No obstante, pueden extraerse conclusiones de los estudios cuando se ven en su conjunto y se analiza la eficacia relativa de los agentes (Mineno y Avery, 2003).

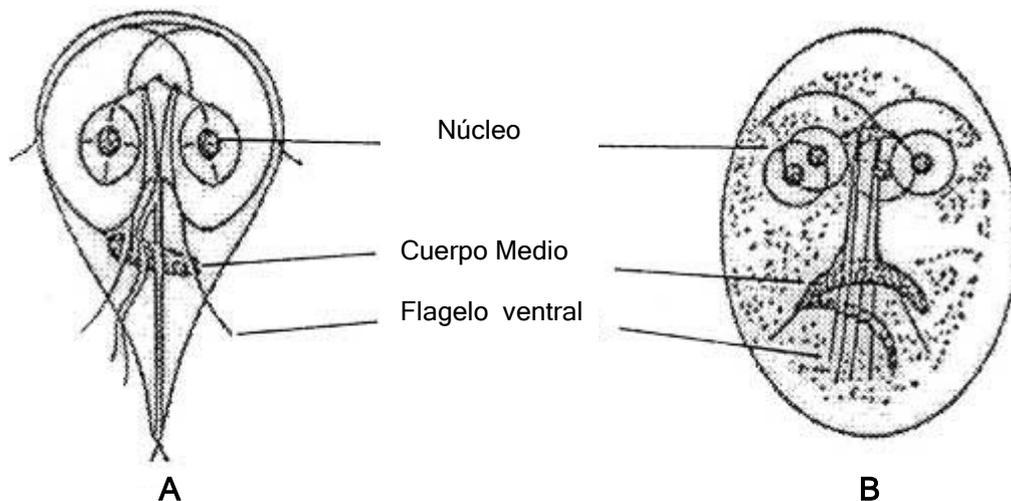
Se han estudiado evidencias de resistencia a medicamentos utilizados contra la giardiasis y se han realizado estudios bioquímicos para determinar la base de esta resistencia. Tanto metronidazol como furazolidona, producen radicales tóxicos dentro de la célula que tienen diferentes mecanismos bioquímicos de acción. La resistencia a metronidazol se correlacionó negativamente con la concentración intracelular de piruvatoferredoxin oxidoreductasa llevando a una disminución concomitante en la utilización de metronidazol libre en la célula. A nivel molecular la resistencia a metronidazol se asocia con cambios en el ADN.

Aunque los nitroimidazoles han sido la familia de fármacos de elección para el tratamiento anaeróbico los protozoos *G. lamblia* son menos sensibles a otros fármacos antiparasitarios, como son la furazolidona, el albendazol, y la quinacrina (Upcroft y Upcroft, 2001).

En el tratamiento de esta parasitosis también se involucran otros agentes antiparasitarios, entre los que se destacan: los nitrofuranos, la quinacrina, los benzimidazoles, entre otros medicamentos cuyos principios activos no son eficientes, ya que presentan un gran número de efectos secundarios, existen cepas que les son resistentes y es frecuente la reinfección en personas con bajas defensas (Escobedo et al., 2007). Debido a esto, es importante acelerar la investigación hacia un agente anti giardial (Mineno and Avery, 2003).

## Morfología

Los trofozoítos de *G. lamblia* miden aproximadamente de 12 a 15µm de largo y de 5 a 9µm de ancho. El citoesqueleto consiste de un cuerpo medio, una superficie cóncava en la porción ventral y 4 pares de flagelos -anterior, posterior, caudal y ventral (Fig.2) (Adam, 2001). Cuentan con 2 núcleos que se replican aproximadamente al mismo tiempo y están localizados en la parte anterior y son simétricos respecto al eje axial. Las vacuolas lisosomales así como las ribosomales y los gránulos se encuentran en el citoplasma. El aparato de Golgi se vuelve visible en trofozoítos que están enquistando. Los trofozoítos colonizan el intestino delgado del hospedero, predominando en la mitad del yeyuno, donde atacan la pared intestinal con un disco ventral adhesivo, por medio del cual obtienen los nutrientes necesarios, evitando además ser transportados fuera del mismo.



**Figura 2.** Diagrama de *Giardia lamblia*, A) Trofozoíto, B) Quiste

El disco ventral es un componente único e importante del citoesqueleto de *G. lamblia*, contiene actina,  $\alpha$ -actina, miosina y tropomiosina, que son proteínas contráctiles y que son la base bioquímica para la contracción del disco involucrado en la adherencia (Feely, 1982). El ataque depende de un metabolismo activo y es inhibido por temperaturas debajo de 37°C, elevados niveles

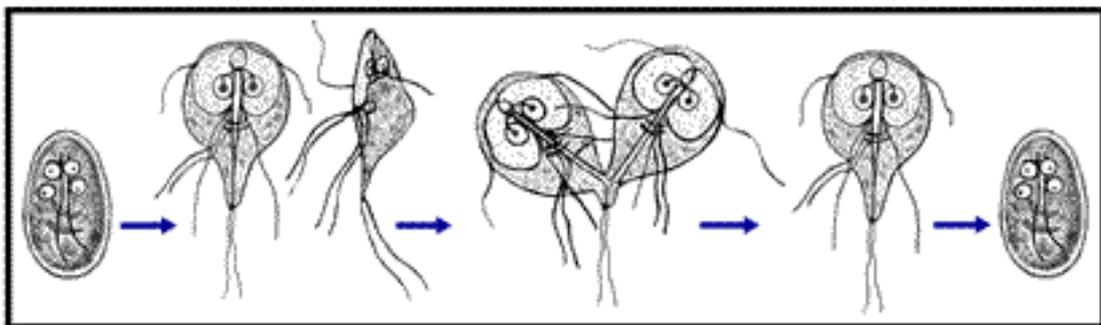
de oxígeno o concentraciones reducidas de cisteínas (Gillin y Diamond, 1981; Gillin y Reiner, 1982).

## Enquistación

Así como algunos trofozoítos colonizan y se replican en la superficie intestinal, algunos enquistan en el yeyuno después de la exposición a secreciones biliares (Fig. 3).

La enquistación se ha llevado a cabo *in vitro*, exponiendo los trofozoítos a condiciones que imitan el ambiente del yeyuno. Estas condiciones que promueven el enquistamiento, incluyen un pH levemente alcalino de 7.8 y conjugados de sales biliares con ácidos grasos (Gillin *et al.*, 1988).

La enquistación puede ser dividida en dos fases, temprana y tardía. La fase temprana consiste en una síntesis intracelular y transporte de los componentes de la pared del quiste (Reiner, 1990). La fase tardía de enquistamiento consiste en la aparición en el plasmalema del trofozoíto de sitios para la iniciación del ensamble de los filamentos de la pared del quiste seguido del montaje de la porción filamentosa de la pared del quiste (Reiner, 1989).



<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm>

**Figura 3.** El trofozoíto tiene 4 pares de flagelos que comienzan de 2 grupos de cuerpos basales y que están cerca de la línea media y anteroventrales al núcleo. Ellos emergen de las regiones anterior, posterior, caudal y ventral del trofozoíto. Nueve pares de microtúbulos rodean 2 microtúbulos para formar el flagelo. El flagelo parece ser importante para la movilidad, pero no para el ataque.

## **Desenquistación**

En el hospedero mamífero el desenquistamiento ocurre con la exposición al contenido del intestino delgado, después de pasar a través del ambiente ácido del estómago (Adam, 2001). El proceso de desenquistamiento es rápido, se lleva a cabo aproximadamente en menos de diez minutos para *G. lamblia* (Buchel, 1987). Después del inicio del desenquistamiento, uno o dos pares de protuberancias citoplásmicas aparecen para desarrollar el flanco ventral (Hetsko *et al.*, 1998). Externamente, el surgimiento de los flagelos a través de la pared del quiste es seguido por el trofozoíto completo (Buchel, 1987). La cariocinesis ocurre durante el enquistamiento, por lo que el trofozoíto emergente tiene cuatro núcleos pero sólo ocho flagelos para un trofozoíto. El trofozoíto se vuelve más redondo y lleva a cabo citocinesis dentro de los 15-30 minutos siguientes del desenquistamiento, por lo cuál dos trofozoítos son formados de un solo quiste (Adam, 2001).

## **Metabolismo en general**

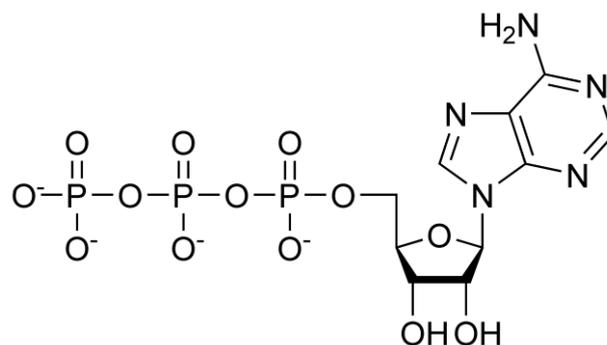
El término metabolismo se refiere al conjunto de reacciones químicas que tiene lugar en la célula, y tiene 3 funciones específicas a saber:

- Obtener energía química del entorno, almacenarla, para utilizar luego en diferentes funciones celulares.
- Convertir los nutrientes exógenos en unidades precursoras de los componentes macromoleculares de la célula bacteriana.
- Formar y degradar moléculas necesarias para funciones celulares específicas, como por ejemplo, movilidad y captación de nutrientes.

El metabolismo tiene lugar a través de secuencias de reacciones catalizadas enzimáticamente, y se divide en anabolismo y catabolismo.

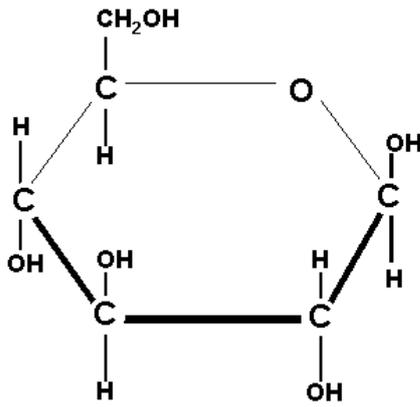
La energía es la capacidad para efectuar trabajo, resulta tan vital para la civilización moderna, como para el microcosmos de una célula. Las células sintetizan constantemente sustancias nuevas, efectúan trabajo mecánico y producen calor (Baker, Allen, 1976).

Las células heterotróficas obtienen la energía necesaria a partir de la degradación (catabolismo) de moléculas nutrientes. Cuando dichas moléculas nutrientes se rompen, la energía liberada debe de ser canalizada en una dirección apropiada ya que si no es de inmediato capturada, se pierde en forma de calor y no es aprovechada por los procesos de la célula. La energía se puede almacenar como enlaces fosfato de alto contenido de energía. De esta manera, la energía disponible adopta una forma común para los procesos metabólicos que lleva a cabo la célula. En la mayoría de los seres vivos los enlaces de alto contenido de energía se encuentran bajo la forma del trifosfato de adenosina (ATP) (Lehninger *et al.*, 1993), (Fig. 4).



