



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL *IN VITRO* E *IN SITU* DE LAS
MUTANTES SENCILLAS Y MÚLTIPLES DE CISTEÍNAS DE LA TRIOSAFOSFATO
ISOMERASA DE *GIARDIA LAMBLIA***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

FERNÁNDEZ LAINEZ CYNTHIA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GABRIEL LÓPEZ VELÁZQUEZ

INSTITUTO NACIONAL DE PEDITRÍA, SSA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARIETTA TUENA SANGRI

INSTITUTO DE FIOLOGÍA CELULAR, UNAM

DRA. MARCELA VELA AMIEVA

INSTITUTO NACIONAL DE PEDITRÍA, SSA

MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 07 de noviembre de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **FERNÁNDEZ LAINEZ CYNTHIA** con número de cuenta **98012509**, con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL *IN VITRO* E *IN SITU* DE LAS MUTANTES SENCILLAS Y MÚLTIPLES DE CISTEÍNAS DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE *Giardia lamblia*"**, realizada bajo la dirección del **DR. GABRIEL LÓPEZ VELÁZQUEZ**:

Presidente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Vocal: DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO
Secretario: DRA. MARIETTA TUENA SANGRI
Suplente: DR. SERGIO ENRÍQUEZ FLORES
Suplente: DRA. MARCELA BEATRIZ VELA AMIEVA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 30 de noviembre de 2016

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

Al comité tutor:

Dra. Marietta Tuena Sangri

Dra. Marcela Vela Amieva

Dr. Gabriel López Velázquez (Tutor principal)

Agradecimientos

**A los miembros del Jurado de Examen Profesional por las
valiosas sugerencias al presente trabajo de tesis:**

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dr. Arturo Carlos Il Becerra Bracho

Dra. Marietta Tuena Sangri

Dr. Sergio Enríquez Flores

Dra. Marcela Vela Amieva

Agradecimientos

A Dios, por permitirme cumplir una meta más en mi desarrollo profesional.

A mis padres María Eugenia Lainez Tapia y Leonel Fernández González por sus enseñanzas y por su incansable esfuerzo para darme educación.

A mis queridas hermanas Dianita, Ada y Moni, por su apoyo y cariño incondicional.

A los intocables, primero por brindarme su amistad, además de todas sus enseñanzas y ayuda.

A mi Chapi, por creer en mí, por la confianza, el apoyo y la seguridad que me infundiste, pero sobre todo por el amor...

Te haré entender, y te enseñaré el camino en que debes andar;

Sobre ti fijaré mis ojos.

Salmos 32:8

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	I
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	4
3.1 Características generales de <i>Giardia lamblia</i>	4
3.2 Taxonomía de <i>Giardia lamblia</i>	6
3.3 <i>Giardia lamblia</i> y giardiasis	7
3.4 El ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>	9
3.5 Biología celular de <i>Giardia lamblia</i>	11
3.5.1 El quiste	11
3.5.2 El Trofozoito	12
3.5.3 Los núcleos	13
3.5.4 El citoesqueleto	13
3.5.5 Los flagelos	14
3.5.6 El disco ventral	14
3.5.7 El cuerpo medio	15
3.5.8 La red túbulo vesicular	15
3.5.9 Los mitosomas	16
3.6 El metabolismo de <i>Giardia lamblia</i>	18
3.6.1. Sistema de óxido-reducción	18
3.6.1.1 La cisteína y sus propiedades	20

3.6.1.2 El residuo de cisteína en las proteínas	23
3.6.1.3 El contenido de cisteínas en las proteínas de <i>G. lamblia</i>	25
3.6.2. Metabolismo energético de <i>G. lamblia</i>	26
3.6.2.1 La vía de la arginina hidrolasa	26
3.6.2.2 La glucólisis	27
3.7 La triosafosfato isomerasa	30
3.7.1 La triosafosfato isomerasa de <i>Giardia lamblia</i> y su contenido de cisteínas	31
3.7.1.2 La formación de oligómeros de GITIM	32
3.7.1.3 La cisteína 222 de GITIM	35
3.7.1.4 La distribución <i>in situ</i> de GITIM	35
4. OBJETIVOS	37
4.1 GENERAL	37
4.2 PARTICULARES	37
5. MATERIALES Y MÉTODOS	38
5.1 Cepas bacterianas	38
5.2 Medios de cultivo	38
5.3 Construcción de los genes <i>gltim</i> con las mutaciones múltiples de cisteína	40
5.3.1 Purificación de los productos de PCR	43
5.3.2 Clonación de los genes <i>gltim</i> mutantes al vector de mantenimiento pJET 1.2/Blunt	43

5.3.2.1 Ligación del plásmido pJET1.2 con los genes <i>gltim</i> mutantes	44
5.3.2.2 Transformación de cepas <i>E. coli</i> TOP10 con los productos de ligación	44
5.3.2.3 Pruebas de confirmación de las clonaciones	45
5.3.2.3.1 PCR de cultivo	45
5.3.2.3.2 Digestiones con las enzimas <i>NdeI</i> y <i>BamHI</i>	45
5.3.2.3.3 Secuenciación de los genes <i>gltim</i> mutantes	46
5.3.3 Sub-clonación de los genes <i>gltim</i> mutantes al plásmido de expresión pET3aHisTev	46
5.3.3.1 Digestión de los genes <i>gltim</i> y del plásmido pET3aHisTev con las enzimas de restricción <i>NdeI</i> y <i>BamHI</i>	46
5.3.3.2 Ligación de los genes <i>gltim</i> al plásmido pET3aHisTev	47
5.3.3.3 Transformación de cepas <i>E. coli</i> TOP10 con los productos de ligación	47
5.3.3.4 Pruebas de confirmación de las clonaciones	47
5.3.3.4.1 PCR de cultivo	47
5.3.3.4.2 Digestión con las enzimas <i>NdeI</i> y <i>BamHI</i>	47
5.3.3.4.3 Secuenciación	48
5.4 Expresión de las enzimas GITIM mutantes	48
5.4.1 Transformación de cepas de <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	48

competentes	
5.5 Expresión de las enzimas GITIM recombinantes	49
5.6 Purificación de las enzimas GITIM recombinantes	50
5.7 Determinación de los parámetros cinéticos de las enzimas GITIM recombinantes	51
5.8 Evaluación de la estructura secundaria de las enzimas recombinantes	52
5.8.1 Determinación del espectro de dicroísmo circular de las enzimas mutantes	52
5.8.2 Determinación de la temperatura media de desnaturalización de las enzimas mutantes	52
5.9 Caracterización de la génesis de los oligómeros de las GITIM recombinantes	53
5.9.1 Determinación en tiempo real del tetrámero de GITIM mediante ataque nucleofílico de la Cys 202 reducida a la Cys 202 oxidada	53
5.10 Generación de cepas de <i>G. lamblia</i> que sobre expresan GITIM mutante	54
5.10.1 Diseño de oligonucleótidos para la generación de los sitios de restricción <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RV en los genes <i>gltim</i> mutantes	55
5.10.2 Generación de los sitios de restricción <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RV en los genes <i>gltim</i> mutantes mediante PCR	56

5.10.3 Sub-clonación de los genes <i>gltim</i> mutantes al plásmido de sobre expresión pTub-Nterm	56
5.10.4 Transfección de trofozoitos de <i>G. lamblia</i> con las diferentes construcciones de GITIM silvestre y mutantes	57
5.11 Determinación de la distribución <i>in situ</i> de las diferentes mutantes de GITIM mediante microscopía de fluorescencia	58
5.12 Cinética de enquistamiento de <i>G. lamblia</i> cepa WB y su relación con GITIM	59
5.13 Determinación de la capacidad de enquistamiento de las cepas de <i>G. lamblia</i> que sobre expresan GITIM Wt, C202A y CWP-2	60
5.14 Generación de anticuerpos anti-GITIM en ratón	60
6. RESULTADOS	61
6.1 Construcción de los genes <i>gltim</i> con las mutaciones múltiples de cisteínas	61
6.2 Expresión y purificación de las enzimas GITIM recombinantes	63
6.3 Determinación de los parámetros cinéticos de las enzimas GITIM recombinantes	65
6.4 Evaluación de la estructura secundaria de las enzimas recombinantes	66
6.5 Cinética de formación de tetrámeros de GITIM	67
6.5.1 Oligomerización de GITIM silvestre	68
6.5.2 Oligomerización de las mutantes C202A y C202A-	69

C228A	
6.5.3 Oligomerización de la mutante C222A	70
6.5.4 Oligomerización de la mutante C228A	71
6.5.5 Determinación espectrofotométrica de la formación del tetrámero de GITIM mediante ataque nucleofílico de la Cys 202 reducida hacia la Cys 202 oxidada	71
6.5.6 Comparación de la generación de tetrámeros entre GITIM silvestre y las mutantes carentes de cisteína	72
6.6 Generación de cepas de <i>G. lamblia</i> que sobre expresan GITIM mutante	76
6.6.1 Experimentos de PCR para generar los sitios de restricción para subclonar al pTub	77
6.6.2 Confirmación de la subclonación de los genes <i>gltim</i> al plásmido pTubHA-NTerm	78
6.6.3 Transfección de trofozoitos de <i>G. lamblia</i> con los plásmidos pTubNTerm	80
6.7 Ensayos de inmunocitoquímica para estudiar la distribución <i>in situ</i> de GITIM silvestre cepa WB y de las cepas que sobre expresan GITIM C202A	80
6.7.1 Distribución <i>in situ</i> de GITIM endógena en la cepa WB de <i>G. lamblia</i>	80
6.7.2 Distribución <i>in situ</i> de la mutante de GITIM C202A en trofozoitos transfectados	82

6.8 Cinética de enquistamiento de <i>G. lamblia</i> cepa WB y su relación con GITIM	84
6.9 Capacidad de enquistamiento de las cepas de <i>G. lamblia</i> que sobre expresan GITIM Wt, C202A y CWP-2	85
6.10 Generación de anticuerpos anti-GITIM en ratón	86
7. DISCUSIÓN	87
7.1 La capacidad de oligomerización de GITIM depende del estado redox de las cisteínas participantes	87
7.2 Las cisteínas superficiales influyen importantemente en la cinética y en la forma de oligomerización de GITIM	93
7.3 La mutante carente de las tres cisteínas superficiales se afecta a nivel de plegamiento y por ende también a nivel funcional	96
7.4 La cepa WB de <i>G. lamblia</i> presenta una distribución <i>in situ</i> distinta a la de una enzima completamente citoplásmica	96
7.5 La aparición de oligómeros de GITIM es dependiente del estadio de vida del parásito	98
7.6 La transfección de <i>G. lamblia</i> con la mutante C202A aumenta su viabilidad	99
7.7 La capacidad de enquistamiento de las cepas de <i>G. lamblia</i> no se ve modificada por la sobre expresión de GITIM Wt, C202A ni CWP-2	100
8. CONCLUSIONES	101
9. LITERATURA CITADA	102

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla	Página
Tabla 1. Proteínas con alto contenido de cisteínas en diferentes organismos.	26
Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la generación de los sitios de restricción <i>BamHI-EcoRV</i> en los genes <i>gltim</i> mutantes.	55
Tabla 3. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia.	59
Tabla 4. Concentración de proteína de las mutantes de GITIM.	63
Tabla 5. Actividad enzimática de las fracciones de purificación de GITIM C202A-C228A.	65
Tabla 6. Comparación entre los parámetros cinéticos de GITIM silvestre, las mutantes sencillas de cisteínas y las mutantes múltiples obtenidas en el presente trabajo.	66
Tabla 7. Conteo de trofozoitos y quistes de las diferentes cepas de <i>G.lambli</i> a estudiadas.	85

	Página
Figura	
Figura 1. Ciclo de vida de <i>G. lamblia</i> .	10
Figura 2. Representación de un quiste de <i>Giardia lamblia</i> .	12
Figura 3. Representación de un trofozoito de <i>G. lamblia</i> .	13
Figura 4. Microscopía electrónica de barrido de <i>G. lamblia</i> después de haber sido tratada con detergente.	14
Figura 5. Esquema de la red túbulo vesicular de <i>G. lamblia</i> .	16
Figura 6. Localización mediante anticuerpos contra proteínas con centros Fierro-Azufre.	17
Figura 7. Estructura del residuo cisteinilo en las proteínas, las líneas punteadas representan los enlaces peptídicos que flanquean al residuo en cada extremo.	20
Figura 8. A) Las diferentes formas de la cisteína. B) Esquematización de las reacciones de intercambio de disulfuros.	22
Figura 9. Modificaciones potenciales que pueden contribuir a la regulación del estado redox de una proteína (Pr) y protección contra daño oxidante.	24
Figura 10. Vía de la arginina deiminasa en <i>Giardia lamblia</i>	27
Figura 11. Vía de la glucólisis en <i>Giardia lamblia</i> .	29
Figura 12. Estructura terciaria de la TIM.	31
Figura 13. Estructura terciaria de la GITIM.	32
Figura 14. Modelo de polimerización/despolimerización de GITIM	34

mediante la formación y ruptura de enlaces disulfuro entre las cisteínas.	
Figura 15. Distribución <i>in situ</i> de GITIM en trofozoitos y quistes de <i>G. lamblia</i>	36
Figura 16. Vector de expresión pET3a-HisTev en el que se encuentra clonado el gen <i>gltim</i> C202A.	41
Figura 17. Generación de las enzimas recombinantes con las mutaciones dobles C202A+C222A, C202A+C228A, C222A+C228A mediante la técnica de mutagénesis sitio dirigida de PCR por solapamiento y extensión.	42
Figura 18. Vector de mantenimiento utilizado para la clonación de los genes <i>gltim</i> mutantes.	44
Figura 19. Método para determinación de actividad enzimática.	52
Figura 20. Esquema de reacción del reactivo de Ellman.	53
Figura 21. Mapa esquemático del plásmido pTubHA-Nterm	55
Figura 22. Gráfico de las reacciones de PCR probadas.	56
Figura 23. Transfección por electroporación de <i>G. lamblia</i> .	58
Figura 24. Construcción de la doble mutante de GITIM C202A + C228A.	61
Figura 25. Pruebas de digestión con <i>NdeI</i> , <i>BamHI</i> para monitoreo de clonas de la doble mutante C202A-C228A del gen <i>gltim</i> .	62
Figura 26. Alineamiento de secuencias de DNA del gen <i>gltim</i> silvestre y el gen <i>gltim</i> C202A-C228A.	63
Figura 27. Fracciones de purificación de la enzima recombinante GITIM con la mutación C202A-C228A en SDS-PAGE.	64

Figura 28. Espectros de dicroísmo circular y temperatura media de desnaturalización de las enzimas GITIM dobles mutantes C202A-C228A y C202A-C222A.	67
Figura 29. Cinética de formación del tetrámero de GITIM Wt mediante SDS-PAGE, purificada en presencia y ausencia de β -mercaptoetanol.	69
Figura 30. Seguimiento de la formación de tetrámeros de dos GITIMs mutantes carentes de cisteína 202.	70
Figura 31. Génesis de tetrámeros en la mutante sencilla C222A purificada en presencia y ausencia de β -mercaptoetanol.	71
Figura 32. Determinación espectrofotométrica de la formación en tiempo real del tetrámero de GITIM mediante ataque nucleofílico de la Cys 202 reducida hacia la Cys 202 oxidada.	72
Figura 33. Cinética de formación de tetrámeros de las GITIM recombinantes mediante SDS-PAGE, purificadas en presencia de β -mercaptoetanol.	73
Figura 34. Geles SDS-PAGE de las diferentes GITIM a tiempos prolongados de almacenamiento.	74
Figura 35. Gel de SDS-PAGE de la proteína GITIM C222A con 4 meses de almacenamiento, obtenido previa incubación de la proteína con urea y iodoacetamida en concentraciones crecientes.	76
Figura 36. Pruebas de PCR para la generación de los sitios de restricción BamHI-EcoRV en el gen <i>gltim</i> .	77
Figura 37. Confirmación de la correcta inserción del gen <i>gltim</i> Wt al	78

vector pTubHA-NTerm.