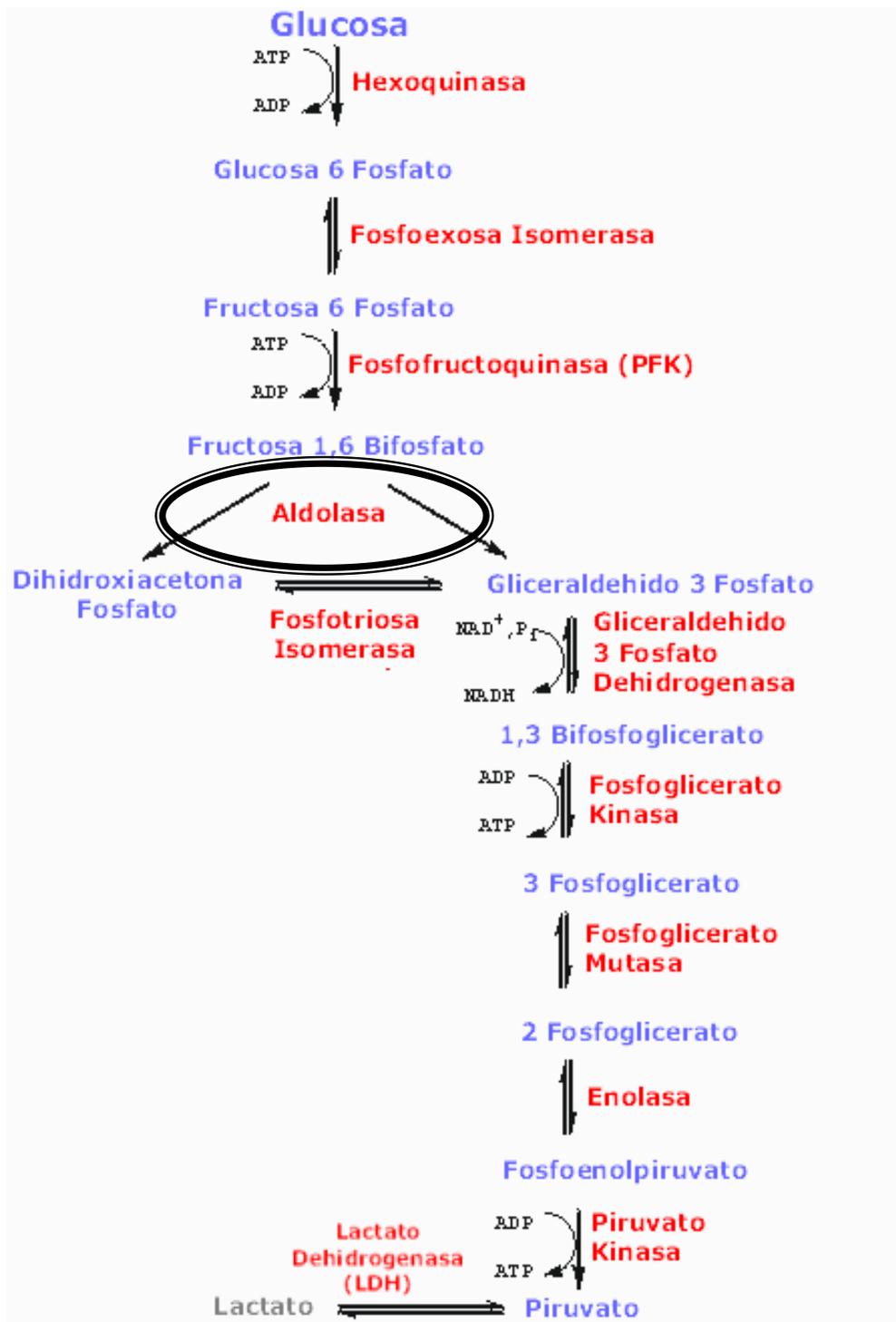
**Figura 4.** Estructura del trifosfato de adenosina (ATP)

La glucosa (Fig. 5) es una de las principales moléculas combustibles de la mayoría de organismos, es rica en energía y puede movilizarse rápidamente desde la reserva de glucógeno cuando se efectúan demandas rápidas de energía.



*Figura 5.* Estructura de la glucosa

La glucólisis o ruta de Embden-Meyerhof, (Fig.6) es la secuencia metabólica en la que se oxida la glucosa. Consiste en nueve reacciones enzimáticas que producen dos moléculas de piruvato y dos equivalentes reducidos de NADH con la consecuente producción de cuatro moléculas de ATP por cada molécula de glucosa que entra en la vía (Lehninger *et al.*, 1993).



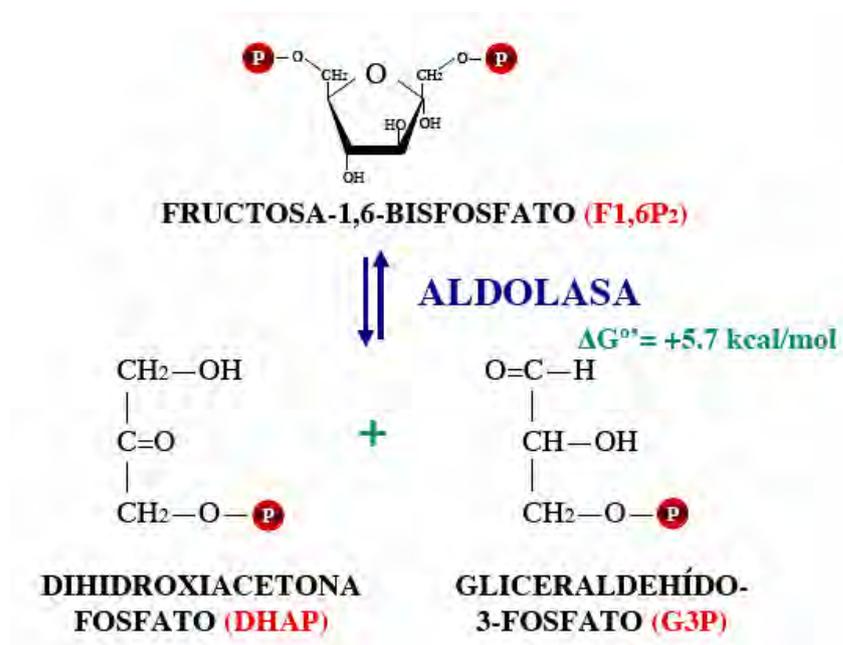
**Figura6.** Glucólisis. La vía glucolítica para la degradación de la glucosa se divide en 2 etapas principales. La etapa 1 es preparativa, con reacciones que no son de oxido-reducción, sin liberación de energía, y con formación de 2 intermediarios de 3 átomos de carbono cada uno. En la etapa 2 ocurren reacciones de oxido-reducción, con liberación de energía, formación de ATP por el proceso de fosforilación a nivel del sustrato (el ATP es generado durante un paso enzimático específico), y se forman 2 moléculas de piruvato (Varela, 2000).

## **Metabolismo de *Giardia lamblia***

*Giardia lamblia* se distingue por ser un organismo microaerofílico y presentar mitosomas (organelos remanentes de mitocondrias) en lugar de mitocondrias (Tovar, 2003). No presenta enzimas para llevar a cabo fosforilación oxidativa y la principal forma de obtener energía (ATP), proviene de la degradación de glucosa a piruvato mediante la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato. Una diferencia significativa entre la glucólisis de éste parásito y la vía glucolítica de los seres humanos que infecta es que la glucosa no se oxida completamente, como en el metabolismo aeróbico, siendo los productos finales de la reacción el acetato, etanol, alanina, y el CO<sub>2</sub> (Adam, 2001; Jarroll, 1981; Saavedra, 1996; Schofield, et al., 1991).

## Propiedades de la fructosa-1, 6-bifosfato Aldolasa (FBA)

Las aldolasas (Fig.7.) son enzimas de la clase de las liasas, estas catalizan reacciones en las cuales se produce la adición o sustracción de grupos químicos a dobles enlaces. Han sido objeto de interés continuo por su habilidad para catalizar la formación de enlaces Carbono-Carbono en organismos vivientes (St. Jean, 2005). La reacción que cataliza es una condensación aldólica reversible (Lehninger *et al.*, 1993).



**Figura 7.** Reacción enzimática de la aldolasa. Rompimiento de la fructosa -1,6- bifosfato catalizado por la Aldolasa.

Su papel es mejor conocido en la glucólisis, donde la fructosa-1,6-bifosfato aldolasa (EC 4.1.2.13) cataliza la ruptura reversible de la hexosa D-fructosa-1,6-bifosfato para formar 2 fosfatos de triosa diferentes que se interconvierten químicamente, el gliceraldehído-3-fosfato (GAP) una aldosa y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), una cetosa (Lehninger *et al.*, 1993; St. Jean, 2005). En la dirección glicolítica esta conversión es un paso en la ruta Embden Meyerhof-Parnas, y en la dirección opuesta es parte de la ruta gluconeogénica o ciclo de Calvin (Henze, 1998).

## Mecanismo Catalítico

Dos clases de aldolasas ocurren en la naturaleza (Siebers, 2001). Las aldolasas *clase I* y *clase II* pueden ser distinguidas por usar diferentes mecanismos catalíticos para romper el mismo sustrato (Fig. 8).

Las aldolasas de la *clase I* están presentes en animales y plantas, utilizan catálisis covalente para la formación de las dos triosas fosfato.

En los vertebrados hay tres isoenzimas de la aldolasa *clase I*, distinguibles por su especificidad al sustrato que se localiza en tejidos específicos:

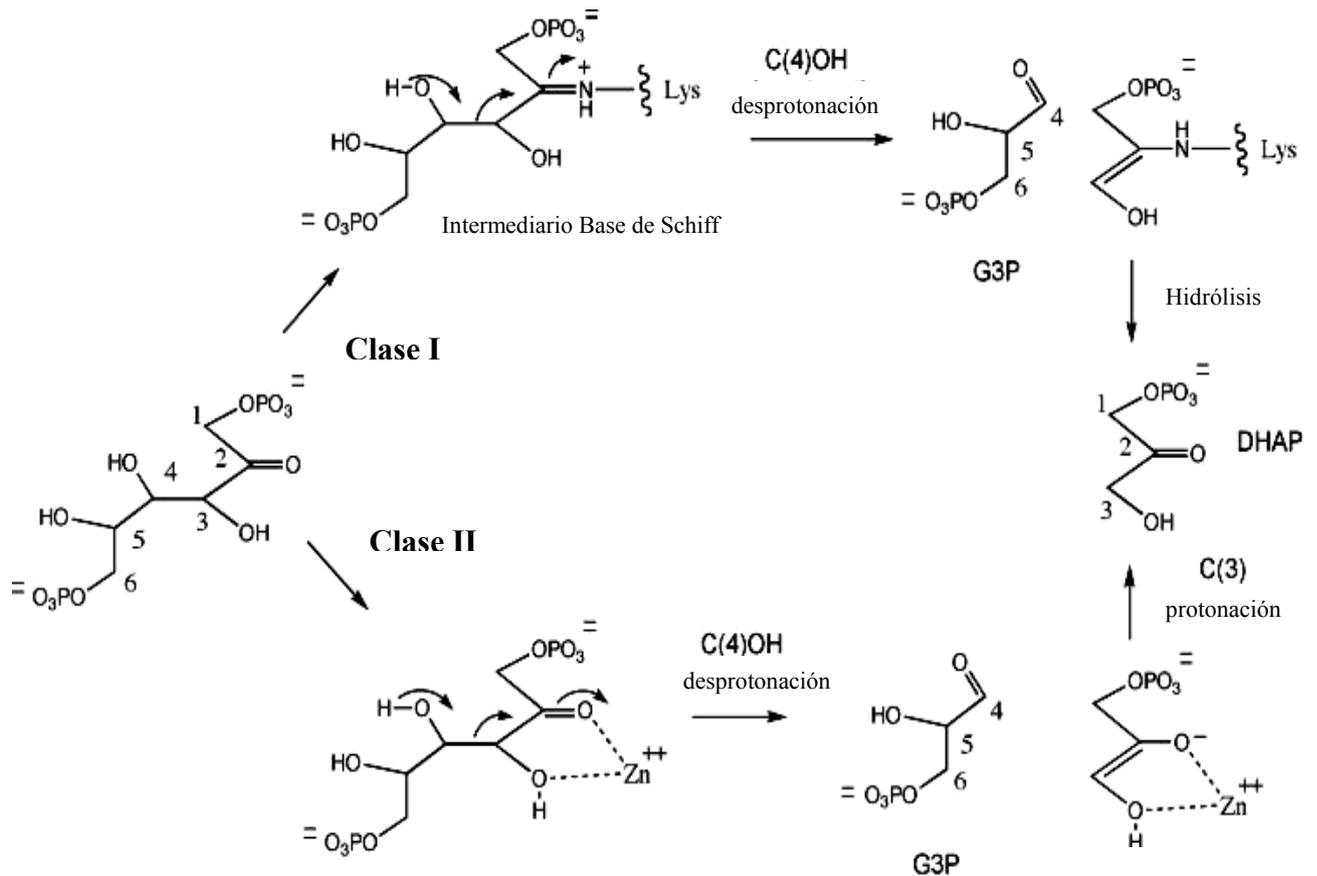
- Aldolasa A, presente en músculo esquelético y eritrocitos
- Aldolasa B, presente en hígado, riñón e intestino delgado
- Aldolasa C, presente en cerebro y tejido nervioso