Figura 38. Distribución <i>in situ</i> de GITIM endógena (verde) en trofozoito de <i>G. lamblia</i> , cepa WB.	81
Figura 39. Co-localización de GITIM con vesículas periféricas, anticuerpo 5B11 contra catepsina B3 en <i>G. lamblia</i> .	81
Figura 40. Distribución <i>in situ</i> de GITIM silvestre y mutante C202A.	82
Figura 41. Ensayos de western blot para la detección de GITIM en las diferentes etapas del enquistamiento de <i>G. lamblia</i> .	84
Figura 42. Porcentaje de quistes generados de las cepas de <i>G. lamblia</i> silvestre y transfectadas.	86
Figura 43. Ensayos de western blot para probar la sensibilidad y especificidad del anticuerpo hecho en ratón contra GITIM.	86
Figura 44. Propuesta de mecanismo que explica la formación más acelerada del tetrámero en la proteína GITIM Wt cuando es purificada en presencia de un agente reductor.	90
Figura 45. Esquema del modelo propuesto de formación <i>in vitro</i> del tetrámero de GITIM.	91
Figura 46. Poblaciones preponderantes de GITIM al mes de almacenamiento.	92
Figura 47. Modelo de oligomerización propuesto para la GITIM.	94
Figura 48. Reconstrucción tridimensional de un trofozoito de <i>G. lamblia</i> .	98

1. RESUMEN

Giardia lamblia es un organismo eucarionte, unicelular cuyo ciclo de vida consta de dos estadios, el trofozoito (forma vegetativa) y el quiste (forma infectiva). Este parásito ha sido objeto de múltiples estudios debido a que posee peculiaridades a nivel evolutivo, médico y molecular. A nivel médico, al ser el agente causal de la giardiasis, enfermedad que ocupa el primer lugar en las causas de diarrea provocada por parásitos protistas, se han llevado a cabo numerosos estudios para generar conocimiento acerca de su epidemiología y patofisiología, así como de posibles blancos terapéuticos para combatirla. A nivel molecular, *G. lamblia* presenta propiedades únicas en cuanto a su ultra estructura, como su contenido de vesículas periféricas con características semejantes a los lisosomas; además, posee características más relacionadas a los organismos procariontes, como el contenido de GC en su genoma y el tamaño de su RNA ribosomal, entre otros. Estas características, han permitido que sea utilizado como organismo modelo de los eucariontes para el estudio de procesos celulares básicos, como la diferenciación celular y los procesos oxido-reductores asociados a su estilo de vida parasítico.

En cuanto a su metabolismo, *G. lamblia* también posee características peculiares, por ejemplo, la existencia de los sistemas de defensa antioxidante propios de eucariontes como el glutatión y la superóxido dismutasa está controvertida en este parásito debido a la ambigüedad en los resultados de los experimentos realizados para probar su utilización. En cambio, se han reportado algunos sistemas antioxidantes poco comunes, tales como las enzimas NADH oxidasa, NADH peroxidasa y tioredoxina reductasa, así como los tioles de bajo peso molecular como el tioglicolato, la coenzima A y el sulfito. Además de todos estos antioxidantes, *G. lamblia* cuenta con cisteína (Cys) en su citoplasma como el tiol de bajo peso molecular más abundante, la cual mantiene el ambiente intracelular reducido por acción del grupo radical tiol o sulfhidrilo (SH) que posee. Además, se ha documentado que las proteínas de *G. lamblia* tienen un alto contenido de Cys comparado con otras especies, al analizar el genoma de este parásito se encontró que el 0.63% de sus genes codifica para proteínas con alto contenido de cisteínas (más del 10%), siendo éste el mayor porcentaje encontrado entre los diferentes organismos que se compararon. Ejemplo de ello son las proteínas variantes de superficie y las proteínas ricas en cisteína.

G. lamblia no lleva a cabo fosforilación oxidativa, por lo que una de sus principales vías de obtención de energía es la glucólisis. Una de las enzimas que forma parte de esta ruta es la triosafofato isomerasa (TIM), la cual cataliza la reacción de isomerización de di-hidroxi-acetona fosfato a gliceraldehído-3-fosfato, en la mayoría de los organismos en los que se ha estudiado esta enzima, la unidad funcional es el homodímero. La TIM de *G. lamblia* (GITIM) es un polipéptido de 257 aminoácidos con 5 residuos de cisteína (C14, C127, C202, C222 y C228). Existen evidencias de que GITIM puede formar tetrámeros mediante la formación de un puente disulfuro entre las cisteínas 202 de cada par de dímeros participantes; por otro lado, se propuso que las cisteínas 222 y 228 pueden formar entre sí un puente disulfuro intracatenario. La formación de ambos enlaces disminuye la actividad enzimática en un 50%. Al estudiar la distribución de los

tetrámeros de GITIM en los trofozoitos y los quistes, se encontró que en el quiste hay una mayor distribución de tetrámeros e incluso de oligómeros mayores. El hecho de que la GITIM exista tanto en forma de dímeros como en oligómeros mayores al dímero mediante enlaces disulfuro, así como que estas dos especies oligoméricas tengan una actividad catalítica diferente, y tomando en cuenta el antecedente de que la formación y ruptura de enlaces disulfuro de las proteínas en general puede funcionar como un mecanismo de regulación enzimática, nos planteamos las siguientes preguntas de investigación: ¿Cómo es la biogénesis de los oligómeros de GITIM originados por enlaces covalentes tipo disulfuro? ¿Cuáles condiciones propician la polimerización y despolimerización de los oligómeros de GITIM?, ¿Cuál es el significado biológico de la distribución diferencial *in situ* de esta enzima? y ¿cuál es la implicación biológica que tienen todos estos hallazgos en este parásito? Una respuesta probable es que tenga que ver con el paso de trofozoito a quiste y viceversa. Lo cual podría representar una estrategia de infección de este parásito no descrita aún. El objetivo del presente trabajo de tesis fue caracterizar funcional y estructuralmente *in vitro* e *in situ* a las mutantes sencillas y múltiples de cisteínas de la GITIM. Se prepararon las enzimas recombinantes carentes de una, dos o las tres cisteínas superficiales y se llevaron a cabo estudios de electroforesis desnaturante en geles de acrilamida para caracterizar la génesis de los oligómeros de las diferentes mutantes durante un mes de almacenamiento, en paralelo se determinó la actividad de estas enzimas para su caracterización funcional. Por otro lado, para los estudios *in vivo*, se generaron cepas de *G. lamblia* que sobre expresan la GITIM Wt y la mutante carente de cisteína 202 mediante transfección con vectores diseñados especialmente para este parásito, con estas células transformadas cuales se realizaron estudios de inmunocitoquímica, inducción al enquistamiento y western blot para la descripción de la distribución *in situ* de la GITIM mutante.

A partir de los estudios *in vitro* con las proteínas recombinantes encontramos que las propiedades catalíticas y estructurales de GITIM están íntimamente relacionadas con sus Cys superficiales, además se propone que las Cys que están involucradas en la formación del enlace disulfuro que da lugar a los oligómeros de alto peso molecular, deben tener estados RedOx opuestos, para lo cual es indispensable la participación de algún agente “preparador” que propicie la formación de dichos enlaces.

Los estudios *in vivo* permitieron corroborar que GITIM tiene una distribución celular diferencial, encontrándose en zonas enriquecidas que colocalizan con catepsina B3 de vesículas periféricas; lo cual no coincide con lo descrito previamente para esta enzima glicolítica; Por otro lado, el patrón de distribución *in situ* de la GITIM cambia drásticamente cuando pierde la capacidad de oligomerización (cepa transfectada con C202A), y parece ser reclutada en retículo endoplásmico quizás por reconocerse como anómala.

También se demostró que la oligomerización de GITIM endógena es inducida por el enquistamiento de *G. lamblia*.

2. ABSTRACT

Giardia lamblia is a eukaryote, unicellular organism whose life cycle is constituted by two stages, trophozoite (vegetative form) and cyst (infective form). This parasite has been subject of many studies because it has peculiar characteristics at evolutionary, medical and molecular levels. At medical level, *G. lamblia* is the causative agent of giardiasis, which is the

Intestinal disease that ranks first in causes of diarrhea caused by protozoa parasites, numerous studies have been conducted in order to contribute to the knowledge of about its epidemiology and pathophysiology, as well as possible therapeutic targets to combat it. At the molecular level, *G. lamblia* presents unique ultrastructural properties, as its content of peripheral lysosome-like vesicles; it also has characteristics more similar to prokaryotes like its genome's GC content and the size of its ribosomal RNA, among others. These features have allowed it to be used as a model organism for studying eukaryotic basic cellular processes such as cell differentiation and oxide-reductive processes associated with its parasitic life style.

G. lamblia also has unique metabolic characteristics, for example, the existence of systems for antioxidant defense of eukaryotes such as glutathione and superoxide dismutase is controversial in this parasite because of the ambiguity in the results of the experiments made to test its utilization. Nevertheless, there have been documented another antioxidant systems like NADH oxidase, NADH peroxidase and thioredoxin reductase enzymes, as well as low molecular weight thiols such as thioglycolate, coenzyme A and sulphite. In addition to these antioxidants, *G. lamblia* has cysteine (Cys) in its cytoplasm as the most abundant low molecular weight thiol, which maintains the intracellular environment in reduced state due to the sulfhydryl (SH) radical group. Moreover, it has been reported that *G. lamblia* proteins have a high contents of Cys as compared with other species. When analyzing the genome of this parasite it was found that 0.63% of genes that code for proteins high in Cys (over 10%), being this the highest percentage found among different organisms that were compared. Examples are variant surface proteins and cysteine-rich proteins.

G. lamblia is not able to perform oxidative phosphorylation, so that one of the main ways for obtaining energy is glycolysis. One of the enzymes that form part of this pathway is triosephosphate isomerase (TIM), which catalyzes the isomerization reaction of di-hydroxy-acetone phosphate to glyceraldehyde-3-phosphate, in most organisms in which TIM has been studied, the functional unit is a homodimer. *G. lamblia*'s TIM (GITIM) is a 257 amino acid polypeptide with five Cys residues (C14, C127, C202, C222 and C228). There is evidence that supports that GITIM can form tetramers through disulfide bridges between cysteines 202 of each pair of participants dimers; on the other hand, it was proposed that the Cys 222 and 228 may form between them an intra-chain disulfide bridge. The formation of both links decreases enzyme activity by 50%. When studying GITIM distribution in trophozoites and cysts, it was found that tetramers and even higher oligomers have a major distribution in cysts. The fact that GITIM exists both as dimers and higher oligomers to the dimer by disulfide bonds and that these two oligomeric species present different catalytic activity, and considering that the formation and breaking

Abstract

of disulfide bonds in proteins generally can function as a mechanism for enzymatic regulation, we considered the following research questions: How is the biogenesis of GITIM oligomers originated by covalent disulfide bonds? What conditions favor the polymerization and depolymerization of GITIM oligomers? What is the biological significance of the differential distribution of this enzyme *in situ*? And what are the biological implications that these findings have on this parasite? One likely answer is that it has to do with the conversion of trophozoite to cyst and vice versa. This could represent a strategy of infection of this parasite undescribed yet. The aim of the present work was to characterize functionally and structurally *in vitro* and *in situ* simple and multiple cysteine GITIM mutants.

GITIM mutants lacking one, two or three surface cysteines were prepared and studies of denaturing electrophoresis were performed in acrylamide gels to characterize the genesis of the oligomers of the different mutants for a month of storage, in parallel we determined the activity of these enzymes for the functional characterization. Furthermore, for *in vivo* studies, strains of *G. lamblia* overexpressing the GITIM Wt and mutant lacking cysteine 202 were generated by transfection with vectors specially designed for this parasite, with these transformed cells, immunocytochemistry, encystation induction and western blot studies were performed for the description of the *in situ* distribution of mutant GITIM.

From *in vitro* studies with recombinant proteins we found that the catalytic and structural properties of GITIM are closely related with its surface Cys, we also proposed that the Cys that are involved in disulfide bond formation which results in high molecular weight oligomers must have Redox opposite states, which makes essential the existence of a "preparative" agent that propitiates the formation of disulphide bonds.

In vivo studies corroborated that GITIM has a differential distribution, being found in enriched zones which co-localize with cathepsin B3 peripheral vesicles; this finding does not coincide with the distribution previously described for this glycolytic enzyme. Furthermore, the pattern of *in situ* distribution of GITIM changes dramatically when it loses the ability of oligomerization (strain transfected with C202A) and appears to be recruited in the endoplasmic reticulum perhaps because it is recognized as an abnormal protein. On the other hand, it was also shown that endogenous GITIM oligomerization is induced by encystation of *G. lamblia*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Giardia lamblia*

Giardia lamblia es un organismo eucarionte, unicelular cuyo estudio ha fascinado a los científicos por más de 300 años. Desde que fue observado por primera vez por Antony van Leeuwenhoek en 1681, las investigaciones en este microorganismo han avanzado considerablemente. En la actualidad, existen más de 4000 publicaciones en PubMed referentes a tres aspectos principales, el evolutivo, médico y molecular (Luján y Svard en Luján 2011, PubMed).

A nivel evolutivo, se propuso que este protista surgió antes de los procesos de endosimbiosis que dieron lugar a los organismos eucariontes, por no poseer los organelos membranosos característicos de este dominio como mitocondrias, peroxisomas y aparato de Golgi, lo que llevó a un sinnúmero de estudios que demostraron que *G. lamblia* contiene organelos como nucléolo, relictos de mitocondrias denominados mitosomas y un aparato de Golgi rudimentario característico cuando las células comienzan a enquistarse; estos hallazgos, entre otros estudios filogenéticos, refutaron dicha hipótesis e incluso permitieron proponer a *Giardia* como uno de los organismos mejor adaptados entre los diplomonádidos (Reiner, *et al.* 1990, Nixon, *et al.* 2002, Tovar, *et al.* 2003, Adam, *et al.* 2001, Thompson en Luján 2011).

A nivel molecular, *G. lamblia* ha despertado la curiosidad de los científicos debido a que tiene propiedades únicas, como su ultra estructura (tiene vesículas periféricas, carece de un aparato de Golgi apilado); además, posee características

Introducción

más parecidas a los organismos procariontes, como el contenido de GC en su genoma, el tamaño de su RNA ribosomal y su metabolismo, entre otros (Mowatt, *et al.* 1994, Blumenthal, *et al.* 2011, Korneta, *et al.* 2012).

Estas características, entre otras, han permitido que sea utilizado como organismo modelo de los eucariontes para el estudio de procesos celulares básicos, como la diferenciación celular y los procesos oxido-reductores asociados a su estilo de vida parasítico (Ankarklev, *et al.* 2010).

3.2 TAXONOMÍA DE *Giardia lamblia*

G. lamblia es un parásito intestinal de organismos invertebrados y vertebrados incluyendo al humano (Gardner, *et al.* 2001); a pesar de que posee características morfológicas que permiten diferenciarlo de otros protistas, la gran variedad de sus hospederos y la falta de características morfológicas para determinar la especificidad de los organismos a los que parasita, han propiciado debates y discusiones acerca de su clasificación taxonómica (Thompson en Luján 2011, cap 1).

Giardia pertenece al *phylum* Metamonada, clase Trepomonadea, orden diplomonadida, debido a que posee dos juegos de organelos incluyendo dos núcleos celulares transcripcionalmente activos (Kabnick KS, *et al.* 1990), los organismos que pertenecen a este orden se encuentran en ambientes microaerofílicos. Este protista tiene 4 pares de flagelos (anteriores, posteriores, ventrales y caudales) y está incluido dentro de la familia *hexamitidae*, a la que también pertenecen otros organismos flagelados como *Hexamita inflata* (Dando, *et al.*, 1993; Fenchel *et al.*, 1995), el cual es un organismo de vida libre y *Spironucleus salmonicida*, siendo este último parásito de peces (Lloyd, *et al.* 2014). La presencia de un único disco ventral separa a *Giardia* del resto de los organismos de la familia *Hexamitidae* (Thompson, *et al.* en Luján 2011, Plutzer, *et al.* 2010).