Las tres se distinguen entre sí por sus propiedades inmunológicas y cinéticas (Kim *et al.*, 1998; Penhoet, *et al.*, 1969; Yeltman, *et al.*, 1998).

Por otra parte, las aldolasas de la *clase II* sólo se encuentran en levaduras, algas verde-azules, hongos y algunas bacterias. Estructuralmente estas aldolasas estabilizan al grupo carbonilo por medio de un catión metálico divalente, como  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  (Imanaka *et al.*, 2002).

La actividad de algunas enzimas depende solamente de su estructura como proteínas, mientras que otras necesitan, además uno o más componentes no proteicos, llamados cofactores. El cofactor puede ser un ión metálico. En tales enzimas el ión metálico puede actuar como: a) centro catalítico, b) grupo puente para reunir el sustrato y la enzima formando un complejo de coordinación, c) agente estabilizante de la conformación de la proteína enzimática. En su forma catalíticamente activa, las enzimas que precisan de iones metálicos se llaman a veces “metaloenzimas”; en algunas de ellas el componente metálico, por sí sólo, ya posee una actividad catalítica primaria muy incrementada a su vez por la enzima.

Algunas enzimas que precisan de iones metálicos para su actividad son inhibidas no competitivamente por agentes capaces de unirse al metal esencial. Por ejemplo, el agente quelante tetra-acetato de etilendiamina (EDTA) se une reversiblemente al  $Mg^{2+}$  y a otros cationes divalentes, inhibiendo así de modo no competitivo a algunas enzimas que precisan de tales iones para su actividad.



**Figura 8.** Esquema de mecanismos catalíticos de las aldolasas *clase I* y *clase II*.

Generalmente solo un tipo de aldolasa es funcional en muchos organismos, pero algunas células eucariontes y procariontes poseen ambas clases de aldolasas (Marsh., 1992).

Aunque la masa molecular de la subunidad de este tipo de aldolasas es similar (aproximadamente 40 kDa), ellas no son homólogas en sus estructuras primarias y muestran una estructura cuaternaria distinta. Las aldolasas de la *clase I* típicas, exhiben una subunidad tetramérica, excepto para las estructuras monoméricas observadas para las enzimas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus carnosus*, mientras que las aldolasas de la *clase II* normalmente son dímeros (Götz, 1980; Siebers 2003; Witke, 1993).

## JUSTIFICACIÓN

La giardiasis cuyo agente etiológico es *Giardia lamblia* (sinónimo *G. duodenalis*, *G. intestinalis*), es una parasitosis intestinal cosmopolita. Debido a las diferencias en las condiciones sanitarias, en países en vías de desarrollo es mayor la prevalencia de esta patología. Desde 1960 se ha asociado a brotes epidémicos importantes en países altamente industrializados, entre ellos Nueva Zelanda, Estados Unidos de Norteamérica y otros en Europa. En México, la prevalencia e incidencia más altas se encuentran entre lactantes, preescolares y escolares (CENAVECE, SSA, 2007).

*Giardia lamblia*, el protozoo intestinal patógeno más frecuentemente diagnosticado a escala mundial, se reconoce como uno de los agentes causantes de diarrea en el niño que puede llegar hasta trastornos que comprometen su adecuado crecimiento. En el tratamiento de esta parasitosis actualmente existen diversas terapias que involucran diferentes agentes antiparasitarios, entre los que se destacan: los 5-nitroimidazoles, los nitrofuranos, la quinacrina, los benzimidazoles, entre otros. Sin embargo, presentan un gran número de efectos secundarios, además, se ha reportado que existen cepas de *G. lamblia* resistentes al tratamiento, lo que ha intensificado la búsqueda de nuevas estrategias para el tratamiento de esta enfermedad.

Existe poca información acerca de la fructosa -1,6- bifosfato aldolasa de *Giardia lamblia* que permita cuantificar el potencial de la misma como un blanco para el diseño de fármacos especie-específicos, afectando el metabolismo energético de este parásito, por tanto, la generación de esta enzima recombinante ayudará para generar información al respecto.

En el grupo de trabajo del laboratorio de Bioquímica Genética del Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de Salud, se plantea que al interrumpir la vía glucolítica de *G. lamblia* se afectará la sobrevivencia del parásito debido a la dependencia que tiene de esta vía.

## **HIPÓTESIS**

La amplificación y clonación del gen de la fructosa-1,6-bifosfato aldolasa permitirá generar la enzima recombinante aldolasa que aportará información acerca de la vía glucolítica de este parásito.

## **OBJETIVO GENERAL**

Amplificar y clonar el gen de la fructosa-1,6-bifosfato aldolasa de *G. lamblia* en un vector de sobreexpresión proteica para generar la enzima recombinante fructosa-1,6-bifosfato Aldolasa.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Aislar DNA genómico de trofozoítos de *G. lamblia* cepa WB.
- Amplificar por PCR el gen de la Fructosa-1,6- bifosfato aldolasa de *G. lamblia*.
- Clonación del gen de la Fructosa-1,6- bifosfato aldolasa de *G. lamblia* en un vector de replicación pCR 2.1.
- Subclonación del gen de la Fructosa-1,6- bifosfato aldolasa de *G. lamblia* en un vector de sobreexpresión pET 3a.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La realización de la metodología se llevó a cabo en las siguientes etapas:

### **Purificación de DNA genómico de *Giardia lamblia***

1. Se obtuvieron 4 tubos con cultivo de trofozoítos de *G. lamblia* y se colocaron en hielo durante 10 minutos.
2. Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para formar un botón que contenga las células. Se desechó el sobrenadante.
3. Al botón obtenido, se le adicionaron 4 de WCLB (10 mM Tris pH 7.5, 20 mM EDTA, 50mM NaCl con 1% de SDS y 50 mg/ de proteinasa K y se incubó a 37°C girando sobre un orbitador durante 30 minutos.
4. Se incubó durante 15 minutos en hielo, luego se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se agitó en Vortex durante 1 minuto. Esto con el fin de separar totalmente las células de las paredes de los tubos de ensayo.
5. La muestra se incubó a 42°C durante 18 horas.
6. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se adicionaron a la muestra 2 de fenol y se agitó en Vortex durante 2 minutos, después se mezclaron por inversión durante 10 minutos.
7. La muestra se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos.
8. La fase superior del tubo se extrajo y se colocó en un tubo limpio, donde se adicionaron 1.5 de fenol y 1.5 de cloroformo, y se agitó en Vortex durante 2 minutos y luego se mezclaron por inversión durante 10 minutos.
9. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos.

10. La fase superior del tubo se volvió a extraer y se colocó en un tubo limpio al cuál se le adicionaron 2.5 de una mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (20:1), y se mezcló por inversión durante 10 minutos.
11. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos.
12. La fase superior se extrajo y se colocó en un tubo limpio al cuál se le adicionaron 100µl de NaCl [1 M] y 4 de etanol absoluto a -20°C, se mezcló y se almacenó a -70°C durante 24 horas.
13. Transcurrido el tiempo de incubación, la muestra se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos en un tubo de 1.5, para obtener un botón. Se desechó el sobrenadante.
14. Al botón obtenido, se le adicionó etanol al 70% y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante.
15. Al botón obtenido se le dejó secar a temperatura ambiente durante 15 minutos y se le resuspendió en 150µl de agua doble destilada.
16. Se cuantificó la concentración de DNA obtenida a través de un espectrofotómetro a una absorbancia de 260nm.
17. El DNA obtenido, previamente etiquetado se almacenó a 4°C.

### **Cuantificación de DNA por Espectrofotometría**

1. En un tubo con capacidad de 1.5, se adicionaron 498µl de agua doble destilada.
2. El espectrofotómetro se blanqueó con el tubo con 498µl de agua doble destilada.
3. Al mismo tubo se le adicionaron 2µl de la muestra de DNA obtenida.
4. Se tomó la lectura del espectrofotómetro a una absorbancia de 260nm para cuantificar la concentración de DNA y a 280nm para cuantificar el contenido de proteínas, así como la relación entre ambas absorbancias que dan como resultado el índice de pureza obtenido.

Para calcular la concentración se utilizó la siguiente relación:

$$1 \text{ D.O. }_{260} = 50 \mu\text{g/}$$

Donde D.O.  $_{260}$  = densidad óptica a 260nm de absorbancia.

El resultado se multiplica por el factor de dilución (250).

### **Purificación de RNA de *Giardia lamblia***

1. Se obtuvieron 2 tubos con cultivo de trofozoítos de *G. lamblia* y se colocaron en hielo durante 10 minutos.
2. Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para formar un botón que contenga las células. Se desechó el sobrenadante.
3. Al botón obtenido, se le adicionaron 5 de PBS [1X] para lavar el botón de algunas impurezas y se agitó en Vortex durante 1 minuto.
4. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante.
5. A la muestra se le adicionó 1 de solución Trisol, se selló con tapón de hule y se agitó suavemente durante 5 minutos para bañar las paredes del tubo, después se colocó en hielo 10 minutos.
6. La muestra se agitó en Vortex durante 15 segundos y se virió en un tubo Eppendorf de 1.5 limpio y previamente lavado con Agua DEPC (Dietilpirocarbonato).
7. La muestra se agitó en Vortex durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
8. Se centrifugó a 13000 rpm durante 25 minutos a una temperatura de 4°C.
9. La fase sobrenadante se recuperó en un tubo Eppendorf de 1.5 limpio y previamente lavado con Agua DEPC.