3.3 *Giardia lamblia* y Giardiasis

En el aspecto médico, un sinnúmero de investigaciones acerca de este parásito ha tenido lugar debido a que es el agente causal de la giardiasis, enfermedad considerada como la causa más común de diarrea por protistas, con una distribución cosmopolita, la cual causa alrededor de 280 millones de casos sintomáticos y 500,000 nuevos casos cada año a nivel mundial (Lane, *et al.* 2002). En los países desarrollados, es la causa más común de brotes de enfermedades diarreicas transmitidas por el agua (Slifko, *et al.* 2000); además, los animales domésticos también son infectados por este parásito (Thompson en Luján 2011). La giardiasis afecta más en los tres primeros años de vida y en personas desnutridas o inmuno-deficientes (Lane, *et al.* 2002, Almirall, *et al.* 2013, Janagond, *et al.* 2013); las manifestaciones clínicas son muy variables, desde prácticamente nulas en los portadores asintomáticos hasta causar diarrea acuosa, dolor epigástrico, náusea, vómito, pérdida de peso, así como síndrome de malabsorción intestinal, los cuales aparecen de 6 a 15 días después de la infección. Thompson y colaboradores señalaron que la giardiasis es una enfermedad infecciosa reemergente en países desarrollados debido a que los cambios en el ámbito social y laboral han propiciado un aumento en el número de niños que son cuidados en centros infantiles, en donde dicha enfermedad ha sido relacionada a brotes diarreicos (Thompson, *et al.* 2000); además, en niños de países en vías de desarrollo como los latinoamericanos, africanos y algunas comunidades aborígenes, la infección por *Giardia* ha sido asociada a desnutrición

Introducción

y retraso global del desarrollo (Botero Garces 2009, Sullivan, *et al.* 1991). En México, los datos más actualizados de casos de Giardiasis provienen de la Secretaría de Salud, a través de su Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, en donde reportaron 10,249 casos en el periodo comprendido del año 2015 y hasta la semana 46 del año 2016, siendo los Estados de Sinaloa, Yucatán y Chiapas las Entidades Federativas con mayor número de casos (921, 912 y 888 casos respectivamente) (Boletín epidemiológico, Secretaría de Salud). Un estudio previo realizado también en México, sugirió que la giardiasis puede ser endémica en todo el país, al encontrar una seroprevalencia de 55.3% en la población estudiada y de 34% en los niños de entre 5 y 9 años de edad (Cedillo Rivera, *et al.* 2009).

3.4 EL CICLO DE VIDA DE *Giardia lamblia*

El ciclo de vida de *G. lamblia* involucra dos principales estadios, el quiste y el trofozoito, comienza cuando el organismo hospedero ingiere quistes que pueden provenir de alimentos o agua contaminados. Al entrar en contacto con los ácidos estomacales y las proteasas del huésped, se genera una rápida diferenciación a trofozoitos, los cuales se adhieren al epitelio intestinal mediante su disco ventral, ahí se reproducen mediante fisión binaria. Los trofozoitos constantemente monitorean el ambiente intestinal del hospedero y responden al estímulo externo, ejemplo de esto es la composición cambiante en las diferentes porciones del intestino, así como el estado nutricional que varía de hospedero a hospedero. Aquellos trofozoitos que se adhieren al epitelio intestinal se encuentran recubiertos de la mucosa intestinal e inmersos en un micro filtrado semejante al suero; el pH es cercano a neutro y tiene bajo contenido de sales biliares; a medida que el enterocito madura, es desprendido del epitelio y los trofozoitos llegan al lumen intestinal, donde el contenido de sales biliares es mayor y el pH es más básico, si los trofozoitos no se adhieren de nuevo al epitelio, desencadenan señalizaciones para el enquistamiento; posteriormente los quistes son expulsados al ambiente en las heces y al ser ingeridos por otro organismo hospedero se completa el ciclo de vida (Lauwaet, *et al.* 2007, Eckman, *et al.* 2003) (Figura 1).

Cabe mencionar que el ciclo de vida de este parásito puede replicarse *in vitro* cambiando la concentración de sales biliares en el medio de cultivo, esta

Introducción

importante ventaja ha permitido su estudio a fondo en el laboratorio (Davids en Luján 2011).

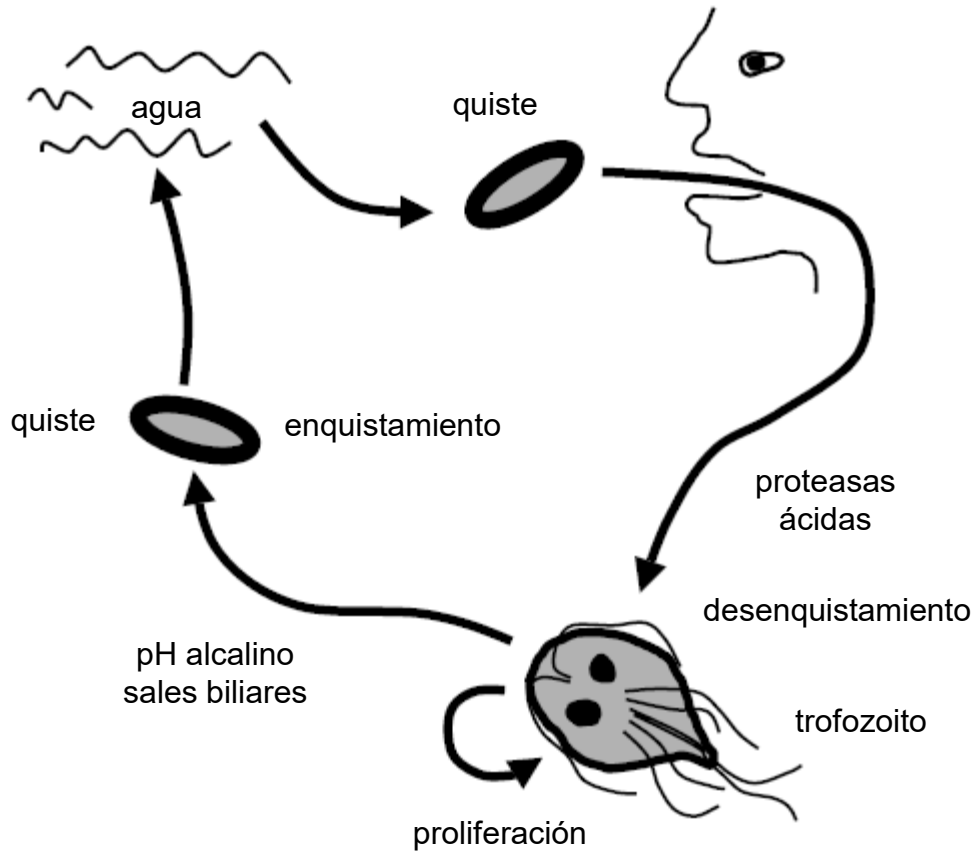


Figura 1. Ciclo de vida de *G. lamblia*. Modificada de Eckmann *et al.* 2003.

3.5 BIOLOGÍA CELULAR DE *Giardia lamblia*

G. lamblia es uno de los microorganismos de divergencia temprana más estudiados ya que posee propiedades únicas, como su ultra estructura (tiene vesículas periféricas, carece de peroxisomas, mitocondrias y de aparato de Golgi apilado). Estas características, entre otras, han permitido que sea considerado como organismo modelo del sistema eucarionte para el estudio de procesos celulares básicos, como la diferenciación celular y los procesos de óxido-reducción asociados a su estilo de vida parasitaria (Ankarklev, *et al.* 2010).

3.5.1 El Quiste.

Tiene morfología ovoide y un tamaño de 7-10 μm , posee 4 núcleos; es la forma infectiva del parásito y su medio de transporte “seguro” de hospedero a hospedero debido a la pared externa tan resistente que lo delimita; puede sobrevivir en el medio ambiente por largos periodos de tiempo, soporta cambios de presión osmótica e incluso condiciones de desecación. La capacidad infectiva del quiste es alta, de tal manera que si el organismo hospedero ingiere un mínimo de 10 quistes, puede llegar a contraer la infección (Figura 2) (Ankarklev, *et al.* 2010).

Su transcriptoma se encuentra mucho más reducido en abundancia y complejidad en comparación con la forma vegetativa del parásito y sólo 5% del mRNA es expresado en este estadio de vida, por lo que se le considera la forma quiescente en la que el metabolismo más activo se encuentra cuando se desencadenan los procesos de diferenciación celular para el desenquistamiento (Faghiri, *et al.* 2011).

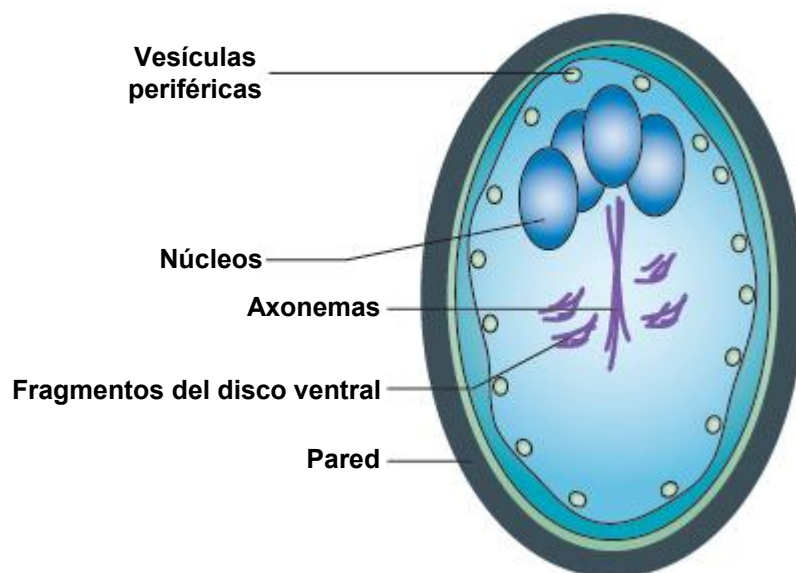


Figura 2. Representación de un quiste de *Giardia lamblia*. Tomado de Ankarklev, *et al.* 2010.

3.5.2 El Trofozoito

Es la forma vegetativa de este parásito, tiene forma de gota y mide entre 12 y 15 μ m; durante su estancia en el intestino del hospedero, el parásito lleva a cabo un sinnúmero de procesos metabólicos para adaptarse a factores abióticos como el pH, la presión de oxígeno, el potencial redox y la disponibilidad de nutrientes; también enfrenta factores bióticos como la microbiota normal, la mucosa epitelial e incluso otros parásitos intestinales. Además, el trofozoito debe combatir toda la batería de defensas que desencadena el hospedero como son las defensinas, proteasas y las células de la respuesta inmune como los linfocitos T, los mastocitos, células dendríticas, los anticuerpos y las citosinas, entre otros.

Aquellos trofozoitos que logren evadir la respuesta inmune del hospedero serán capaces de reproducirse y sobrevivir (Ankarklev, *et al.* 2010, Rópolo, *et al.* 2010) (Figura 3).

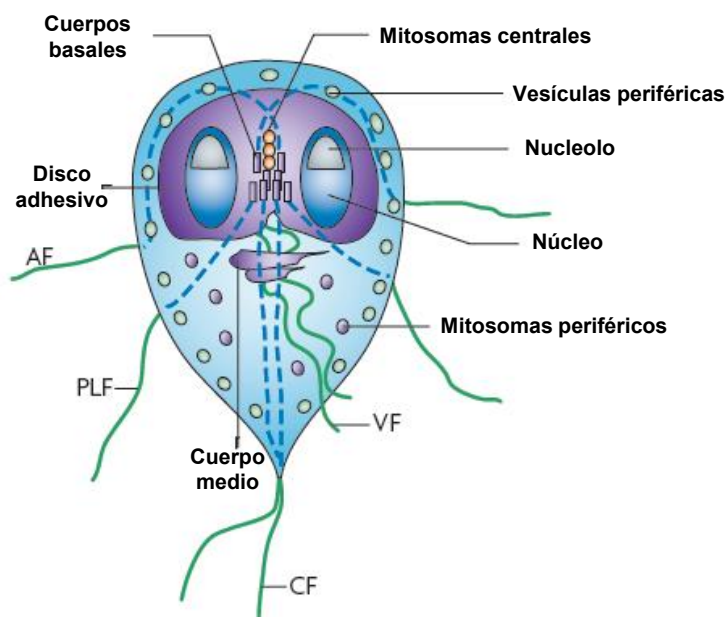


Figura 3. Representación de un trofozoito de *G. lamblia*. Abreviaturas: AF: Flagelos anteriores; PLF: Flagelos posteriores laterales; CF: Flagelos caudales; VF: Flagelos ventrales. Imagen modificada de Ankarklev, *et al.* 2010.

3.5.3 Los núcleos

G. lamblia posee dos núcleos ovoides, los cuales tienen la misma cantidad de ADN y el mismo número de genes y cromosomas (Adam, *et al.* 2000). La replicación de ambos núcleos ocurre aproximadamente al mismo tiempo, siendo ambos transcripcionalmente activos (Yu, *et al.* 2002).

3.5.4 El citoesqueleto

Está formado por estructuras microtubulares y constituye un factor determinante en la virulencia del parásito, ya que interviene en funciones como locomoción,

adhesión celular, mantenimiento de la morfología celular y replicación. El mismo incluye cuatro pares de flagelos, un disco ventral, un cuerpo medio y una estructura denominada funis (Elmendorf, *et al.* 2003) (Figura 4).

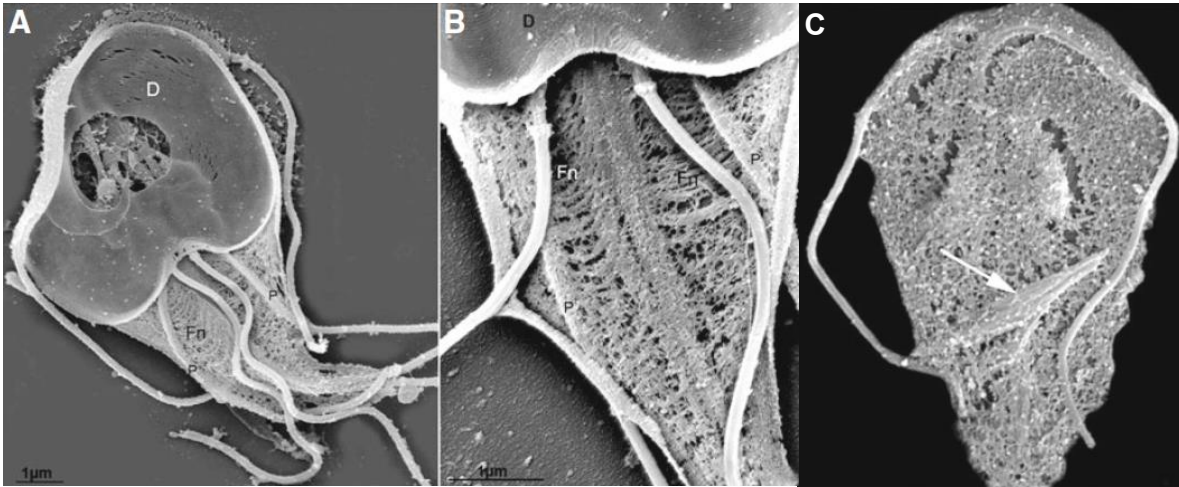


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido de *G. lamblia* después de haber sido tratada con detergente. A) Se pueden visualizar los microtúbulos del disco ventral (D), así como los del funis en el panel B (Fn) y del cuerpo medio en el panel C. Imágenes tomadas de Benchimol en Luján 2011.

3.5.5 Los flagelos

G. lamblia tiene cuatro pares de flagelos 2 anteriores, 2 posteriores, 2 ventrales y 2 caudales, los cuales le permiten desplazarse (Figura 3). Tienen origen en los cuerpos basales, en una región localizada entre los dos núcleos denominada axonema (Benchimol, *et al.* 2011).

3.5.6 El disco ventral

Está compuesto de una capa espiral de microtúbulos conectados a la membrana plasmática, las proteínas que lo constituyen son principalmente tubulinas y giardinas; esta estructura forma una especie de ventosa que le permite al

trofozoito adherirse mediante vacío a la superficie del epitelio intestinal y con esto, evitar ser arrastrado con el bolo alimenticio (Figura 3) (Benchimol, *et al.* 2011).

3.5.7 El cuerpo medio

Esta estructura compuesta de microtúbulos se localiza transversal al eje central del trofozoito. Su función aún no ha sido elucidada, se propone que podría actuar como reservorio de microtúbulos, los cuales se utilizan durante la fase de división celular (Figura 4) (Benchimol, *et al.* 2011).

3.5.8 La red túbulo vesicular

Giardia posee un sistema de tráfico de proteínas peculiar, el cual consiste en una red túbulo vesicular (RTV) conformada por el retículo endoplasmático, este forma una compleja red tubular desde la región perinuclear hacia la periferia celular (Figura 5). Las vesículas periféricas (PVs) también forman parte importante de esta RTV; estas se encuentran arraigadas justo debajo de la membrana citoplasmática y su función parece ser la de asistir al parásito en la captación de nutrientes, digestión y transporte retrógrado de moléculas precursoras hacia el interior de la célula. Este eficiente sistema de tráfico de proteínas es capaz de dirigir las hacia su ubicación final a través de la RTV. En los trofozoitos que se encuentran en etapa de diferenciación hacia quistes, un elemento extra se adiciona a esta RTV, las vesículas específicas de enquistamiento (ESV), las cuales se encargan de secretar las proteínas que formarán la pared del quiste y

dejan de ser detectadas una vez que el quiste se ha formado (Benchimol, *et al.* 2011).

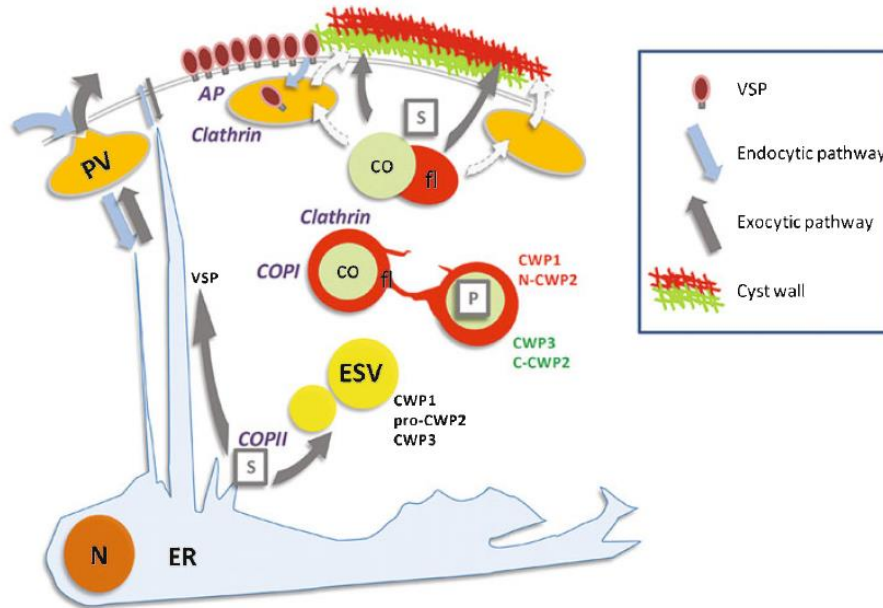


Figura 5. Esquema de la red túbulo vesicular de *G. lamblia*. Abreviaturas: N: Núcleo; ER: Retículo endoplásmico; S: Pasos de clasificación de proteínas; ESV: Vesículas específicas de enquistamiento; VSP: Proteínas variantes de superficie; COP I y II: Componentes asociados al aparato de Golgi. Imagen tomada de Hehl en Luján 2011.

3.5.9 Los mitosomas

Los mitosomas representan la forma más simple de las mitocondrias. La evolución de estos organelos presentes en organismos eucariontes unicelulares como *G. lamblia*, transformó a las mitocondrias en pequeñas vesículas delimitadas por una doble membrana, las cuales perdieron su genoma, la cadena respiratoria y por tanto la capacidad de sintetizar ATP a través de la fosforilación oxidativa. Hasta la fecha, la única vía metabólica documentada en estos relictos de mitocondrias es la de formación de complejos hierro-azufre (Tachezy, *et al.* en Luján 2011).

Mediante estudios de reconstitución proteica *in vitro*, utilizando anticuerpos contra proteínas mitocondriales involucradas en la síntesis de grupos sulfuro, se

Introducción

demostró que *G. lamblia* posee mitosomas y que estos participan en la maduración de las proteínas hierro-azufre (Figura 6) (Tovar, *et al.* 2003).

Recientemente, Pyrih y colaboradores investigaron la localización celular de los componentes de la vía de ensamblaje de las proteínas hierro-azufre en *G. lamblia* y encontraron que todos los componentes son citoplásmicos excepto por las proteínas Cia2 y dos parálogos de la Nbp35 los cuales se encontraron dentro de los mitosomas, con base en sus hallazgos propusieron que la localización dual de dichas proteínas en *G. lamblia* podría representar una nueva conexión entre la maquinaria de ensamblaje del complejo hierro-azufre y su vía citosólica (Pyrih, *et al.* 2016).

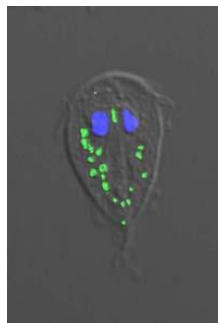


Figura 6. Localización mediante anticuerpos contra proteínas con centros Fierro-Azufre. Imagen tomada de Tovar, *et al.* 2003.

3.6 METABOLISMO DE *Giardia lamblia*

3.6.1 Sistema de óxido-reducción

G. lamblia es un organismo microaerofílico que tolera concentraciones de oxígeno (O₂) disuelto de hasta 50 μM (Lloyd et al., 2000), debido a que en el lumen intestinal donde este parásito habita, la concentración de O₂ es de 60 μM, se requiere de un sistema de defensa antioxidante para detoxificar las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) tales como el ion superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido, entre otros (Raj, et al. 2014).

La existencia en *G. lamblia* de sistemas como el glutatión (GSH) y la enzima superóxido dismutasa (SOD) es controvertida, debido a que aunque los genes que codifican para las enzimas que forman parte de estos sistemas se encuentran presentes en el genoma de éste parásito, los experimentos para probar su utilización han mostrado resultados ambiguos. En 1988 Smith y colaboradores no pudieron demostrar la presencia y actividad de las enzimas endógenas del ciclo del GSH sino hasta que trataron a las células con GSH endógeno, por lo cual propusieron que *G. lamblia* podría poseer un sistema análogo al del GSH dependiente de tioles, los cuales podría captar de una fuente exógena (Smith, et al 1988). Por otro lado, estos mismos investigadores no encontraron actividad de SOD; sin embargo, el grupo de Lindmark demostró lo contrario en la cepa Portland-1, por lo que se requiere de más estudios para confirmar o descartar estos hallazgos (Smith, et al. 1988, Lindmark et al. 1980, Thompson, et al.1993).

Introducción

En contraste con estos sistemas, la ausencia de catalasa en *G. lamblia* es inequívoca (Lindmark, *et al.* 1980, Brown, *et al.* 1995, Smith, *et al.* 1988).

Más tarde, Brown y colaboradores propusieron a las enzimas NADH oxidasa, NADH peroxidasa y tioredoxina reductasa, así como a los tioles de bajo peso molecular tales como la cisteína (Cys), el tioglicolato, el sulfito y la coenzima A, como parte del sistema antioxidante de *G. lamblia* (Brown, *et al.* 1993, Brown, *et al.* 1995).

En 2001 Biagini y colaboradores propusieron que el piruvato además de ser un componente central en el metabolismo de los organismos diplomonádidos, también funge como potencial antioxidante al reaccionar con peróxido de hidrógeno en *G. lamblia* y en *Hexamita inflata*, siendo este último un protista flagelado microaerófilico de vida libre emparentado con *Giardia* (Biagini, *et al.* 2001).

Hasta el momento se han encontrado 5 enzimas disulfuro isomerasa en *G. lamblia*, las cuales catalizan la formación de puentes disulfuro y re arreglos vía reacciones de intercambio tiol-disulfuro, para el correcto plegamiento de proteínas de secreción, previo a modificaciones posteriores y transporte. Además, se sugirió que estas enzimas pueden reflejar un mecanismo ancestral de plegamiento proteico en el retículo endoplásmico de organismos eucariontes (McArthur, *et al.* 2001). También se aisló y caracterizó una tioredoxin reductasa de 35 kDa involucrada en la ruptura de disulfuros y con un amplio espectro de sustratos (Brown, *et al.* 1996).

Además de todos estos sistemas de defensa antioxidante, *G. lamblia* contiene L-Cisteína, la cual es el tiol de bajo peso molecular más abundante en su citoplasma. Este aminoácido en su forma reducida funciona como sistema de defensa ante el estrés oxidante y como mecanismo para mantener el ambiente intracelular reducido (Raj, *et al.* 2014).

3.6.1.1 La cisteína y sus propiedades

La Cys es un aminoácido muy diverso a nivel funcional, esto es debido a su grupo radical tiol o sulfhidrilo (SH), el cual es ionizable; cuando se desprotona, genera un grupo tiolato con carga neta negativa, lo que dispara su reactividad, cabe mencionar que ambas formas son nucleofílicas (reaccionan cediendo un par de electrones libres para formar un enlace covalente), aunque los tiolatos son mejores nucleófilos que los tioles. El equilibrio tiol-tiolato varía con el pH y estará desplazado hacia una especie u otra dependiendo del ambiente protéico y celular en el que se encuentre (Figura 7) (Poole, *et al.* 2015).

Cisteína

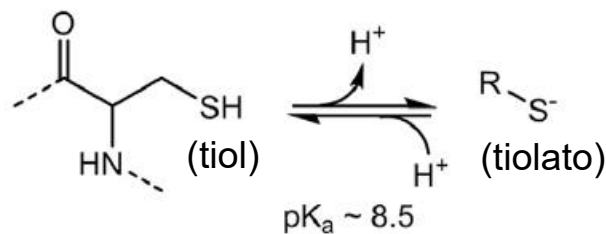


Figura 7. Estructura del residuo cisteinilo en las proteínas, las líneas punteadas representan los enlaces peptídicos que flanquean al residuo en cada extremo. Imagen modificada de Poole, *et al.* 2015.

Introducción

Una manera conveniente de detectar la tendencia de un grupo tiol a ser desprotonado en un intervalo de pH, es refiriéndose a su pKa, es decir, el pH en el que la población de tiolatos y tioles es igual, un valor aproximado para los residuos de Cys es de 8.5; sin embargo, en las proteínas será más bajo o más alto, dependiendo del ambiente local electrónico, es decir, en un ambiente electropositivo, en el que prevalecen los donadores de hidrógenos, el pKa será más bajo, por la estabilización del grupo tiolato y viceversa, en un ambiente hidrofóbico o electronegativo, el pKa tiende a aumentar por desestabilización de la cadena lateral. También es importante mencionar que este fenómeno de protonación/desprotonación afecta las poblaciones relativas de las 2 especies, entonces los cocientes tiol/tiolato cambiarán significativamente con pequeños cambios en el pH, persistiendo un pequeño porcentaje de tiolatos incluso a varias unidades de pH por debajo del pKa. Se debe hacer énfasis en la velocidad con que ocurren las reacciones de protonación/desprotonación de los tioles, puesto que es lo que tiende a dominar en la determinación de cuál de las múltiples reacciones que compiten, ocurrirá en el dinámico y complejo ambiente celular (Poole, *et al.* 2015).

En las células la mayoría de los grupos tiol y disulfuro se encuentran como el aminoácido cisteína o su forma disulfuro, la cistina (Figura 8) (Hansen, *et al.* 2009).

Introducción

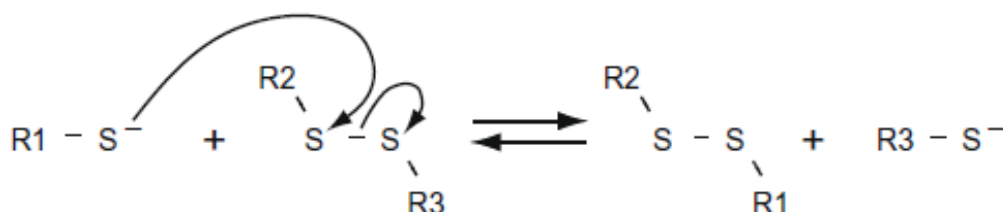
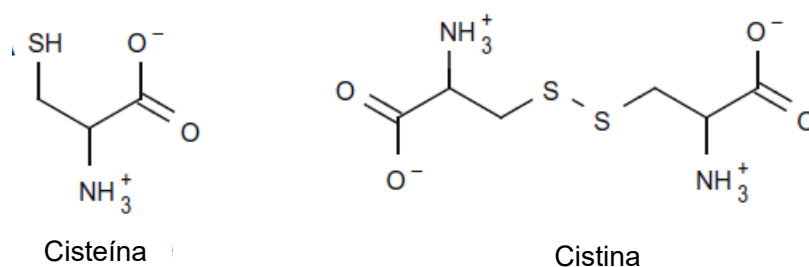


Figura 8. Las diferentes formas de la cisteína y esquematización de las reacciones de intercambio de disulfuros. Figura tomada de Hansen *et al.* 2009.

El anión tiolato es uno de los nucleófilos biológicos más fuertes, es decir, reacciona cediendo un par de electrones libres para formar un enlace covalente, esto convierte a la cisteína en uno de los residuos más reactivos en las proteínas, formando enlaces disulfuro cuya generación y remoción se lleva a cabo mediante reacciones de intercambio de dichos enlaces covalentes (Figura 8). Este mecanismo es central en los sistemas redox de los seres vivos y es iniciado por el ataque nucleofílico de un grupo tiolato a un enlace disulfuro, lo que lleva a la oxidación del grupo tiol nucleofílico y a la reducción del grupo sulfuro saliente. Además, se debe tomar en cuenta que *in vivo* existe un equilibrio de la relación tioles-disulfuros (Figura 8) (Hansen, *et al.* 2009).

Los grupos tiol están implicados en varias funciones celulares, actúan como sitios de unión a metales, forman parte de los sistemas de defensa antioxidante y

participan en la formación reversible de enlaces disulfuro, el cual es uno de los mecanismos utilizados para la regulación enzimática, la transducción de señales, la actividad transcripcional y el plegamiento de proteínas (Hansen, *et al.* 2009).

3.6.1.2 El residuo de cisteína en las proteínas

En general, los residuos de Cys deberían ser considerados como hidrofóbicos, principalmente porque se ha visto que su grado de protección del solvente es alto. Algunos autores argumentan que probablemente se deba a una presión de selección durante la evolución, para minimizar la ocurrencia de reacciones inespecíficas con residuos de Cys superficiales (Poole, *et al.* 2015).

Otra propiedad única de los residuos de Cys es su tendencia a estar situados cerca de otros residuos de Cys, esta distribución peculiar ha sido encontrada especialmente en las proteínas de organismos que viven en condiciones ambientales agrestes y tiende a ser característica de sitios de unión a metales o sitios de sensibilidad “redox” (que lleva a la formación de puentes disulfuro) (Poole, *et al.* 2015).

Tomando en cuenta el alto grado de ocultamiento y la tendencia a estar agrupados, los residuos de Cys expuestos a la superficie y que están aislados en una proteína, son la categoría menos conservada para este aminoácido (Poole, *et al.* 2015).

Dentro de la célula, este grupo puede sufrir diversas modificaciones químicas como alquilación por compuestos electrófilos y oxidación por especies reactivas de oxígeno y de Nitrógeno (ROS y NOS). Existen diversos factores que influyen para

Introducción

que una modificación de este tipo ocurra, como el ambiente local en el que se encuentra la Cys, su proximidad a las especies reactivas antes mencionadas, su pKa, su grado de exposición al solvente y su localización subcelular. También pueden ocurrir algunas modificaciones reversibles por acción de los sistemas antioxidantes celulares, como la tio-redoxina, el glutatión, reacción con tioles de bajo peso molecular, formación de ácido sulfénico, S-nitrosación, S-acilación, formación de sulfenamidas y generación de enlaces disulfuro intra e inter proteínas (Figura 9) (Chouchani, *et al.* 2011).