10. A la muestra se le añadieron 200µl de Isopropanol y se agitó en Vortex durante 15 segundos.
11. Se incubó a -70°C durante 16 horas.
12. Se centrifugó a 13000 rpm durante 25 minutos a una temperatura de 4°C. Se desechó el sobrenadante.
13. El botón obtenido se resuspendió en 1 de Etanol al 75%.
14. Se centrifugó a 13000 rpm durante 25 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se desechó.
15. El tubo de 1.5 con el botón obtenido se colocó sin tapar dentro de un vaso de precipitado tapado con una gasa, esto con el fin de dejar evaporar el Etanol a temperatura ambiente.

### **Identificación del gen**

Se realizó una búsqueda de la secuencia del gen de la Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa de *Giardia lamblia* en el banco de secuencias GENBANK, número de acceso XM\_774313. Se determinó el porcentaje de similitud e identidad de la secuencia de aminoácidos a través de un análisis tipo BLAST, utilizando el programa BLAST (Basic Local Aligment Search Tool) del servidor público PubMed.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias específicas de DNA, utilizando dos oligonucleótidos que funcionan como cebadores (*primers*) los cuales se alinean a hebras opuestas del ácido nucleico y flanqueando la región de interés en el DNA molde. La reacción se lleva a cabo por un ciclo que incluye tres etapas: la

desnaturalización (el DNA de doble cadena se desnaturaliza por aumento de temperatura hasta que se disocia en cadenas sencillas), alineamiento de primers (hibridación del par de oligonucleótidos en su extremo 5' con la secuencia del segmento de DNA) y elongación o extensión de los primers alineados por una DNA polimerasa termoestable (Taq polimerasa), en dirección 5'-3'. Estas etapas se efectúan a una temperatura distinta en un termociclador y conforman un ciclo, cada ciclo puede repetirse en múltiples ocasiones, debido a que cada producto de elongación recién sintetizado sirve como templado para el próximo ciclo, dando como resultado un gran número de copias de DNA. Treinta ciclos amplifican varios millones de veces un DNA molde ( $2^{20}$ ). La mayor desventaja de este método es la posible incorporación de nucleótidos erróneos por la Taq polimerasa. La tasa de error calculada es del rango de  $10^{-4}$  nucleótidos por ciclo, por lo que es necesaria una secuenciación del DNA para corroborar que no hay mutación (Erlich, 1989).

### **Diseño de Oligonucleótidos**

La amplificación del gen de la Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa, por medio de PCR requirió el diseño y síntesis de oligonucleótidos. Estos se basaron en la secuencia del gen y la concentración de G+C y la  $T_m$  (Maxine, 1993). Se diseñaron moléculas de 20 nucleótidos, longitud adecuada para alineamiento específico. Los oligonucleótidos empleados tenían sitios de corte para enzimas de restricción, lo que facilitó la subclonación del gen en plásmidos. A continuación se muestra la secuencia de los oligonucleótidos:

### ***Forward (sentido)***



### ***Reverse (antisentido)***



### **Amplificación del gen por PCR**

El PCR se realizó con el kit de Boeringer Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System. La amplificación se efectuó en un termociclador Eppendorf Master Cycler. El producto de la reacción se corrió en geles de agarosa al 1% que se tiñeron con bromuro de etidio (EtBr), para después cortar la banda de interés y extraer el DNA utilizando el kit Marligen Rapid Extraction Gel System®.

### **Geles de agarosa para electroforesis de DNA**

La electroforesis es cuando moléculas cargadas son forzadas a ir a través de una matriz debido a un flujo de corriente eléctrica. Una molécula de DNA cortada con enzimas de restricción genera diferentes fragmentos. Estos pueden ser separados en base a su tamaño utilizando un gel de electroforesis.

Bajo condiciones fisiológicas los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos son ionizados y migrarán al electrodo positivo (ánodo) cuando se colocan en presencia de un campo eléctrico. La carga neta del DNA es negativa (por la presencia de los grupos fosfatos) lo que permite que migre del cátodo (electrodo negativo) al ánodo (electrodo positivo).

El DNA obtenido de purificaciones, restricciones, PCR, se corrió en geles de agarosa al 1% (P/V) diluido en buffer TBE (Tris-boratos 100 mM, EDTA 2 mM, pH=8.0) y Bromuro de Etidio (0.1mM). La muestra se cargó en el gel acompañada de un buffer acarreador. La electroforesis se efectuó a 110 Volts durante 40 minutos, una vez transcurrido ese tiempo se llevó al transiluminador de luz UV para observar el corrimiento y las bandas obtenidas.

### **Purificación de DNA a partir de fragmentos de gel de agarosa**

La recuperación de DNA a partir de fragmentos de geles de agarosa se llevó a cabo para recuperar el producto de PCR. Esta banda se extrajo y se digirió con enzimas de restricción adecuadas, al igual que los plásmidos de replicación y expresión, para después correr los productos de las digestiones y volver a purificar las bandas para realizar la ligación.

El kit Rapid Gel Extraction System de Marligen® permite la recuperación de DNA a partir de geles de agarosa. Se basa en la unión del DNA a una matriz de sílice, su lavado mediante el uso de buffers adecuados y su posterior elusión. La disolución de la agarosa a temperaturas relativamente bajas (55°C) se logra con NaI y el desprendimiento del DNA de ésta mediante la utilización de un buffer con alto contenido de sales. Posteriormente se agrega a la matriz de sílice montada en una columna (spin cartridge) y se incuba a temperatura ambiente para permitir la adsorción del DNA.

Una vez unido el DNA se procede a lavar con el buffer de lavado específico que contiene etanol. El DNA puro es eluido a través de la matriz con agua caliente.

### **Purificación del producto de PCR**

1. Se cortó con una navaja estéril la banda del gel de agarosa que correspondía al peso molecular del gen de la fructosa-1,6-bifosfato aldolasa.
2. El fragmento de DNA se colocó dentro de un tubo Eppendorf de 1.5, donde se le adicionaron 500µl de solución L1 (Buffer de solubilización).
3. Se incubó a 50°C durante 15 minutos, agitando en Vortex cada 5 minutos para disolver completamente el fragmento de gel de agarosa.
4. Una vez disuelta, la mezcla resultante se colocó dentro de una columna de lavado y se centrifugó a 12000rpm durante 1 minuto. Se desechó el sobrenadante.
5. A la misma columna de lavado, se le adicionaron 700µl de solución L2 (Buffer de lavado) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
6. Una vez transcurrida la incubación, se centrifugó a 12000rpm durante 1 minuto. Se desechó el sobrenadante.
7. La columna de lavado se colocó dentro de un tubo de recuperación de 1.5 y se le adicionaron 35µl de agua doble destilada precalentada a 65°C, después se incubó 2 minutos a temperatura ambiente.
8. La columna de lavado se centrifugó a 12000rpm durante 2 minutos.
9. El DNA purificado se corrió en un gel de agarosa al 1% y se tiñó con Bromuro de Etidio (EtBr).

## **Digestiones**

Las digestiones de DNA se llevaron a cabo para realizar tres tipos de actividades: 1) análisis de identidad por restricción, 2) recuperación del inserto y 3) ligación de plásmidos e insertos. Se hicieron reacciones de en un volumen total de 10 $\mu$ L con el buffer adecuado de la enzima de restricción, provisto por el fabricante. Las digestiones se realizaron en horno de microondas en 6 ciclos de 20 segundos con descansos de 2 minutos entre cada ciclo.

## **Ligaciones**

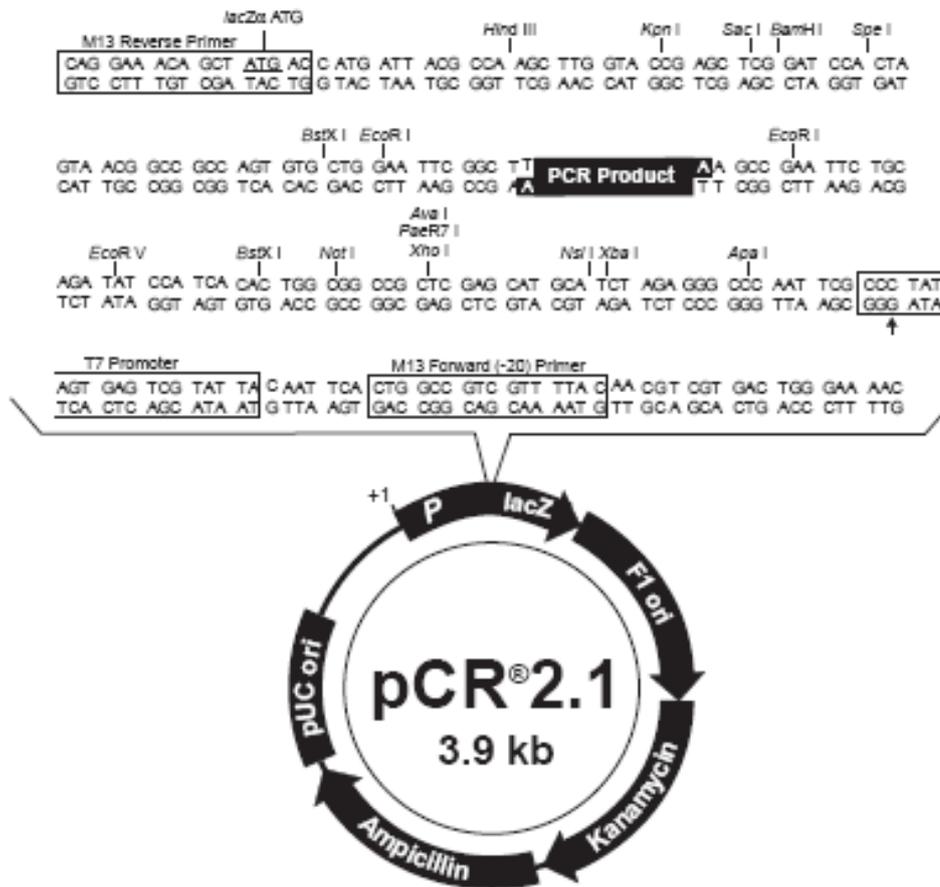
Se realizaron ligaciones del gen con plásmidos de replicación y expresión en varias ocasiones, siempre usando T4 DNA ligasa. Se realizaron reacciones de 10  $\mu$ L totales, utilizando el buffer adecuado para la ligasa, provisto por el fabricante. Se probaron distintas relaciones de cantidad inserto-plásmido para mejorar la eficiencia en el proceso. La reacción se incubó toda la noche a 16°C en termociclador.

## **Clonación en un vector de replicación**

Una vez purificado el producto del PCR, se llevó a cabo su clonación en el vector de replicación pCR 2.1 (TA Cloning® Kit de Invitrogene) (Fig.9). Este vector esta en forma lineal y contiene en sus extremos 5` y 3` residuos de desoxitimina (TT). Esta característica permite clonar fácilmente productos de PCR frescos que contienen en sus extremos residuos de desoxiadenina (AA). El vector pCR 2.1 posee además genes para resistencia a ampicilina y kanamicina como sistema de selección, el promotor *LacZ $\alpha$*  y en el *poli-linker* sitios de restricción para Eco R1, flanqueando el sitio de inserción del producto de PCR (Maniatis, 1982).

Estas características permiten la selección de clonas positivas, así como la recolección del inserto por restricción.