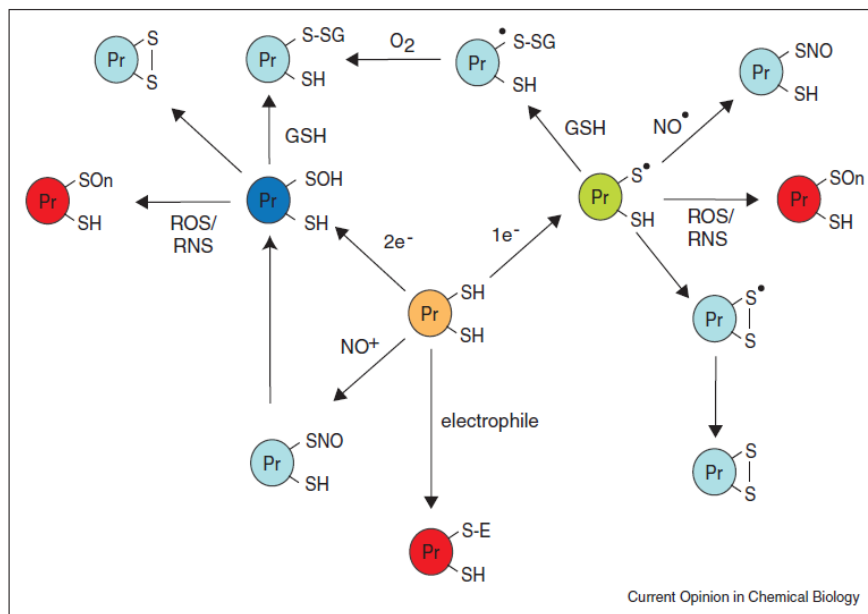


Figura 9. Modificaciones potenciales que pueden contribuir a la regulación del estado redox de una proteína (Pr) y protección contra daño oxidante. Las proteínas que contienen grupos tiol superficiales ("Pr" en color naranja) pueden sufrir oxidación por la pérdida de uno ("Pr" en color verde) o dos electrones ("Pr" en color azul oscuro). La generación de un radical tiol por la pérdida de un electrón puede llevar a la subsecuente "glutationización" por reacción con el glutatión reducido, a la S-nitrosación por reacción con óxido nítrico (NO) o a la formación de un puente disulfuro intra-proteico. La oxidación por pérdida de dos electrones puede llevar a la formación de ácido sulfénico, el cual puede ser modificado por glutatiónización o por la formación de un puente disulfuro intra o inter proteico. Algunos tioles también pueden ser S-nitrosados por especies que contengan NO como el S-nitroso-glutatión. En contraste a estas modificaciones reversibles, los tioles en las proteínas pueden ser alterados de manera irreversible ("Pr en color rojo) por

exposición prolongada a ROS, NOS o por reacción con agentes electrófilos fuertes. Imagen tomada de Chouchani, *et al.* 2011.

3.6.1.3 El contenido de cisteínas en las proteínas de *G. lamblia*

G. lamblia tiene requerimientos particulares de cisteína (Luján, *et al.* 1994), tanto en su forma de aminoácido aislado, como formando parte de sus proteínas (Brown, *et al.* 1993, Thompson, *et al.* 1993). Existen una serie de trabajos que documentan que las proteínas de *G. lamblia* tienen un alto contenido de cisteína comparado con otras especies, entre ellos se encuentra el reporte de Davids y colaboradores, ellos realizaron un análisis del genoma de *G. lamblia* y encontraron que 173 proteínas de este parásito, las cuales están constituidas por más de 400 residuos de aminoácidos, tienen un contenido de más del 10% de cisteína; de éstas, 152 son proteínas integrales de membrana y a su vez 89 pertenecen al grupo de las proteínas variantes de superficie (VSPs por sus siglas en inglés); también encontraron 61 marcos abiertos de lectura que incluyen más de 20 proteínas con las secuencias CxxC y CxC, en donde C significa cisteína y x se refiere a cualquier aminoácido. Además al comparar el genoma de *G. lamblia* con el de otros parásitos, encontraron que 0.63% codifica para proteínas con alto contenido de cisteínas, siendo éste el mayor porcentaje encontrado en el genoma entre los organismos comparados (Tabla 1) (Davids, *et al.* 2006).

Tabla 1. Proteínas con alto contenido de cisteínas en diferentes organismos (Modificada de Davids, et al. 2006).

Organismo	Tamaño del genoma (Mpb)	Proteínas > 400 AA ¹ cuyo contenido de cisteínas es $\geq 10\%$	Proteínas integrales de membrana tipo I (>400 AA)	Proteínas de membrana con alto contenido de cisteínas (HCMp's)	% Genoma*
<i>G. lamblia</i>	12	173	152	61	0.63
<i>T. thermophila</i>	104	285	45	30	0.11
<i>H. sapiens</i>	2,910	28	9	7	0.025
<i>E. histolytica</i>	20	28	17	6	0.06
<i>D. melanogaster</i>	180	18	6	4	0.03
<i>C. elegans</i>	97	39	9	4	0.02
<i>A. thaliana</i>	125	6	4	0	
<i>T. gondii</i>	80	7	3	0	
<i>C. reinhardtii</i>	120	3	1	0	
<i>T. brucei</i>	30	3	1	0	
<i>P. falciparum</i>	23	0	0	0	
<i>S. cerevisiae</i>	12	0	0	0	
<i>C. parvum</i>	10	0	0	0	

¹AA: Aminoácidos

* El porcentaje del genoma está definido como el número de HCMp's/los marcos abiertos de lectura predichos.

3.6.2 Metabolismo energético de *Giardia lamblia*

Al carecer de mitocondrias y de la vía de la fosforilación oxidativa mediada por citocromos, los trofozoitos utilizan las vías de la arginina dihidrolasa y de la glucólisis para la producción de energía en forma de ATP (Jarrol en Luján 2011).

3.6.2.1 Vía de la arginina hidrolasa

Esta vía es utilizada por algunas *Archaeas* como *Thermoplasma acidophilum* y protistas amitocondriados como *Giardia* para generar ATP en condiciones anaerobias. Consta de tres pasos, el primero involucra la hidrólisis de arginina a citrulina y amonio, el cual es catalizado por la arginina deiminasa, seguido de la

Introducción

transferencia de un grupo carbamil de la citrulina al ortofosfato, reacción catalizada por la ornitina carbamil transferasa y finalmente la transferencia del grupo fosforilo del carbamil fosfato al ADP, siendo este último paso catalizado por la carbamato cinasa. A partir de esta vía *Giardia* obtiene 1 ATP por cada molécula de arginina catabolizada (Figura 10) (Li, *et al.* 2009).

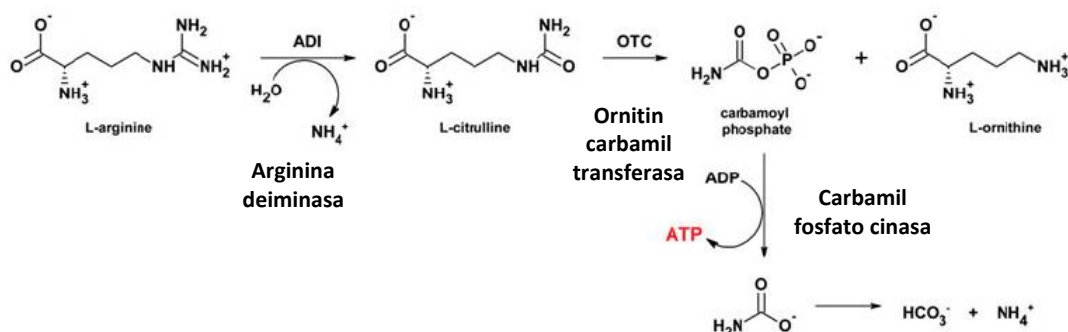


Figura 10. Vía de la arginina deiminasa en *Giardia lamblia* (Tomado de Trejo-Soto, *et al.* 2016).

Por otro lado, se ha reportado que *G. lamblia* es capaz de exportar las dos primeras proteínas de esta vía con el objetivo de consumir la arginina del lumen intestinal e impedir que el organismo huésped tenga el sustrato para la síntesis de óxido nítrico, compuesto que inhibe el crecimiento, el enquistamiento y desenquistamiento del parásito (Rópolo, *et al.* 2010).

3.6.2.3 La glucólisis en *G. lamblia*

La mayoría de los organismos eucariontes llevan a cabo la vía glucolítica Embden-Meyerhof-Parnas, en la que se invierten dos moléculas de ATP como donadores de grupos fosfato, algunos organismos protistas anaerobios han evolucionado para utilizar el pirofosfato (ppi) como donador de grupos fosfato en vez del ATP,

Introducción

en un proceso que se conoce como glucólisis dependiente de pirofosfato. Tal es el caso de *Giardia*, en cuya vía glucolítica se sustituye a las enzimas fosfofructo cinasa y piruvato cinasa por la fosfofructo cinasa y piruvato fosfato dicinasa (PPDK) dependientes de ppi; se asume que de esta manera se hace más eficiente la producción de ATP a partir de esta vía, obteniendo 5 moléculas de ATP en comparación con la glucólisis Embden-Meyerhof Parnas, debido a que este organismo carece de la vía de la fosforilación oxidativa (Figura 11) (Feng, *et al.* 2008).

Introducción

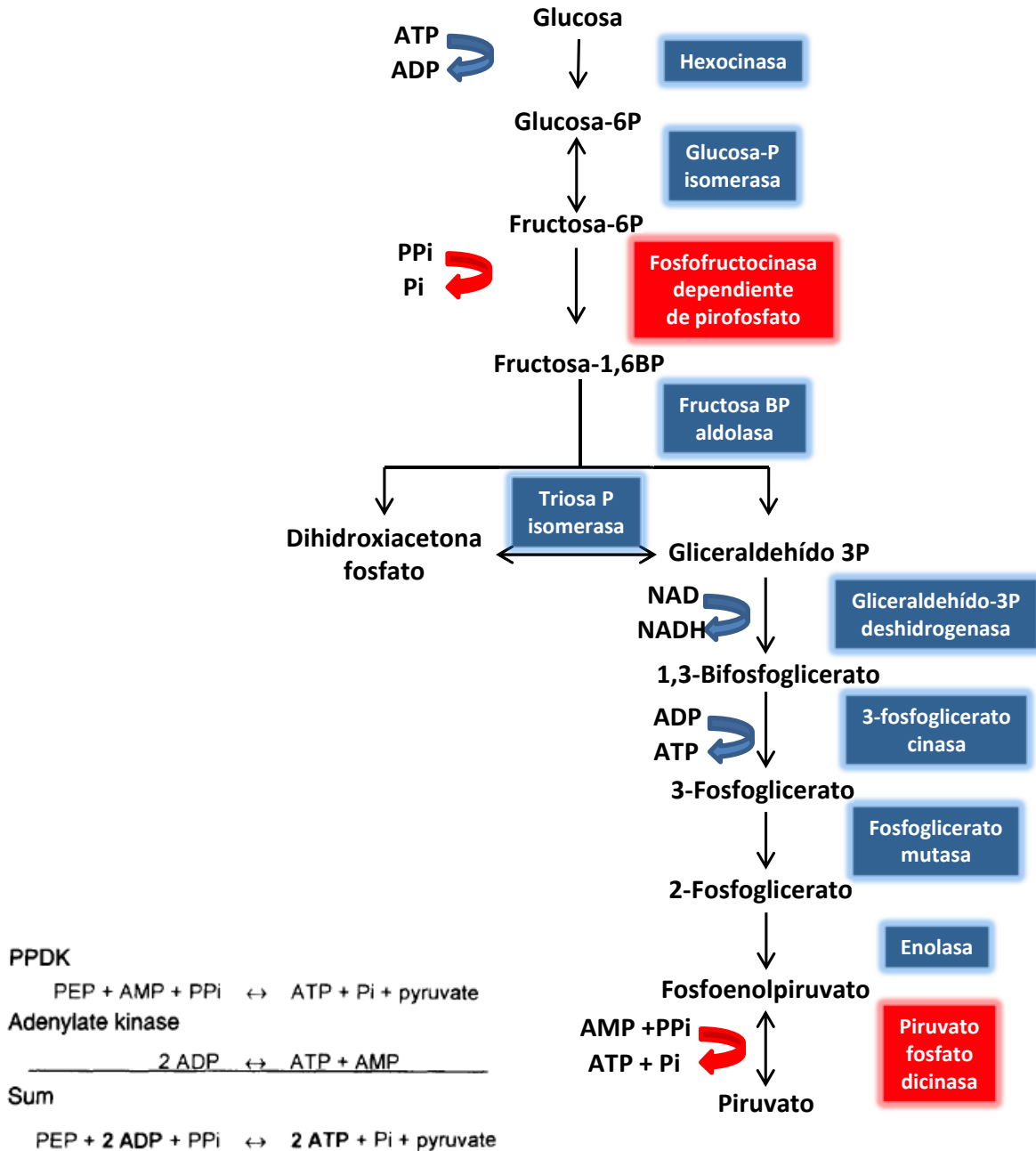


Figura 11. Vía de la glucólisis en *Giardia lamblia*.

Uno de los pasos clave para que la vía glucolítica en *G. lamblia* sea eficiente es la isomerización de la di-hidroxi-acetona fosfato (DHAP) a gliceraldehído 3-fosfato

(GAP) mediante la acción catalítica de la triosafosfato isomerasa (TIM), esto es debido a que el GAP es el único que sigue la vía hasta sus productos finales (Figura 11). Desai y colaboradores sugirieron que si se inactiva o elimina la TIM, la ganancia neta de ATP se vería comprometida, lo cual resultaría en un déficit energético que afectaría la sobrevivencia del parásito (Desai, *et al.* 2008).

Varios grupos de trabajo han propuesto a la TIM de otros parásitos como blanco para el desarrollo de fármacos antiparasitarios, en regiones donde se pueden encontrar diferencias con respecto a la TIM de humano (HuTIM) (Álvarez, *et al.* 2010, López-Velázquez, *et al.* 2013).

3.7 La triosafosfato isomerasa

Esta enzima glucolítica tiene una alta eficiencia catalítica del orden de 10^9 , se le considera como una enzima casi perfecta, de tal manera que su actividad sólo está limitada por la difusión del sustrato en el medio (Wierenga, *et al.* 2010). Esta enzima es el prototipo del motivo estructural barril $(\beta/\alpha)_8$, el cual está formado por ocho láminas β rodeadas de ocho α -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, los cuales se encuentran situados en la región central del barril y se han conservado entre diferentes especies (Richard, *et al.* 2014) (Figura 12).

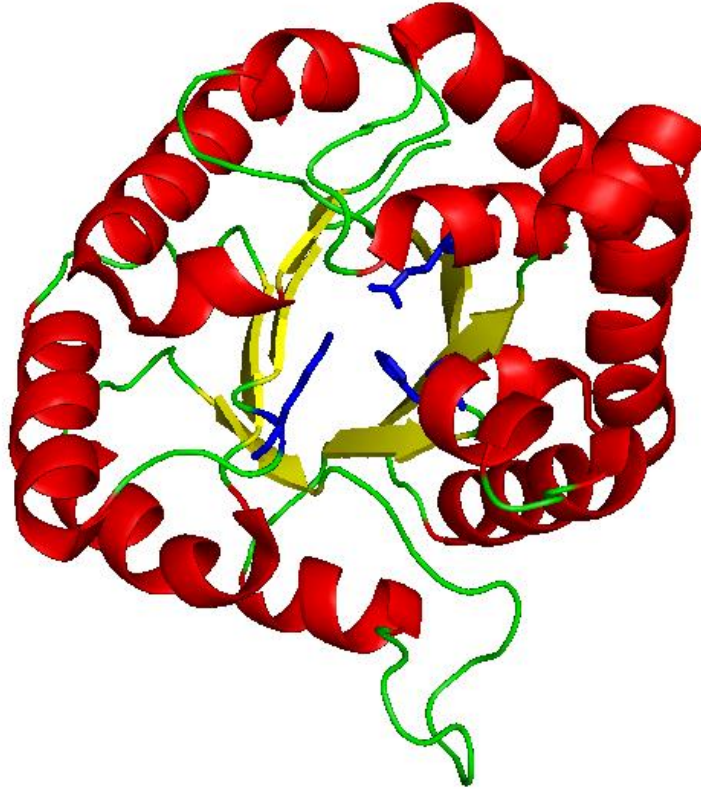


Figura 12. Estructura terciaria de la TIM en formato de asas y listones, las láminas β -plegadas se muestran en amarillo, las α -hélices en color rojo, los bucles que las unen se muestran en color verde. Los residuos del sitio activo se muestran en color azul. Cristal PDB 2DP3 publicado por Reyes-Vivas *et al.* 2007, Ref PDB. Figura generada con el programa Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC).

3.7.1 La triosafosfato isomerasa de *Giardia lamblia* y su contenido de cisteínas

La TIM de *G. lamblia* (GITIM) tiene 257 residuos aminoácidos y su masa molecular es de 27.9 kDa. Esta proteína cuenta con un mayor número de cisteínas (cinco) distribuidas a lo largo de la cadena polipeptídica en comparación con las de otras especies (López-Velázquez, *et al.* 2004) (Figura 13). La C14 forma parte de la interfase; la C127 es un residuo altamente conservado y está ubicado en el núcleo hidrofóbico de la enzima; y las C 202, 222 y 228 se encuentran ubicadas hacia la superficie de la proteína (Reyes-Vivas, *et al.* 2007).