La reacción de ligación se incubó a 16°C toda la noche utilizando la ligasa T4 DNA ligasa. Posteriormente se transformaron células competentes de *E. coli* Top 10 con los productos de ligación, mismas que se plaquearon en cajas petri con medio Luria Bertani (LB) con ampicilina. La ampicilina selecciona a las clonas en las que se haya introducido el vector. La presencia del promotor LacZ.



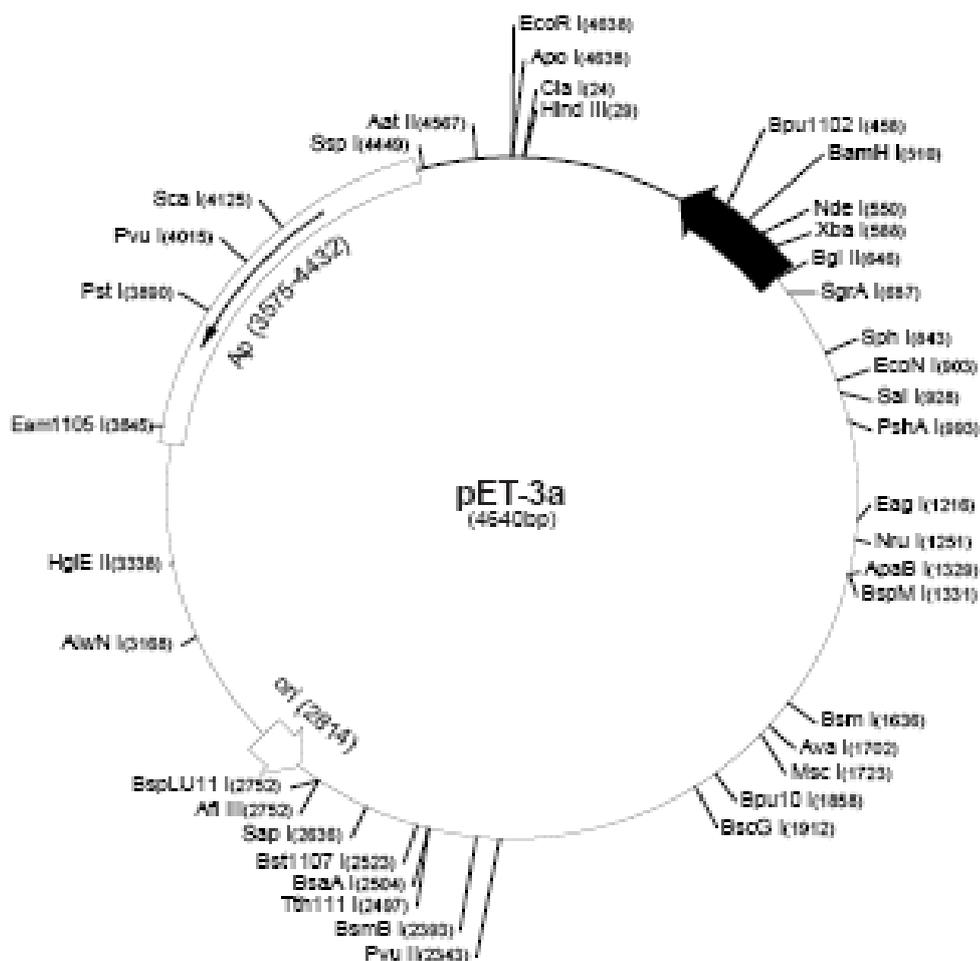
**Figura 9.** Vector de replicación pCR 2.1. El plásmido de 3.9 kb contiene el promotor *LacZα*, y genes de resistencia para kanamicina y ampicilina. En la zona del promotor se muestra una amplificación del sitio de clonación de los productos de PCR, los cuales se insertan por complementariedad de los residuos de AA con los residuos de TT del plásmido. Se observan los sitios de restricción para Eco R1 flanqueando el sitio de clonación del producto de PCR.

A las clonas obtenidas se les extrajo DNA utilizando el kit Rapid Plasmid Spin Miniprep de Marligen® y se realizó un ensayo de restricción utilizando las enzimas NdeI y BamHI. Las digestiones se corrieron en un gel de agarosa 1% y se confirmó la clonación del gen de la Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa de *Giardia lamblia* por la presencia del inserto liberado mediante corroboración del peso molecular.

## **Clonación en un vector de sobre-expresión**

La sobreexpresión de la enzima requiere de la clonación del gen en un vector de sobre-expresión. Para esto, se utilizó el vector pET 3a. El sistema de expresión pET (pET System de Novagen) (Fig.10), ha sido desarrollado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Los genes de interés son clonados en el vector pET y se transforman en la cepa BL21/DE3pLysS, que contiene una copia cromosómica del gen de la RNA polimerasa del fago T7. Este gen se encuentra bajo el control del promotor LacUV5, que a su vez es inducido por IPTG. La cepa de *E. coli* utilizada contiene además un plásmido pLysS que codifica para la lisozima del fago T7, la cual inhibe a la T7 RNA polimerasa. De esta manera puede haber una expresión controlada del gen clonado en el plásmido pET 3a, pudiéndose expresar éste de manera cuantitativa sólo con la presencia del inductor IPTG. La lisozima producida por la cepa, digiere además la pared celular facilitando el rompimiento de las células durante la purificación de la proteína de interés.

El gen de la Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa de *Giardia lamblia* se clonó con sitios de restricción para NdeI y BamHI, tanto el plásmido como el inserto se digirieron con las enzimas de mencionadas y se corrieron en un gel de agarosa al 1%, las bandas se cortaron, se purificaron con el kit Miniprep Rapid Plasmid de Marligen, para posteriormente ligar el inserto con el plásmido utilizando la enzima T4 DNA ligasa.



**Figura10.** Sistema de expresión PET en *E. coli* BL21DE3/pLysS, la cepa BL21DE3/pLysS contiene una copia cromosómica del gen de la RNA polimerasa del fago T7. Este gen se encuentra bajo el control del promotor LacUV5, que a su vez es inducido por IPTG. La cepa de *E. coli* utilizada contiene además un plásmido pLysS que codifica para la lisozima del fago T7, la cual inhibe a la T7 RNA polimerasa. De esta manera puede haber una expresión controlada del gen clonado en el plásmido pET 3<sup>a</sup>, pudiéndose expresar este de manera cuantitativa sólo con la presencia del inductor IPTG.

El producto de la reacción de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* BL21/DE3pLysS y se plaquearon en cajas petri con medio LB y ampicilina. Una vez obtenidas las colonias, se extrajo DNA con el kit Rapid Plasmid Spin Miniprep de Marligen. El DNA purificado se digirió con las enzimas correspondientes, Bam HI y NdeI, para comprobar la presencia del

inserto, corriéndolo en un gel de agarosa al 1% y analizando los patrones de bandas obtenidas contra lo esperado, utilizando el marcador de peso molecular de 1 Kb plus DNA ladder marca Invitrogen.

#### Clonación en pCR 2.1

Producto de PCR fresco	2 $\mu$ l
Vector pCR 2.1 (25 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Buffer de ligación (10X)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O destilada	5 $\mu$ l
T4 DNA ligasa (4 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Volumen total	<hr/> 10 $\mu$ l

#### Clonación en pET 3<sup>a</sup>

Producto de PCR fresco	5 $\mu$ l
Vector TcTIM (pET 3a)	1 $\mu$ l
Buffer T4 DNA ligasa (10X)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O destilada	2.2 $\mu$ l
T4 DNA ligasa (4 U/ $\mu$ l)	0.8 $\mu$ l
Volumen total	<hr/> 10 $\mu$ l

## **Secuenciación de las clonas positivas**

Se purificó DNA de las clonas positivas y se mandó secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México para confirmar que correspondía efectivamente al gen de la Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa de *Giardia lamblia*, así como para comprobar que no había errores en otras partes de la secuencia.

## **Preparación de células competentes y transformación**

Las células competentes se prepararon por incubación en buffers con rubidio y calcio para la modificación de la membrana celular. Un cultivo de 200  $\mu$ l y  $A_{600nm}$  de aproximadamente 0.6 se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. El botón celular se resuspendió en 80  $\mu$ l de buffer TFB I ( $CH_3COOK$  30 mM,  $MnCl_2$  50 mM,  $RbCl$  100mM,  $CaCl_2$  10 mM, glicerol12% (V/V); pH final 5.8) y se incubó en hielo por 2 horas. Posteriormente, las células se volvieron a centrifugar y el botón se resuspendió en 8  $\mu$ l de buffer TFB II ( $MOPS$  10 mM pH= 7.0,  $CaCl_2$  75 mM,  $RbCl$  10 mM, glicerol12% V/V) incubando en hielo durante 1 hora. Toda la técnica se realiza en condiciones de esterilidad. Se prepararon células competentes de la cepa Clona 13\* (López *et al*, 2004), realizando los controles respectivos para determinar la eficiencia de transformación con DNA previamente purificado.

La transformación de células competentes se realizó de la siguiente manera: las células competentes se mezclaron con el plásmido y se incubaron por 30 minutos en hielo para permitir la transformación. Se prosiguió con la aplicación de un choque térmico incubando las células a 42°C durante 40 segundos, lo que permite el cierre de los poros membranales y evita la pérdida del plásmido. Posteriormente, se agregó 1 ml de medio LB fresco y se incubó a 37°C durante 1 hora para

permitir la recuperación de las células. Después de centrifugar y resuspender el botón celular en un volumen pequeño de medio LB se plaquearon cajas petri con LB y ampicilina (100mg/) para obtener las colonias de células transformantes.

### **Purificación de DNA a partir de placas y cultivos bacterianos**

Esta actividad se realizó con diferentes colonias de células obtenidas después de las transformaciones con los productos de ligación, utilizando el kit Miniprep Rapid Plasmid de Marligen®. Éste kit se basa en la lisis alcalina de células bacterianas, seguida de la adsorción del DNA en una matriz de sílice en la presencia de altas concentraciones de sal y su posterior lavado y elusión. Las bacterias son lisadas con un buffer alcalino y el lisado es subsecuentemente neutralizado y ajustado a una alta concentración de sales que permiten la unión del DNA a una matriz de sílice montada en una columna (spin cartridge). Las endonucleasas y sales son eliminadas con lavados utilizando el buffer de lavado que contiene etanol, para luego eluir el DNA con agua caliente o un buffer de baja fuerza iónica.

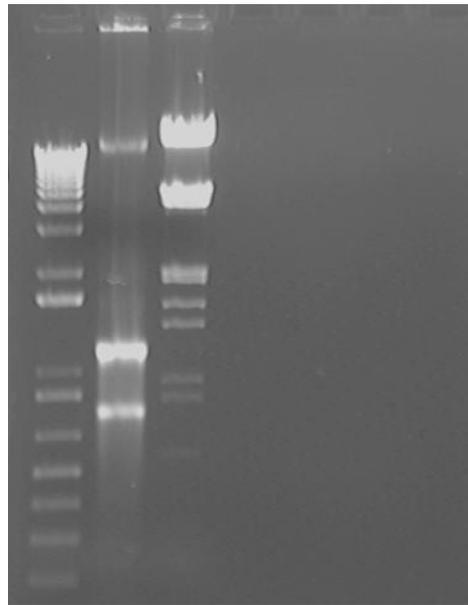
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este proyecto se logró aislar DNA genómico de trofozoítos de *Giardia lamblia*, también se logró identificar el gen de la Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa, obtenido del GenBank (número de acceso XM\_774313), permitiendo así diseñar los oligonucleótidos específicos para amplificar el gen.