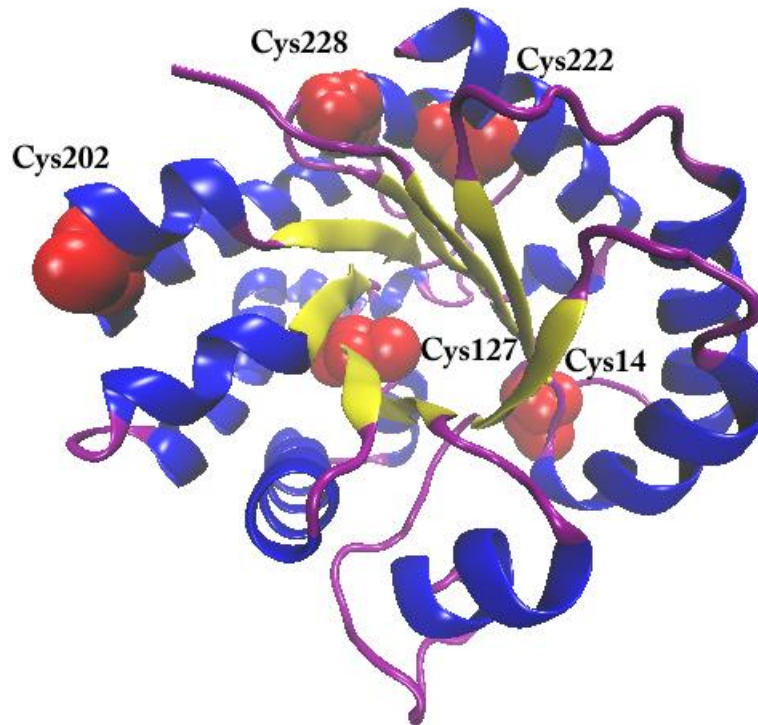


Figura 13. Estructura terciaria de la GITIM. En rojo se muestran las cinco cisteínas que contiene. Figura generada con el programa Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC).

3.7.1.2 La formación de oligómeros de GITIM

En la mayoría de los organismos mesofílicos estudiados, se ha encontrado que la unidad funcional de esta enzima es el homodímero, el cual se forma por interacciones débiles entre dos monómeros; sin embargo, existen algunas especies extremófilas como *Pyrococcus woesei* en las que se ha encontrado que la TIM forma tetrámeros mediante interacciones hidrofóbicas, como mecanismo de termo estabilidad (Walden, *et al.* H). Incluso se sabe que en algunas bacterias como *Thermotoga marítima* esta enzima se encuentra formando hetero-tetrámeros fusionada con la fosfoglicerato cinasa (Maes, *et al.* 1999).

Introducción

Uno de los hallazgos más importantes acerca de la GITIM es el hecho de que es capaz de formar tetrámeros e incluso oligómeros mayores al dímero y que además lo hace mediante la formación de enlaces covalentes de tipo puente disulfuro. Experimentos de cromatografía de exclusión molecular, SDS-PAGE, western blot y cristalografía, permitieron proponer que la formación del tetrámero está dada por un enlace disulfuro entre las Cys 202 de cada par de dímeros participantes, además se vio que este fenómeno tiene un componente funcional, ya que la formación del tetrámero disminuye la *k_{cat}* de la enzima en un 50% (López-Velázquez, *et al.* 2004) (Figura 14).

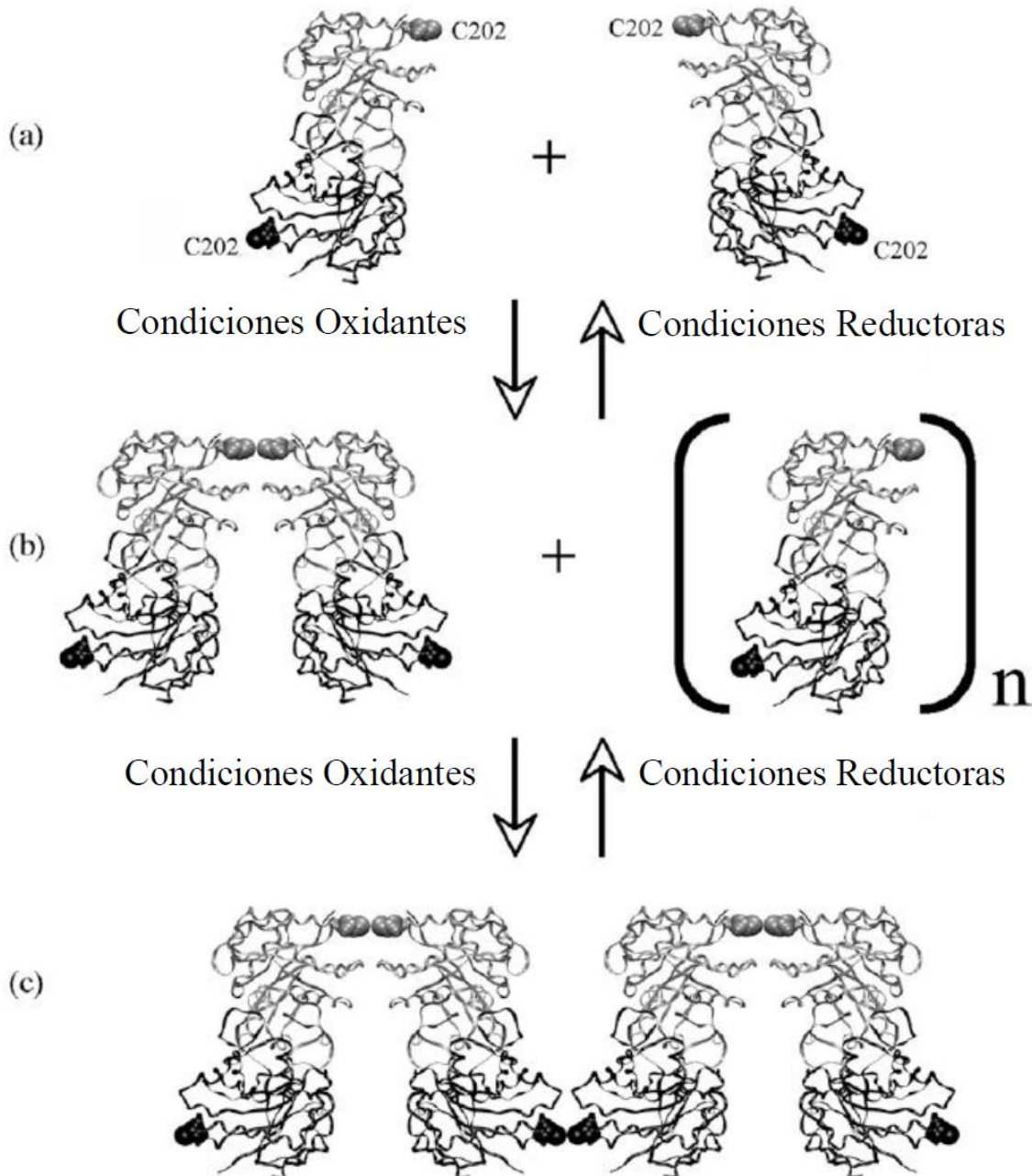


Figura 14. Modelo de polimerización/despolimerización de GITIM mediante la formación y ruptura de enlaces disulfuro entre las cisteínas. A) Se muestran dos dímeros de GITIM, cuyas cisteínas 202 se encuentran ubicadas en caras opuestas, de acuerdo a la estructura cristalográfica. B) Se observa la formación de un enlace disulfuro entre las cisteínas 202 de cada par de dímeros participantes formando un tetrámero, así como su reversibilidad bajo condiciones reductoras, para obtener nuevamente dos dímeros. C) Mecanismo propuesto para la formación de multímeros de GITIM, el tetrámero formado podría reaccionar con otros dímeros, para dar lugar a multímeros, en dicho modelo únicamente participan las cisteínas 202. Imagen tomada de Reyes-Vivas, *et al.*, 2007.

3.7.1.3 La cisteína 222 de GITIM

Por otro lado, también se propuso que la C222 es capaz de formar un puente disulfuro intracatenario con la C228, lo cual también podría ser un factor determinante para la disminución de la *k_{cat}*. Con el objeto de elucidar el mecanismo por el cual la formación de un enlace que se encuentra “lejos” del sitio activo afectaba la catálisis, se realizaron estudios de dinámica molecular y se propuso que cuando se genera el puente disulfuro intracatenario, se promueve la pérdida de dos puentes de hidrógeno que dan soporte a la Serina 216, la cual forma parte del motivo “YGGG” que hace contacto con el asa catalítica. Este motivo está altamente conservado y su afectación junto con los cambios que suceden en el asa 6 (asa catalítica) y de la hélice 7 parecen ser los responsables de la afectación funcional de la enzima (Reyes-Vivas, *et al.* 2007, Hernández-Alcántara, *et al.* 2013).

3.7.1.4 La distribución *in situ* de GITIM

Inicialmente, al estudiar la distribución *in situ* de esta proteína, se reportó que tenía una distribución homogénea a manera de una enzima soluble clásica (Reyes-Vivas, *et al.* 2007). Sin embargo, el análisis a fondo y con mayor precisión sugiere fuertemente que se distinguen al menos dos regiones diferenciadas de distribución de GITIM en el trofozoito; una de distribución citoplásmica a manera de una proteína soluble y otra organizada en regiones enriquecidas hacia la periferia del trofozoito que sugieren fuertemente la presencia de GITIM en vesículas periféricas (datos no publicados). En los quistes se han encontrado oligómeros de alto peso

Introducción

molecular (mayores a dímeros y tetrámeros) con una distribución principalmente contigua a la cara interna de la membrana citoplasmática y con una menor concentración que en los trofozoitos (Reyes-Vivas, *et al.* 2007) (Figura 15).

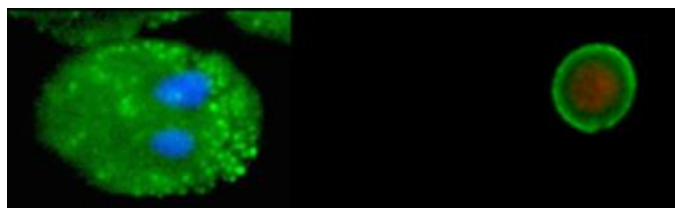


Figura 15. Distribución *in situ* de GITIM en trofozoitos de *G. lamblia* (imagen original de este trabajo) y en quistes (imagen cortesía del Dr. López-Velázquez G.). Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia.

El hecho de que la GITIM exista tanto en forma de dímeros como en oligómeros mayores al dímero mediante enlaces disulfuro, así como que las dos especies oligoméricas tengan actividad catalítica diferente, y tomando en cuenta que la formación y ruptura de enlaces disulfuro de las proteínas en general puede funcionar como un mecanismo de regulación enzimática (Hansen 2009), nos planteamos las siguientes preguntas de investigación:

¿Cómo es la biogénesis de los oligómeros de GITIM originados por enlaces covalentes tipo disulfuro? ¿Cuáles condiciones propician la polimerización y despolimerización de los oligómeros de GITIM?, ¿Cuál es el significado biológico de la distribución diferencial *in situ* de esta enzima? y ¿cuál es la implicación biológica que tienen todos estos hallazgos en este parásito?

Una respuesta probable es que tenga que ver con el paso de trofozoito a quiste y viceversa. Lo cual podría representar una estrategia de infección de este parásito no descrita aún.

4. OBJETIVOS

4.1 General.

Caracterizar funcional y estructuralmente *in vitro* e *in situ* a las mutantes sencillas y múltiples de cisteínas de la triosafosfato isomerasa de *Giardia lamblia*.

4.2 Particulares.

4.2.1 Construir los genes *gltim* con las mutaciones sencillas C202A, C222A y C228A; así como las mutaciones múltiples C202A/C222A, C202A/C228A, C222A/C228A y C202A/C222A/C228A e incorporarlos a vectores de transfección para *Giardia*.

4.2.2 Generar las enzimas recombinantes con las mutaciones múltiples y obtener sus parámetros cinéticos y estructurales en general.

4.2.3 Estandarizar la técnica de transfección en trofozoitos de *G. lamblia* con las construcciones de GITIM previamente generadas.

4.2.4. Generar cepas de *G. lamblia* con el gen sustituido de *gltim* con las mutaciones sencillas C202A y C222A; así como la mutación múltiple C202A/C222A.

4.2.5. Describir la distribución *in situ* de la GITIM en el trofozoito y el quiste en las cepas que contienen los genes de *gltim* con las mutaciones sencillas y múltiples y compararlo con las cepas silvestres (Wt).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas bacterianas

- ❖ *E. coli* TOP 10 F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*. Utilizada para mantenimientos del plásmido pJet1.2/blunt con las diferentes construcciones del gen *gltim*.
- ❖ *E. coli* BL21 (DE3) pLysS F⁻ *ompT* *hsdS_B* (*r_B⁻m_B⁻*) *gal* *dcm* (DE3) pLysS (Cam^R). Para la expresión de las proteínas GITIM silvestre y mutantes.

5.2 Medios de cultivo

-Las cepas bacterianas utilizadas se cultivaron en medio Luria Bertani (Tryptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 10g/L) con ampicilina (100 μ g/mL), se adicionaron 20g/L de agar para el caso de medio sólido.

-Medio TYI completo para cultivo de *G. lamblia*

BBL Casein Digest Peptona	100 g
Extracto de Levadura	50 g
Glucosa	50 g
NaCl	10 g
Buffer de fosfatos 10 mM, pH=7.0. K ₂ HPO ₄ (50g), KH ₂ PO ₄ (30g), H ₂ O destilada c.b.p. 1L.	100 mL

Solución A:

L-Cisteína	1 g
------------	-----

Materiales y Métodos

Ac. Ascórbico	0,05 g
H ₂ O destilada	20 mL

Llevar a pH 7,0 con NaOH 1 N

Solución B Bilis Bovina 6,5%

Solución C 228 mg de Citrato de amonio
férico en 100 mL de H₂O
destilada

Solución Final

Antibióticos: 5000 U de Penicilina y 5000 U de Estreptomina

Medio Básico	100 ml
Suero Fetal o Suero Bovino Adulto	50 ml
Solución A	20 ml
Solución B	4 ml
Solución C	1,5 ml
H ₂ O destilada c.b.p	500 ml

Esterilizar por FILTRACIÓN

-Medio TYI de pre enquistamiento para cultivo de *G. lamblia*

Se prepara igual que el medio completo pero **sin bilis**.

-Medio TYI de enquistamiento para cultivo de *G. lamblia*

Se prepara medio de pre enquistamiento más **bilis porcina** (225mg/500ml de medio). Se lleva la mezcla a pH= 7,8. Esterilizar por filtración. Agregar Ac. Láctico (125 mg en 25 ml de H₂O destilada) utilizando un filtro de jeringa.

5.3 Construcción de los genes *gltim* con las mutaciones múltiples de cisteína

Para obtener las mutantes múltiples de cisteína del gen *gltim* se utilizó la técnica de mutagénesis sitio dirigida mediante sobrelapamiento y extensión reportada por Ho y colaboradores (Ho 1989). A continuación se describe a detalle la técnica para obtener la doble mutante C202A/C228A, misma que se siguió para obtener todas las mutantes múltiples de este trabajo.

Se partió de la mutante sencilla carente de la cisteína 202 (C202A), se utilizaron los oligonucleótidos mutagénicos previamente reportados (Enríquez-Flores 2011) para insertar el cambio del codón 228 TGT que codifica para cisteína, por GCT que codifica para alanina. El gen *gltim* C202A se encuentra clonado en el plásmido pET3a-HisTev, cuyo sitio múltiple de clonación está flanqueado por las secuencias promotora y terminadora de la transcripción T7 (Figura16).