Mediante PCR se amplificó el gen codificante para la Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa de *Giardia lamblia*, con el objetivo de clonarlo. Para comprobar que el producto amplificado obtenido era el deseado, se realizaron análisis de restricción mediante la digestión con las enzimas de restricción NdeI y Bam HI, donde ambas siguieron el patrón de corte mostrado en el mapa virtual de restricción. El producto obtenido, fue secuenciado y comprobado, cumpliéndose así el objetivo central de este trabajo.

El gen codificante para la Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa se introdujo en un vector de replicación pCR 2.1, que se caracteriza porque permite clonar fácilmente productos de PCR frescos que contienen en sus extremos residuos de desoxiadenina (AA), eso facilitó la subclonación, misma que se realizó introduciendo el gen codificante en un vector de sobreexpresión pET 3<sup>a</sup>, con el fin de poder sobreexpresar la proteína en bacterias y generar una enzima recombinante, que posteriormente se pueda purificar y caracterizar.

Como paso inicial, se llevó a cabo la extracción del DNA genómico de *G.lamblia* a través del método fenol-cloroformo. En la figura 11 se muestra el gel de agarosa con el corrimiento electroforético del DNA genómico de *G.lamblia* a través del método fenol-cloroformo y así obtener el gen de interés.



**Figura 11.** Gel de agarosa con el corrimiento de la purificación de DNA genómico de *G. lamblia*.

En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular, en el carril 2 se observa una muestra de DNA humano y en el carril 3 se observa gDNA de *G. lamblia*.

### **Identificación del gen**

La secuencia nucleotídica del gen de la fructosa-1,6-bifosfato aldolasa de *Giardia lamblia*, ya ha sido reportada por Mc Arthur et al., (2005), en la base de datos del proyecto genoma de *Giardia lamblia*, sin embargo no existen datos acerca del uso de esta enzima como blanco para el diseño de fármacos anti-giardíasicos. La Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa de *Giardia lamblia* se agrupa con las aldolasas clase II (metaloenzimas) en los análisis filogenéticos reportados por Sánchez et al., (2002). Esta clase de enzimas requieren de un metal divalente ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) como cofactor para llevar a cabo su actividad y se localizan en bacterias, hongos y algunos protozoarios (Imanaka, et al., 2002).

A continuación se muestra la secuencia completa del gen y la secuencia de aminoácidos correspondiente a la enzima.

### **Secuencia del gen de FBPA de *Giardia lamblia* 972 Pb**

Número de acceso al GenBank XM\_774313

```
atgcctctct gcaactctgag acagatgctc ggggaagccc gcaagcacia gtatggggtt
ggcgccttca acgtcaacia catggagcaa atccagggga tcatgaaggc tgtagtccag
ttgaagtgcg ccgttatact acagtgctcg cgcggagccc tcaagtattc cgacatgata
tacctcaaga aactttgcga ggccgcctta gaaaagcacc cagacatccc tatctgcatc
caccttgacc acggcgatac cctggagtcc gtgaagatgg cgatcgatct gggcttctcc
tccgtcatga ttgatgcatc gcaccacccg ttcgatgaga acgtaaggat caccaaggag
gtcgtcgcct acgcccattg acgagggctc agcgtggagg ctgaacttgg gactctcggc
gggattgagg aggatgtgca gaacaccgtt cagctcaccg agccgcagga tgccaagaag
tttgtcgagc tgacgggcgt tgatgccctt gccgttgcaa taggaaccag ccatggcgca
taciaaattca aatccgaatc agatattcgc ctcgccattg accgcgtgaa gacgatttca
gaccttactg gcatcccgtt ggtcatgcac ggctcctctt ctgtgcccaa ggacgtcaag
gatatgatca acaagtatgg cgggaagatg cctgatgcgg tcggtgtccc catcgagtcc
atcgtgcacg caataggcga aggggtttgc aagatcaacg tcgacagtga ctccaggatg
gccatgacag gggcaatccg caaagtcttt gttgagcatc ccgagaaatt cgacccgcgc
gattacctcg gcccggtcgc tgatgccata accgagatgc tcatccctaa gatcaaggcc
ttcggatctg caggccatgc cggagactac aaagttgtga gccttgagga agccaaggca
tggtacaagt aa
```

## Secuencia de aminoácidos

MPLCTLRQMLGEARKHKYGVGAFNVNNMEQIQGIMKAVVQLKSPVILQCSRGAALKYSDMIYLKKLCEAALE  
KHPDIPICIHLDHGDITLESVKMAIDLGFSSVMIDASHHPFDENVRITKEVVAYAHARGVSVEAELGTLGGIEED  
VQNTVQLTEPQDAKKFVELTGVDALAVAIGTSHGAYKFKSEDIRLAIDRVKTISDLTGIPLVMHGSSSVPKD  
VKDMINKYGGKMPDAVGVPIESIVHAIGEGVCKINVSDSRMAMTGAIKRVFVEHPEKFDPRDYLGPGRDAI  
TEMLIPKIKAFGSAGHAGDYKVVVSLEEAKAWYK

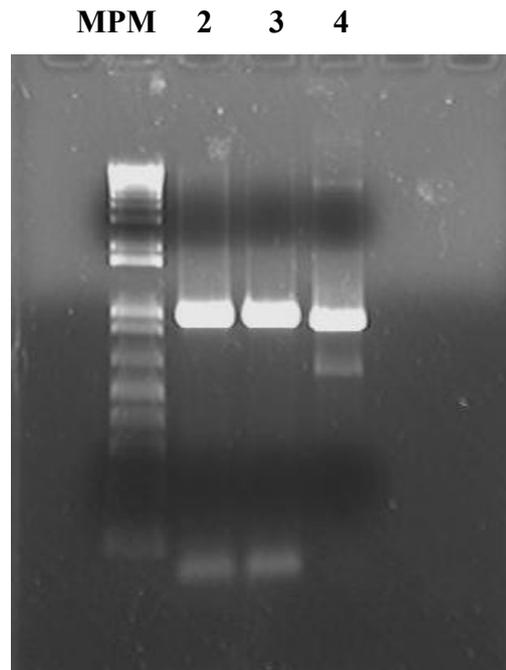
La secuencia obtenida constituyó el gen completo que codifica para 324 aa y corresponde a un P.M. de 35,213.7 Da. De la secuencia de aminoácidos de la Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa de *Giardia lamblia*, se calculó un punto Isoeléctrico de 6.19, muy semejante al de la Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa de *E. coli* 6.5.

El análisis de secuenciación y la comparación de dicha secuencia con la de otros organismos indicó que es una aldolasa clase II que requiere metal para su actividad y un dato importante es que la característica de ésta enzima no se encuentra en la Aldolasa de humanos.

## Amplificación del gen

Se amplificó el gen que codifica para FBPA de *Giardia lamblia* a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como templado el DNA genómico de *G. lamblia* y los

oligonucleótidos descritos en la sección de material y métodos. En la figura 12 se muestra el gel de agarosa con el corrimiento electroforético de los productos de amplificación de PCR realizado para obtener el gen de la Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa de *Giardia lamblia* de 972 pb, también aparece el producto de PCR del gen de *GTIM* de 774 pb que fue utilizado como control positivo para verificar que el sistema de PCR estuviera funcionando correctamente.

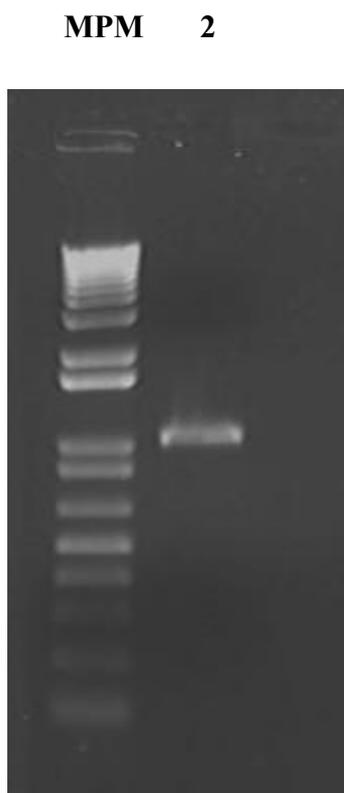


**Figura12.** Gel de agarosa al 1% con el corrimiento del producto de PCR correspondiente al gen de la fructosa-1,6-bifosfato aldolasa amplificado mediante PCR. Las condiciones del PCR fueron descritas en material y métodos. MPM, marcador de peso molecular 1Kb plus, carriles 2 y 3 fragmento amplificado con un peso molecular de 972 pb y carril 4, control positivo, gen de la triosafosfato isomerasa de *G. lamblia* con un peso de 774 pb.

El peso molecular del producto de PCR coincide con el tamaño del gen determinado a partir de la secuencia de proteínas homólogas.

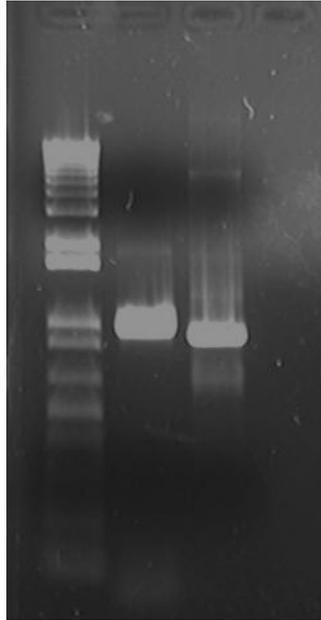
## Ligaciones y Digestiones

Se realizaron digestiones tanto del plásmido como del inserto para llevar a cabo la reacción de ligación, esto es con el fin de introducir el gen codificante en los vectores de replicación y de expresión.



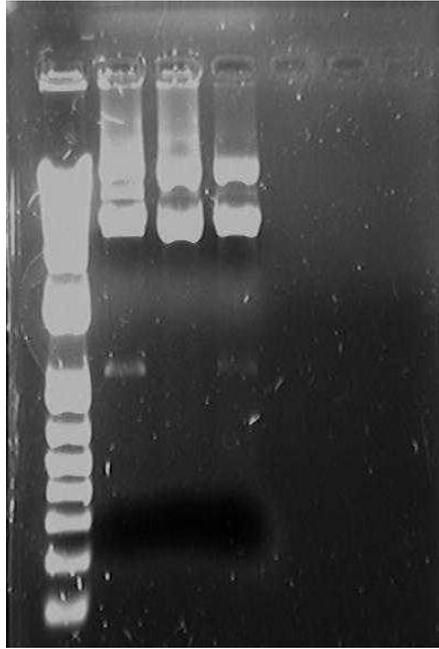
*Figura 13.* Gel de agarosa al 1% (P/V) con el corrimiento del gen de a partir de la digestión con BamHI y NdeI del plásmido con el gen inserto.

La banda de DNA digerido se cortó y se purificó con el kit Miniprep Rapid Plasmid de Marligen® (Fig.15). El primer carril muestra el marcador de peso molecular de 1Kb y el segundo carril muestra el inserto ya digerido y purificado, listo para ligarse con T4 DNA ligasa y subclonarse en el vector de expresión pET 3a.

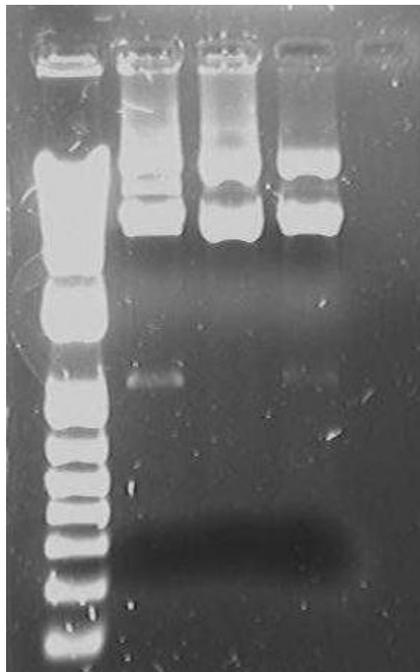


**Figura 14.** Gel de agarosa al 1% (P/V) con el corrimiento del gen de fructosa -1,6-bifosfato aldolasa y como control triosafosfato isomerasa, ambos de *giardia lamblia*, para comprobar diferencias en el peso molecular de cada uno, 972 y 774 pb respectivamente.

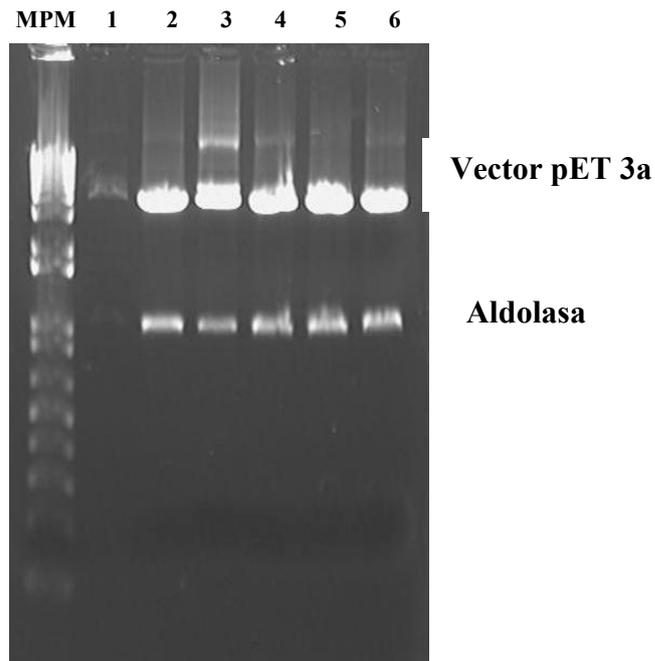
Las bandas de DNA digerido se cortaron, se purificaron con el kit Miniprep Rapid Plasmid de Marligen® y se ligaron con T4 DNA ligasa. En el primer carril se observa el estándar de peso molecular de 1Kb plus. En el segundo carril y cuarto carril se observa la presencia del inserto de 972 pb del gen de la fructosa-1,6-bifosfato aldolasa de *Giardia lamblia*.



**Figura 15.** Gel de agarosa al 1% (P/V) con el corrimiento de las digestiones del plásmido pET 3a y el gen de la *digeridos* con BamHI y NdeI.



**Figura 16.** Gel de agarosa al 1% con el corrimiento de las digestiones de plásmido pCR 2.1 y el gen de la fructosa -1,6- bifosfato aldolasa *digeridos* con Bam HI y NdeI.



**Figura 17.** Gel de agarosa al 1% con el corrimiento de las digestiones de plásmido pET 3a y el gen de la fructosa -1,6- bifosfato aldolasa digeridos con Bam HI y NdeI.

Las bandas de DNA digerido se cortaron y se purificaron con el Kit Gel Extraction System de Marligen y se ligaron con T4 DNA ligasa. El en primer carril se observa el marcador de peso molecular 1Kb Plus y los carriles siguientes (1-6), muestran el inserto que contiene el gen con un peso esperado de 972 pb.

Las clonas que presentaron un inserto de aproximadamente 972 pb, tamaño del gen de la Aldolasa, se seleccionaron para secuenciar el DNA.

Las bandas de DNA digerido se cortaron y se purificaron con el Kit Gel Extraction System de Marligen y se ligaron con T4 DNA ligasa. El en primer carril se observa el marcador de peso

molecular 1Kb Plus y los carriles siguientes (2, 3 y 4), muestran el inserto que contiene el gen con un peso esperado de 972 pb.

## **EXPERIMENTOS ADICIONALES**

Con los resultados obtenidos se realizaron algunos experimentos que contribuirán a establecer las condiciones de sobreexpresión de la enzima recombinante posteriormente.

### **Sobreexpresión de la enzima**

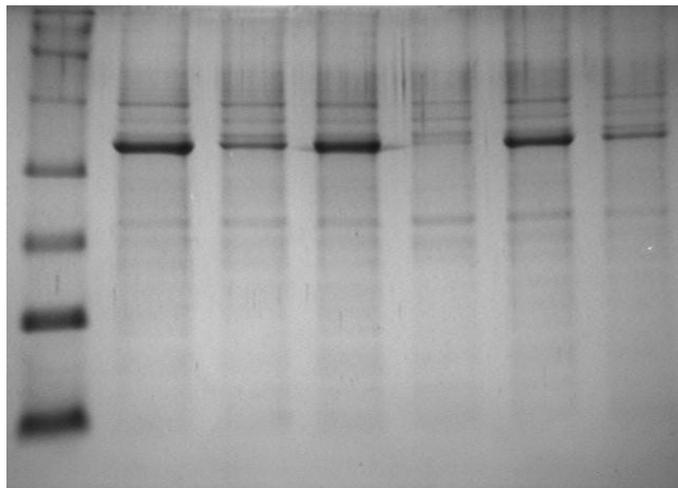
A un cultivo fresco con una  $Abs_{600nm}$  de entre 0.8 y 1.0 de absorbancia, se le adicionó el inductor IPTG a una concentración que se estableció por titulación de diferentes concentraciones de IPTG, incubándolo a 18, 30 y 37°C con agitación continua durante 12 horas. Se eligió la temperatura a la que hubo mejor expresión de proteína recombinante.

### **Obtención del extracto total**

El cultivo inducido con IPTG, se centrifugó (2500 rpm, a 4°C, durante 10 minutos), el botón celular resultante se resuspendió en 12.5ml del buffer de lisis que contenía Tris 50mM y Glicerol al 5% a pH= 7.4, PMSF 0.2mM (como inhibidor de proteasas) en DMSO al 1% y DTT 2mM. Las células se rompieron por sonicación en frío, en 6 ciclos de 20 segundos con descansos de 2 minutos entre cada ciclo, evitando el aumento de temperatura de la muestra.

## Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

La calidad de la sobre-expresión para las diferentes temperaturas de la enzima se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) usando el método de Von Jagow. Se corrieron distintas concentraciones de proteína en cada caso disueltos en una disolución desnaturalizante que contiene SDS. Los geles se corren a 90 V durante 30 minutos/ 180 V, 2 horas; se tiñeron con azul de Coomassie R-250 en ácido acético, isopropanol por 2 minutos en horno de microondas y se destiñeron en agua también en horno de microondas con ciclos de 5 minutos (Fig. 18).



**Figura 18.** Gel de acrilamida con sobreexpresión de la enzima 0.4mM de iptg a diferentes temperaturas a) 18°C, b) 30°C y c) 37°C.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se logró amplificar, clonar y sobreexpresar el gen codificante para la fructosa -1,6-bifosfato aldolasa, con el objetivo de generar información que permita generar la enzima recombinante fructosa-1,6-bifosfato aldolasa de *Giardia lamblia*.

Acerca del tratamiento de la giardiasis, en los últimos años ha habido una intensa investigación en el estudio de proteínas que poseen características específicas que existen exclusivamente en el parásito pero no se encuentran en los humanos, con el fin de desarrollar agentes terapéuticos selectivos. Actualmente la tecnología de ADN permite estudios avanzados que facilitan la comprensión de proteínas en cuanto a su expresión, estructura y función.

La aplicación de los procedimientos de caracterización molecular por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han contribuido enormemente en la comprensión de la estructura genética de *Giardia lamblia* y la epidemiología molecular de las infecciones.

La obtención de información en éste tema tiene como objetivo desarrollar herramientas que permitan desarrollar técnicas eficientes que promuevan la purificación y caracterización efectiva de la enzima recombinante fructosa-1,6-bifosfato aldolasa de *Giardia lamblia*, que a su vez den la pauta para llevar a cabo una inhibición especie-específica de la enzima y el posterior diseño de fármacos antiparasitarios efectivos.

El avance en todos estos aspectos acelerará la búsqueda de la cura terapéutica para esta parasitosis.

## REFERENCIAS

1. **Adam RD.** (2001) Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews* 55:706-732.
2. **Addis D, David P, Roberts JM, Mast E.** (1992). Epidemiology of Giardiasis in Wisconsin: increasing incidence of reported cases and unexplained season trends. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 47: 13-9.
3. **Alparo Herrera Indira.** (2005) Giardiasis y desnutrición *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría.* 44 (3): 166 - 73.
4. **Boreham PFL.** (1991) Giardiasis and its control. *Pharmacology Journal.* 234: 271-274.
5. **Boreham PF, Upcroft JÁ, Upcroft P.** (1990) Changing approaches to the study of *Giardia* epidemiology: 1681-2000. *International Journal for Parasitology.* 20:479-87.
6. **Blom N. S., Te'treault, St., Coulombe, R., and Sygusch, J.** (1996) Novel active site in *Escherichia coli* fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Nature Structure Biology.* 3, 856–862.
7. **Buchel, L. A., A. Gorenflot, C. Chochillon, J. Savel, and J. G. Gobert.** (1987) In vitro excystation of *Giardia* from humans: a scanning electron microscopy study. *Journal of Parasitology* 73: 487–493.
8. **Cedillo R., Leal Y., Yépez M. L., Gómez D. A., Ortega P. G., Tapia C. R. y Muñoz O.** (2009) Seroepidemiology of Giardiasis in Mexico. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 80(1), pp. 6-10.
9. **Cervantes P. A., López L. M.** (1997) Aplicación de las técnicas de biología molecular en el estudio del genoma humano y en el diagnóstico de las enfermedades hereditarias. *Revista Médica del Hospital General de México.* SS. 60:196-250.

10. **Díaz C. M., Ballesteros V. MN., Pérez M. R., Mata H. V.** (2002) Impacto de la dieta sobre la inducción de infección con quistes de *Giardia lamblia* en ratas Sprague-Dawley. *Salud Pública México*. 44:315-322.
11. **Edwards MR, Gilroy FV, Fimenez BM, O'sullivan WF** (1989) Alanine is a major end product of metabolism by *Giardia lamblia*: a proton nuclear magnetic resonance study. *Molecular Biochemical Parasitology* 37:19-26.
12. **Enríquez-Flores S.** (2005) Reactividad de los residuos de cisteínas de la Triosafosfato isomerasa de *Giardia lamblia* a agentes derivatizantes específicos de cisteína. Tesis. Facultad de Ciencias, UNAM. 50 pp.
13. **Enriquez F. S., Rodriguez. R. A., Hernandez A. G., De la Mora I., Gutiérrez C. P., Carvajal K., López V. G. and Reyes V. H.** (2008) Species-specific inhibition of *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase by localized perturbation of the homodimer. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Volume 157, Issue 2, February Pages 179-186.
14. **Erlich H. A. ed.** PCR technology. Principles and aplicaciones for DNA amplification. Stockton Press, E.U., 1989.
15. **Escobedo A., Almirall P., Cimerman S.** (2007) Actualidades en la terapéutica en giardiasis *Revista Panamericana de Infectología*. 9(2):41-46
16. **Farthing M. J.** (1996) Giardiasis. *Gastroenterology Clinic North America*. 25(3):493-515
17. **Farthing MJ.** (1997) The molecular pathogenesis of Giardiasis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 24:79-88.
18. **Feely, D. E., J. V. Schollmeyer, and S. L. Erlandsen.** (1982) *Giardia spp.*: Distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Experimental Parasitology*. 53:145–154.