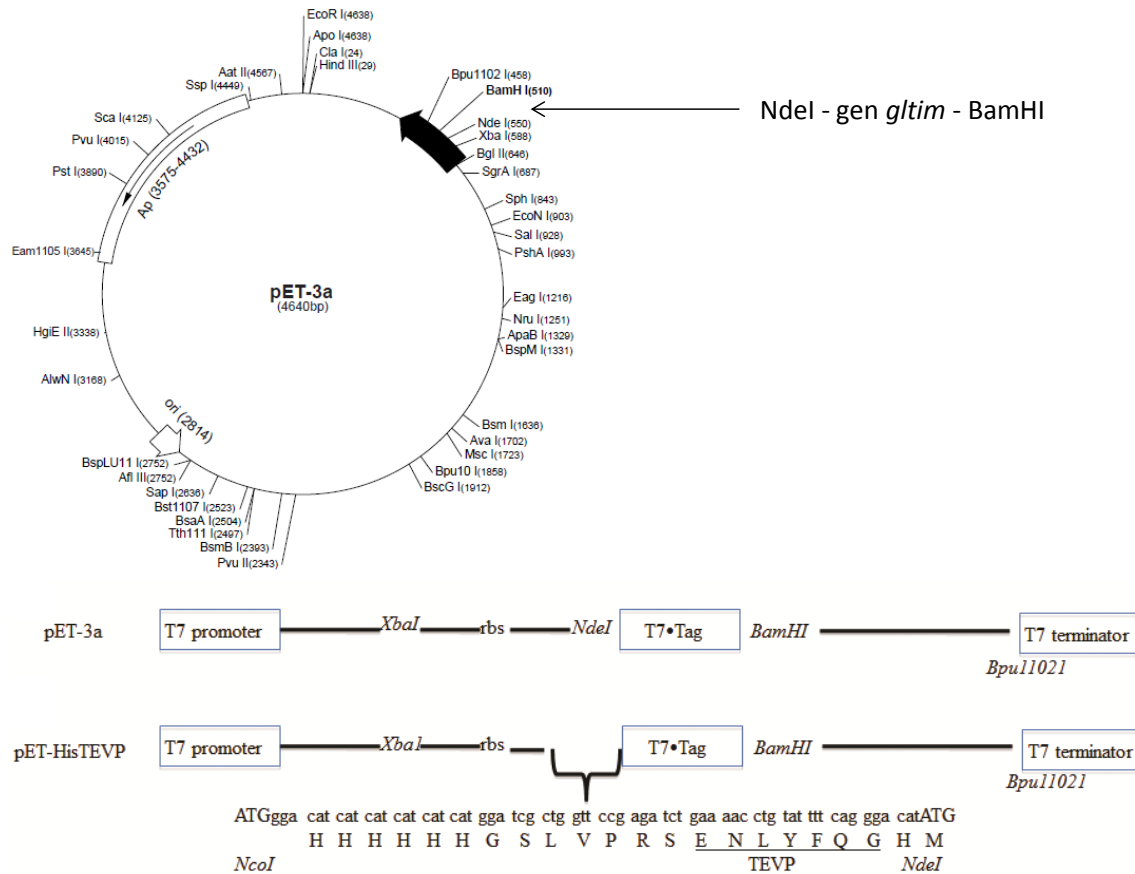


Figura 16. Vector de expresión pET3a-HisTev en el que se encuentra clonado el gen *gltim* C202A (Enríquez-Flores 2011).

En una primera reacción de amplificación (PCR1) se utilizó como oligonucleótido en sentido 5'→3' al de la región promotora T7 y como oligonucleótido reverso al mutagénico C228A. Posteriormente se realizó una segunda PCR (PCR2) utilizando como oligonucleótido en sentido 5'→3' al mutagénico C228A y como oligonucleótido reverso al de la región de terminación de la transcripción T7. En una tercera reacción de PCR (PCR3), se obtuvo el gen *gltim* amplificado y con la mutación deseada; como DNA templado se utilizaron los productos de las dos reacciones de PCR mencionadas previamente, los cuales son complementarios en

Materiales y Métodos

sus extremos 3' y 5', como cebadores se utilizaron los oligonucleótidos de las regiones T7 promotora y terminadora de la transcripción (Figura 17).

En todas estas reacciones de PCR se utilizaron 200ng de dNTPs, de DNA templado y de los oligonucleótidos; así como 0.5 unidades de la enzima DNA polimerasa Phusion (Thermo Scientific), todo esto en un volumen de reacción de 100 micro litros. El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

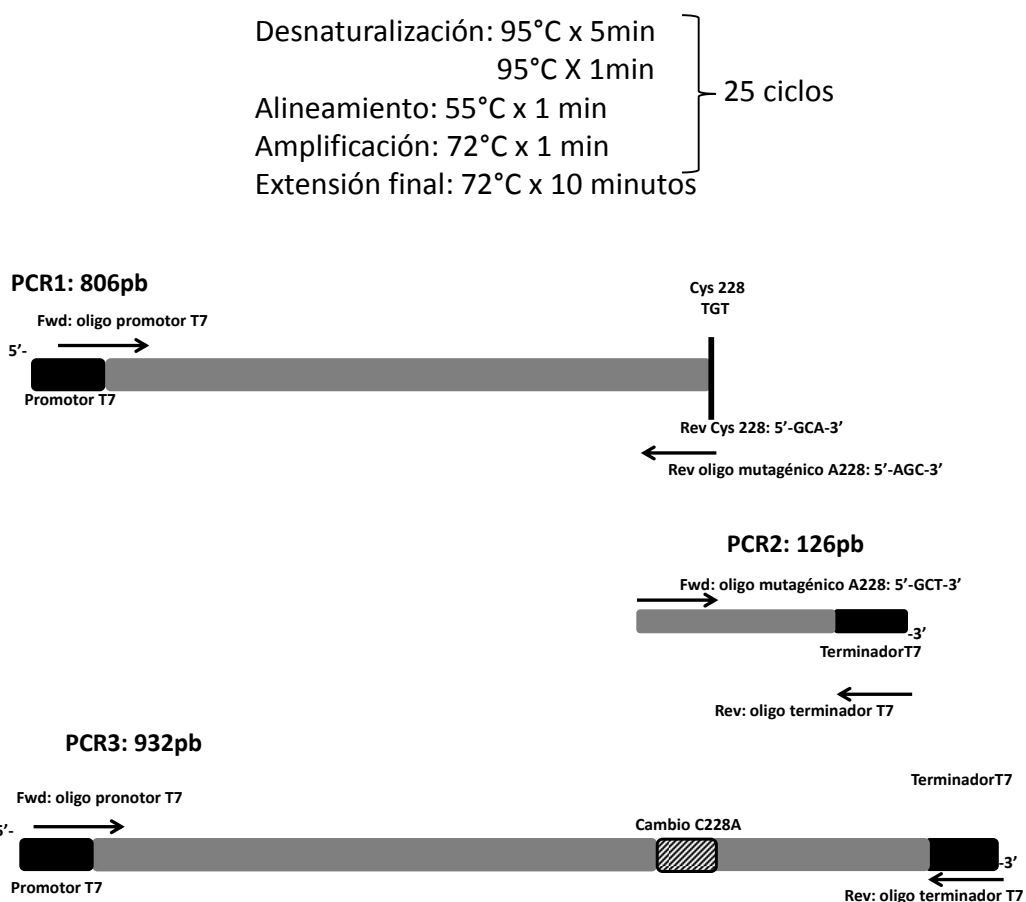


Figura 17. Generación de las enzimas recombinantes con las mutaciones dobles C202A/C222A, C202A/C228A, C222A/C228A mediante la técnica de mutagénesis sitio dirigida de PCR por solapamiento y extensión.

5.3.1 Purificación de los productos de PCR

Los productos del PCR3 se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% y las bandas obtenidas se purificaron utilizando el kit QIAquick Gel Extraction de Qiagen. Los amplicones purificados se cuantificaron con un espectrofotómetro NanoDrop.

5.3.2 Clonación de los genes *gltim* mutantes al vector de mantenimiento pJET 1.2/Blunt

Se utilizó el vector pJET 1.2/Blunt, el cual se encuentra linearizado, con extremos romos y listo para llevar a cabo la ligación del gen de interés. Este plásmido tiene un marcador de selección por resistencia a ampicilina y también cuenta con otro marcador de selección que consiste en la interrupción de un gen letal para *E. coli* cuando se inserta el gen de interés en el plásmido, con lo cual se asegura la sobrevivencia de aquellas bacterias que hayan sido transformadas únicamente con el plásmido y el inserto y no con el plásmido religado. Es importante mencionar que este plásmido tiene dos sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *Bgl*II, los cuales se encuentran flanqueando el sitio múltiple de clonación, esto permite realizar pruebas posteriores a la transformación para verificar de la inserción del gen de interés (Figura 18).

choque térmico con los plásmidos pJet1.2/Blunt con las diferentes construcciones del gen *gltim*. Se tomaron como clonas positivas aquellas resistentes a ampicilina.

5.3.2.3 Pruebas de confirmación de las clonaciones

5.3.2.3.1 PCR de cultivo

Las clonas positivas se disolvieron en 20 μ L de agua y se tomó 1 μ L de ésta disolución como DNA templado para una reacción de PCR en la que se utilizó como oligonucleótido en sentido 5'→3' al de la región promotora T7 y como oligonucleótido reverso al mutagénico C228A. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis para verificar la amplificación del gen *gltim*.

5.3.2.3.2 Digestiones con las enzimas *NdeI* y *BamHI*

Las clonas en cuyas reacciones de PCR se amplificó un producto correspondiente al tamaño del gen *gltim*, se propagaron en medio de cultivo sólido, posteriormente se purificó DNA plasmídico con el Kit Miniprep GeneJet Plasmid DNA Extraction Kit de QIAgen y se sometió a electroforesis una alícuota del DNA purificado para verificar la integridad del plásmido. Debido a que el gen *gltim* fue diseñado con los extremos 5'-*NdeI* y 3'-*BamHI*, 50ng de los plásmidos purificados se digirieron con las enzimas *NdeI* y *BamHI* a 37°C durante 45 minutos para verificar la liberación del inserto de 774pb. El producto de la digestión se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio al 0.01%.

5.3.2.3.3 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 de las regiones T7 promotora y terminadora de la transcripción para verificar que únicamente se hubieran producido las mutaciones deseadas. Posteriormente se tomaron alícuotas de las clonas con las mutaciones confirmadas, se incubaron hasta llegar a la fase log de crecimiento (D.O. de 0.6 a 600mn) y se almacenaron a -70°C en medio LB con ampicilina a una concentración de 100µg/mL y glicerol al 9%.

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

5.3.3.1 Digestión de los genes *gltim* y del plásmido pET3aHisTev con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*

Ciento cincuenta nano gramos del plásmido PCR1.2/Blunt con las diferentes construcciones de los genes *gltim* mutantes, así como 50 ng del plásmido pET3aHisTev, fueron sometidos a digestión con las enzimas *NdeI* y *BamHI* a 37°C durante 45 minutos. Ambos productos de digestión fueron purificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

5.3.3.2 Ligación de los genes *gltim* al plásmido pET3aHisTev

Se ligaron 150 ng los genes *gltim* mutantes con 50 ng del plásmido pET3aHisTev, se utilizaron 5U de la enzima T4 ligasa (Thermo Scientific), las reacciones se llevaron a cabo durante dos horas a 22°C.

5.3.3.3 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. Se tomaron como clonas positivas aquellas resistentes ampilicina.

5.3.3.4 Pruebas de confirmación de las clonaciones

5.3.3.4.1 PCR de cultivo

La clonas positivas se disolvieron en 20 µL de agua y se tomó 1 µL de ésta disolución como DNA templado para una reacción de PCR en la que se utilizó como oligonucleótido en sentido 5'→3' al de la región promotora T7 y como oligonucleótido reverso al mutagénico C228A. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis para verificar la amplificación del gen *gltim*.

5.3.3.4.2 Digestión con las enzimas *NdeI* y *BamHI*

Las clonas en cuyas reacciones de PCR se amplificó un producto correspondiente al tamaño del gen *gltim*, se propagaron en medio de cultivo sólido, posteriormente se purificó DNA plasmídico con el Kit Miniprep GeneJet Plasmid DNA Extraction

Kit de QIAGEN y se sometió a electroforesis una alícuota del DNA purificado para verificar la integridad del plásmido. Debido a que el gen *gltim* fue diseñado con los extremos 5'-*Nde*I y 3'-*Bam*HI, 50 ng de los plásmidos purificados se digirieron con las enzimas *Nde*I y *Bam*HI a 37°C durante 45 minutos para verificar la liberación del inserto de 774pb. El producto de la digestión se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

5.3.3.4.3 Secuenciación de genes después de la subclonación

Aquellas clonas cuyas pruebas confirmatorias resultaron positivas se sometieron a secuenciación automatizada mediante el método de Sanger, utilizando los oligonucleótidos de las regiones T7 promotora y terminadora de la transcripción para verificar que únicamente se hubieran producido las mutaciones deseadas. Posteriormente se tomaron alícuotas de las clonas con las mutaciones confirmadas y se almacenaron a -70°C en medio LB con glicerol al 9%.

5.4 Expresión de las enzimas GITIM mutantes

5.4.1 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 el kit Miniprep GeneJet Plasmid DNA Extraction de QIAGEN y se sometieron a electroforesis 3µL del DNA purificado para verificar la integridad de los plásmidos. Las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS se transformaron con 2 µL de los plásmidos purificados y se seleccionó una colonia

positiva para su posterior propagación y pruebas confirmatorias de digestión con las enzimas *NdeI* y *BamHI* a 37°C durante 45 minutos, para la verificación de la liberación del inserto del tamaño de 774pb esperado. El producto de la digestión se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio al 0.01%. Posteriormente se tomaron alícuotas de las clonas positivas, se incubaron hasta llegar a la fase log de crecimiento (D.O. de 0.6 a 600mn) y se almacenaron a -70°C en medio LB con ampicilina a una concentración de 100µg/mL y glicerol al 9%.

5.5 Expresión de las enzimas GITIM recombinantes

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 600mn se ajustó a 0.1 y se incubó durante el tiempo necesario para alcanzar una densidad óptica de entre 0.8 y 1 a 600nm. Una vez que se alcanzó el crecimiento deseado de las células, se indujo la expresión de las proteínas añadiendo al medio de cultivo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0.4mM, se incubó durante 12 a 15 horas a 30°C en agitación constante a 160rpm.

5.6 Purificación de las enzimas GITIM recombinantes

La purificación se realizó mediante la técnica de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC por sus siglas en inglés), utilizando una resina con ácido imino-di-acético, el cual contiene unido un átomo de Níquel (Ni^{2+}) mediante un enlace de coordinación. El principio de separación se basa en la afinidad del 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 y se re-suspendieron en 40 mL de solución amortiguadora de lisis que contenía Tris 50mM (pH 8.0), NaCl 50 mM, fluoruro de metil-sulfonilo (PMSF) 0.2mM como inhibidor de proteasas.

Las proteínas fueron purificadas tanto en presencia como en ausencia de β -mercaptoetanol, el cual se adicionó al amortiguador de lisis con el objeto de evaluar la influencia de un agente reductor sobre la capacidad de oligomerización de GITIM.

Posteriormente las células se lisaron mediante sonicación a 4°C y las fracciones celulares soluble y membranal se separaron mediante centrifugación a 9000 rpm durante una hora. La fracción soluble se hizo pasar por la resina de Ni^{2+} (5mL) empaquetada en una columna, misma que fue previamente equilibrada con solución amortiguadora de lisis; se colectó la fracción que no se unió a la resina (not binding NB), seguido del lavado de la resina con 10 volúmenes de columna con la misma solución amortiguadora. La proteína adsorbida en la columna se eluyó con 25mL de solución amortiguadora de lisis que contenía imidazol 250mM,

posteriormente se dializó con disolución amortiguadora de Tris 50mM, pH 8 y se concentró a un volumen final de 250-500 μ L con ultra filtros Amicon centrifugando a 4000rpm a 4°C. Se determinó la concentración de la proteína mediante su coeficiente de absorptividad a 280nm.

A la mitad de las proteínas se les eliminó la etiqueta de histidinas mediante exposición a la proteasa del virus del tabaco (TEV) durante mínimo 16 horas a temperatura ambiente, en presencia de DTT 1mM, posteriormente dicha etiqueta y la proteasa se separaron de la proteína haciéndola pasar por una columna que contenía resina IMAC, la digestión y purificación se corroboró con una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE por sus siglas en inglés Sodium dodecyl sulphate poliacrylamide gel electrophoresis). Las proteínas se dializaron en disolución amortiguadora de trietanolamina 100mM, pH 7.4, EDTA 10mM (TE) y se almacenaron a 4°C.