19. **Garza R. G., Pérez M. R., Rojo D. A., Tuena de Gómez P. M., Gómez P. A.** (1996) Species-specific inhibition of homologous enzymes by modification of nonconserved amino acids residues. The cysteine residues of triosephosphate isomerase. *European Journal of Biochemistry*. 241: 114-120.
20. **Gardner B. and D. R. Hill.** (2001) Treatment of Giardiasis. *Clinical Microbiology Review*. 14(1): 114 - 128.
21. **GenBank** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
22. **Gillin F. D., and L. S. Diamond.** (1981) *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. *Experimental Parasitology*. 52: 9-17.
23. **Gillin F. D., and D. S. Reiner.** (1982) Attachment of the flagellate *Giardia lamblia*: role of reducing agents, serum, temperature and ionic composition. *Molecular and Cellular Biology* 2: 369-377.
24. **Gillin F. D., D. S. Reiner and S. E. Boucher.** (1988) Small-intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* in vitro. *Infection and Immunity*. 56: 705-707.
25. **Gómez P. A., Saavedra L. E., Becker I., Zubillaga R., Rojo D. A., Pérez M. R.** (1995) Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action- studies with triosephosphate isomerase. *Chemistry & Biology*. 2: 847-855.
26. **Götz F., et al.** (1980) Purification and characterization of an unusually heat-stable and acid/base stable class I fructose-1,6-biphosphate aldolase from *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Biochemistry*. 108, 295-301.
27. **Henze K., Morrison H. G., Sogin M. L., and Müller M.** (1998) Sequence and phylogenetic position of a class II aldolase gene in the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *Gene*. 222: 2, 163–168.
28. **Heresi G, Cleary TG.** (1997) *Giardia*. *Pediatric in Review*. 18:243- 7.

- 29. Hetsko, M. L., J. M. McCaffery, S. G. Svaärd, T. C. Meng, X. Que, and F. D. Gillin.** (1998) Cellular and transcriptional changes during excystation of *Giardia lamblia* in vitro. *Experimental Parasitology*. 88:172–183.
- 30. Hunter, W. H.** (1997) A structure-based approach to drug discovery; crystallography and implications for the development of antiparasite drugs. *Parasitology*. 114:517-529.
- 31. Imanaka H., et al.** (2002) Gene Cloning and Characterization of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94:3, 237-243.
- 32. Jarroll EL, Muller PJ, Meyer EA, Morse SA** (1981) Lipid and carbohydrate metabolism in *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2:187–196
- 33. Kim H., Certa U., et al.** (1998) Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry*. 37, 4388-4396.
- 34. Lindmark DG.** (1980) Energy metabolism of the anaerobic protozoan *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1:1-12
- 35. López V. G., Molina O. D., Cabrera N., Hernández A. G., Pérez M. R., Reyes V. H.** (2004) An unusual trisephosphate isomerase from the early divergent eukaryote *Giardia lamblia*. *Proteins: Structure, function and Bioinformatics*. 55, 824-834.
- 36. Lujan, Hugo D.** (2006) *Giardia* y giardiasis. *Medicina (B. Aires)*, vol.66, no.1, p.70-74.
- 37. Luján HD, Mowatt MR, Nash TE.** (1997) The mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiology and Molecular Biology Review*; 61: 294-304.
- 38. Luján, H.D, Mowatt MR, Nash TE.** (1997) The molecular mechanisms of *Giardia* encystation. *Parasitology Today*; 14: 446-50.
- 39. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J.** *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, E.U., 1982.

40. **Marsh J. J., and Leberz H. G.** (1992) Fructose-bisphosphate aldolases: An evolutionary history. *Trends in Biochemistry Science*. 17, 110–113.
41. **Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR.** (1997) Waterborne Protozoan Pathogens. *Clinical Microbiology Review*. 10(1):67-85.
42. **Margulis L., Corliss., Melkonian.** (1989) Handbook of protoctista. The Jones and Bartlett Publishers, USA, 914 pp.
43. **Maxine S.** Genes y Genomas. 3<sup>a</sup> ed. España: Omega S.A., 1993.
44. **McArthur AG, Morrison HG, Nixon JE, Passamaneck NQ, Kim U, Hinkle G, Crocker MK, Holder ME, Farr R, Reich CI, Olsen GE, Aley SB, Adam RD, Gillin FD, Sogin ML.** (2005). The Giardia genome project database. *FEMS Microbiology Letters*.
45. **Minenoa Tomoko and Mitchell A. Avery** (2003) Giardiasis: Recent Progress in Chemotherapy and Drug Development. *Current Pharmaceutical Design*. 9, 841-855
46. **Moolasart P.** (1999) *Giardia lamblia* in AIDS patients with diarrhea. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 82: 654-659
47. **Oberhuber G, Stolte M.** (1990) Giardiasis: analysis of histological changes in biopsy specimens of 80 patients. *Journal of Clinical Pathology*. 43:641-3.
48. **Payapvipapong P.** Self-reliance of the IP from parasite control to preventive health. In *Collected Papers on the Control of Soil-Transmitted Helminthiases Volume V*. Edited by: Yokogawa VM, Hayashi S, Kobayashi A, Kagei N, Kunii C, Hara T. Tokyo, Japan , The Asian Parasite Control Organization; 1993:318-323.
49. **Penhoet E. E, Kochman M, Rutter W.J.** (1969) Molecular and catalytic properties of human aldolase C. *Biochemistry*. 8, 4396-4402.
50. **Petri W.** (2003) Therapy of intestinal protozoa. *Trends in Parasitology*; 19: 523-6.

- 51. Quihui L, Valencia ME, Crompton DW, Phillips S, Hagan P, Morales G, Diaz-Camacho SP.** (2006) Role of the employment status and education of mothers in the prevalence of intestinal parasitic infections in Mexican rural schoolchildren. *BMC Public Health* 6: 225–232.
- 52. Reiner, D. S., M. McCaffery, and F. D. Gillin.** (1990) Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *European Journal of Cell Biology*. 53:142–153.
- 53. Reiner, D. S., H. Douglas, and F. D. Gillin.** (1989) Identification and localization of cyst-specific antigens of *Giardia lamblia*. *Infection and Immunity*. 57: 963– 968.
- 54. Reyes Vivas H., Díaz A., Peón J., Mendoza Hernández G., Hernández Alcántara G., De la Mora De la Mora I, Enríquez Flores S, Domínguez R. L, López V. G.** (2007) Disulfide bridges in the mesophilic triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* are related to oligomerization and activity. *Journal of Molecular Biology*. 365(3):752-63
- 55. Saavedra Lira, E., Ramirez Silva, L., and Pérez Montfort, R.,** (1998). Expression and Characterization of recombinant pyruvate phosphate dikinase from *Entamoeba histolytica*. *Biochemistry and Biophysics Acta*. 1382, 47-54.
- 56. Sagebiel D, Weitzel T, Stark K, Leitmeyer K.** (2009) Giardiasis in kindergartens: prevalence study in Berlin, Germany 2006. *Parasitology Research*.
- 57. Sánchez Lidya, David S. Horner, Dorothy V. Moore, Katrin Henze, T. Martin Embley, Miklós Müller.** (2002) Fructose-1,6-bisphosphate aldolases in amitochondriate protists constitute a single protein subfamily with eubacterial relationships. *Gene*. 295: 51-59.
- 58. Schofield P. J., Edwards M. R.,** (1991) Glucose metabolism in *Giardia intestinalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 45:11, 39-47.

- 59. Secretaria de Salud.** (2007). Distribución de los casos nuevos de enfermedades por grupo de edad. Población general último anuario de morbilidad en línea. México: CENAVECE disponible en <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
- 60. Siebers B., Brinkmann, Dörr, C., et al.** (2001) Archaeal fructose-1,6-bisphosphate aldolases constitute a new family of archaeal type class I aldolase. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 28710-28718.
- 61. Siebers B., Lorentzen E.** (2003) Crystal structure of an Archaeal Class I Aldolase and the evolution of  $(\beta\alpha)_8$  Barrel Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 47, 47253-47260.
- 62. Snel SJ, Baker MG, Venugopal K.** (2009) The epidemiology of giardiasis in New Zealand, 1997-2006. *New Zealand Medical Journal*. 122(1290):62-75.
- 63. Sogin, ML, Gunderson JH, Elwood HJ, Alonso RA, Peattie DA.** (1989) Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science*; 243: 75-7.
- 64. St. Jean M., Sygush J.** (2005) High resolution reaction intermediates of rabbit muscle Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 29, 27262-27270.
- 65. Sullivan PB, Lunn PG, Northrop-Clewas CA, Farthing MJ.** (1992) Parasitic infection of the gut and protein losing enteropathy. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 15:404-7.
- 66. Takahashi M, Katayama Y, Takada H, Hirakawa J, Kuwayama H.** (2001) Silent infection of *Giardia lamblia* causing bleeding through vitamin K malabsorption. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 16:1171-2.
- 67. Thompson RCA.** (2000) Giardiasis as a re-emerging disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol*; 30: 1259-67.

- 68. Thompson RCA Monis PT.,** (2004). Variation in *Giardia*: Implications for taxonomy and epidemiology. *Advances in Parasitology*. 58: 69-137. 6.
- 69. Tovar J., Leon Avila G, Sánchez, L.B.** (2003) Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*. 426(6963):172-6.
- 70. Uribarren Berrueta Teresa** (2008). *Giardiasis*. Departamento de microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Disponible en <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/protozoos/giardosis.php>
- 71. Upcroft, J.A., Upcroft P., and Boreham P.F.L.** (1990) Drug resistance in *Giardia intestinalis*. *International Journal for Parasitology*. 20: 4: 489-496.
- 72. Upcroft JA., Upcroft P.** (1993) My favorite cell: *Giardia*. *Bioessays*. 20:256-263.
- 73. Upcroft P., Upcroft JA** (2001) Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 14 (1), pp. 150-64.
- 74. Varela Gustavo.** (2000). Fisiología y metabolismo bacteriano; Temas de Bacteriología y Virología Médica. Pág. 23-36.
- 75. Witke C.** (1993) Cloning, sequencing and characterization of the gene encoding the class I fructose-1,6-biphosphate aldolase from *Staphylococcus carnosus*. *Journal of Bacteriology*. 175, 7495-7499.
- 76. Yeltman D., Harris B.,** (1977) Purification and characterization of aldolase from human erythrocytes. [Biochemistry Biophysics Acta](#). 484(1):188-98.