5.7 Determinación de los parámetros cinéticos de las enzimas GITIM recombinantes

La cinética se determinó midiendo la actividad de las proteínas dobles mutantes a diferentes concentraciones de sustrato gliceraldehído 3-fosfato (GAP) (0.25-10 mM), mediante el ensayo espectroscópico acoplado a la enzima α -glicerol-fosfato deshidrogenasa (α -GDH) (Figura 19), de acuerdo a lo reportado por Enríquez-Flores *et al.* 2011.

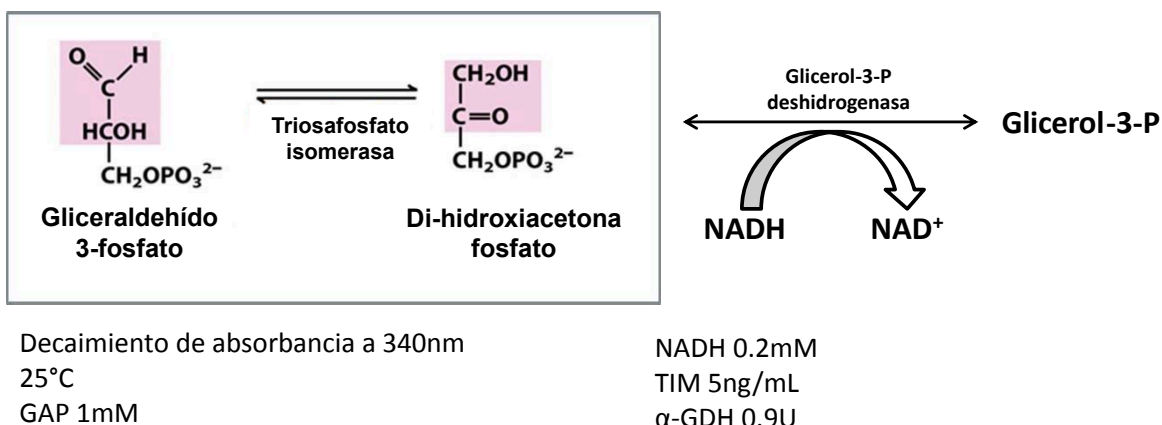


Figura 19. Método para determinación de actividad enzimática (Enríquez-Flores *et al.* 2011).

5.8 Evaluación de la estructura secundaria de las enzimas recombinantes

5.8.1 Determinación del espectro de dicroísmo circular de las enzimas mutantes

Para evaluar la estructura secundaria de las enzimas recombinantes, se registró el espectro de dicroísmo circular en el UV lejano (190-240nm) a una muestra de 0.1mg/mL de proteína diluida en amortiguador de fosfatos 25mM, pH 7.4, utilizando un espectro polarímetro marca Jasco, modelo J-810 y una celda de cuarzo de 0.1 cm de longitud.

5.8.2 Determinación de la temperatura media de desnaturalización de las enzimas recombinantes

La estabilidad de las proteínas mutantes se determinó midiendo su desnaturalización en función del incremento en la temperatura en una rampa de 20 a 90°C, con incrementos de 1°C por minuto, se registró el cambio en la señal

de dicroísmo circular a 222nm y se calculó la temperatura media de desnaturalización de acuerdo a lo reportado por Hernández-Alcántara *et al.* 2013.

5.9 Caracterización de la génesis de los oligómeros en las GITIM recombinantes

La formación del tetrámero se siguió para la enzima silvestre y para las mutantes, mediante SDS-PAGE, para ello, una vez que se obtuvo la proteína purificada tanto en presencia como en ausencia de β -mercaptoetanol, se prepararon alícuotas a una concentración de 3.4mg/mL y se almacenaron a 4°C. Cada semana se utilizó una alícuota de proteína para someterla a SDS-PAGE, posteriormente se foto documentaron los geles y se determinaron las densitometrías de las bandas correspondientes a los pesos moleculares del dímero y el tetrámero respectivamente.

5.9.1 Determinación en tiempo real del tetrámero de GITIM mediante ataque nucleofílico de la Cys 202 reducida a la Cys 202 oxidada

Para demostrar que la formación del tetrámero se da mediante un enlace covalente de tipo puente disulfuro entre cisteínas en estados redox opuestos, se utilizó el reactivo de Ellman (ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzónico (DTNB)), el cual reacciona con cisteínas libres oxidándolas (Figura 20).

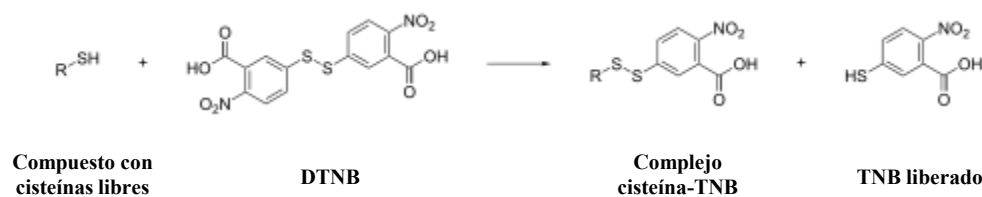


Figura 20. Esquema de reacción del reactivo de Ellman. Los grupos tiol del compuesto problema reaccionan con el DTNB para liberar una molécula de TNB, la cual absorbe la luz a 412nm.

Para llevar a cabo el experimento, se utilizaron 400 µg de GITIM Wt previamente tratada con DTT, para homogenizar la población a proteínas en estado reducido, posteriormente se eliminó el exceso de DTT por el método de filtración por centrifugación con una columna de Penefsky (Penefsky 1979). La mitad de estas proteínas se oxidó adicionando una cantidad equimolar de DTNB, la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos, posteriormente la mezcla se filtró nuevamente en la columna de Penefsky para eliminar el DTNB que no hubiera reaccionado. Se registró la absorbancia inicial a 412nm que resultó de adicionar la proteína unida al TNB a la celda del espectrofotómetro, en el espectro se observa la aparición de un primer pico (*), el cual representa la señal inicial de la proteína unida al TNB, se continuó con el registro de la absorbancia hasta que la señal se estabilizó nuevamente a una respuesta basal, posteriormente se adicionó a la celda de la reacción la mitad restante de la proteína reducida.

5.10 Generación de cepas de *G. lamblia* que sobre expresan GITIM

Para generar la cepas de *G. lamblia* que sobre expresan los genes *gltim* mutantes carentes de cisteínas, se realizó una subclonación de las construcciones previamente obtenidas al vector de expresión pTubHA-NTerm proporcionado amablemente por el Dr. Hugo D. Luján de la Universidad Católica de Córdoba, Argentina (Figura 21).

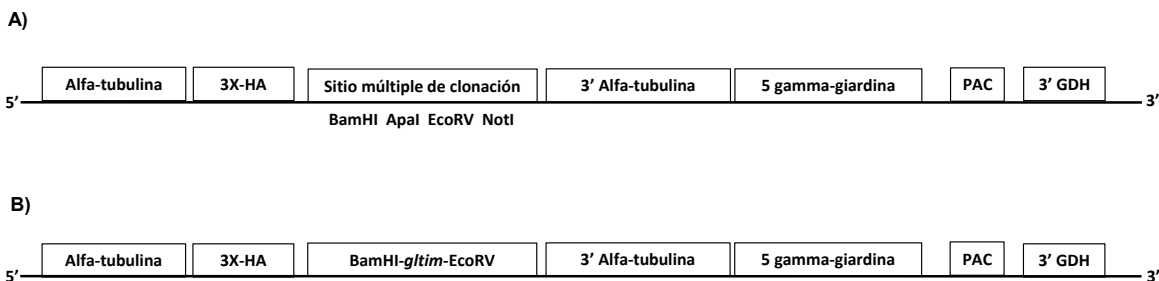


Figura 21. Mapa esquemático. A). Plásmido pTubHA-Nterm. B). Plásmido pTubHA-Nterm con el gen *gltim* insertado.

5.10.1 Diseño de oligonucleótidos para la generación de los sitios de restricción *BamHI-EcoRV* en los genes *gltim* mutantes

Para la generación de los sitios de restricción se diseñaron oligonucleótidos para generar los sitios de restricción 5'-BamHI-EcoRV-3' (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados.

Nombre	Secuencia	Descripción
HISNHHACOHNCO1F	5'-CATTTCCATGGGACATCATC-3'	Inserción del sitio de restricción NcoI en el inicio del gen <i>gltim</i> para su subclonación en el plásmido pTubHA-Cterm, conservando el His-Tag en el extremo amino-terminal.
HACOHECO5R	5'-GAACGATATCTATGTACGGG-3'	Inserción del sitio de restricción EcoRV al final del gen <i>gltim</i> para su subclonación en el plásmido pTubHA-Cterm, conservando el His-Tag en el extremo amino-terminal.
HACOHNCOIF	5'-AGGGACCCATGGCTGCTCG -3'	Inserción del sitio de restricción NcoI en el inicio del gen <i>gltim</i> , para su subclonación al plásmido pTubHA-Cterm, <u>eliminando</u> el His-Tag del extremo amino terminal.
HANHBAMHIF	5'-TTTCAGGGATCCATGCCTGC-3'	Inserción del sitio de restricción BamHI al inicio del gen <i>gltim</i> para su subclonación al plásmido pTubHA-Nterm, eliminando el His-Tag del extremo amino.

5.10.2 Generación de los sitios de restricción *Bam*HI-*Eco*RV en los genes *gltim* mutantes mediante PCR

Una vez que se sintetizaron los oligonucleótidos, se identificaron las condiciones óptimas de las reacciones de PCR para amplificar los diferentes genes *gltim* Wt y el mutante C202A para generar los sitios de restricción antes mencionados. Se realizaron dos pruebas que incluyeron varias temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos para lograr que la amplificación del gen fuera específica y eficiente (Figura 22).

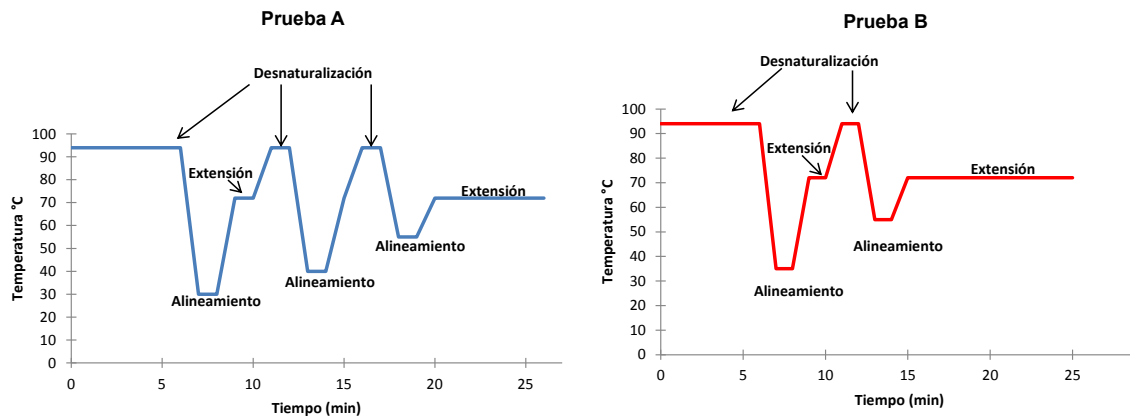


Figura 22. Gráfico de las reacciones de PCR probadas.

5.10.3 Sub-clonación de los genes *gltim* mutantes al plásmido de sobre expresión pTub-Nterm

A partir de los productos de PCR obtenidos previamente, se hizo una digestión doble con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RV, así como digestión del plásmido pTubHA-Nterm con las mismas enzimas para posteriormente realizar la ligación y transformación de células *E. coli* DH5-alfa competentes con el producto de dicha ligación. Estas células tienen como marcador de selección la resistencia

a ampicilina. Se aisló DNA plasmídico de las clonas positivas, el cual fue utilizado para llevar a cabo la confirmación de la adecuada subclonación mediante secuenciación.

5.10.4 Transfección de trofozoitos de *G. lamblia* con las diferentes construcciones de GITIM silvestre y mutantes

La transfección de células de *G. lamblia* cepa WB, se llevó a cabo de acuerdo a la metodología reportada por Singer *et al.* 1998, la cual consiste en poner cultivos confluentes de *G. lamblia* en contacto con 20 µg de los diferentes plásmidos pTubHA-Nterm-GITIM-C202A, Wt y CWP-2; posteriormente se llevan a cabo dos pulsos de electroporación a un voltaje de 350V, resistencia de 725 Ohm y capacitancia de 1000 µF, después las células se siembran en medio de cultivo fresco y se dejan en recuperación durante 24 horas, posteriormente se adiciona puromicina al medio a una concentración final de 50 micro gramos/mL para seleccionar aquellas células que introdujeron el plásmido y a lo largo de una semana se evalúa la viabilidad de las mutantes observando el cultivo al microscopio (Singer, *et al.* 1998) (Figura 23).

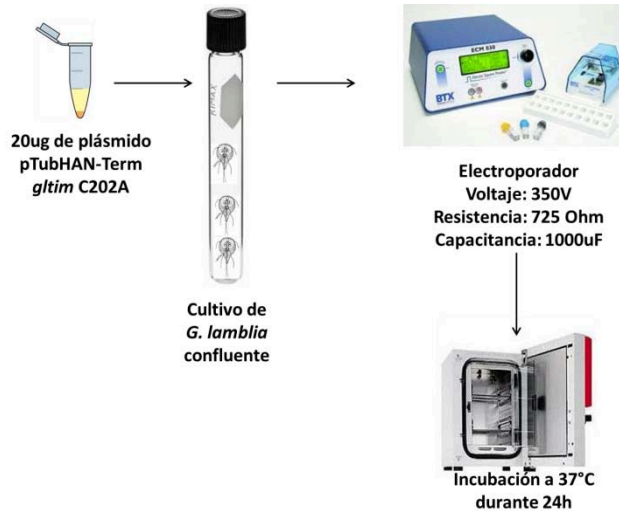


Figura 23. Transfección por electroporación de *G. lamblia*.

5.11 Determinación de la distribución *in situ* de GITIM-Wt y la mutante C202A mediante microscopía de fluorescencia

A partir de concentrados celulares por centrifugación de *G. lamblia*, se cultivaron tanto cepas silvestres como transfectadas con GITIM mutantes en portaobjetos durante 30 min a 37°C, en cámara húmeda, con medio TYI completo. Posteriormente, se lavó el medio de cultivo con buffer PBS, Cys 0.2% y ac. Ascórbico 0.01% y las células se fijaron en metanol al 100%, -20°C, 4 min. Después, las células adheridas se lavaron 3 veces con buffer PBS y se incubaron por 1 h en anticuerpo primario (Tabla 3), se lavaron 3 veces con PBS a temperatura ambiente por 5 min cada lavado. Se incubaron en anticuerpo secundario (Tabla 2) por 1 ½ h en cámara húmeda a temperatura ambiente, en oscuridad. Se lavaron 3 veces en PBS y se incubaron con DAPI (4', 6-diamidino-2'-phenylindole, dihydrochloride) por 5 min a una concentración de 1 microgramo/

Materiales y Métodos

mL para teñir los núcleos celulares. Se retiró el exceso de DAPI y se montaron con medio de montaje DABCO (Sigma) o Vectashield (Vector). Los trofozoitos se observaron y fotografiaron en un microscopio invertido de epifluorescencia Axiovert (Carl Zeiss) con una lámpara de 100W.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia

Anticuerpo 1 ^{ario}	Desarrollado en	Dilución de trabajo	Anticuerpo 2 ^{ario}	Dilución de trabajo
anti-GITIM (policlonal)	conejo	1:500	anti IgG conejo-FITC	1:2000
¹ 5B11(monoclonal)	ratón	1:500	anti IgG ratón-FITC	1:2000
² HA (monoclonal)	ratón	1:500	anti IgG ratón-Rhodamin	1:2000

¹ Reconoce la cathepsina B3 en PVs.

² Reconoce el péptido YPYDVPDYA de la hemaglutinina del virus de la influenza.

5.12 Cinética de enquistamiento de *G. lamblia* cepa WB y su relación con GITIM

Con el objetivo de analizar más a detalle el comportamiento de GITIM silvestre en diferentes etapas del proceso de enquistamiento de *G. lamblia*, se realizaron ensayos de western blot con lisados celulares obtenidos a diferentes tiempos después de inducir las células al enquistamiento. La inducción a enquistamiento se realizó incubando cultivos confluentes en medio de pre-enquistamiento, el cual no contiene bilis bovina durante dos días, posteriormente, las células se lavaron con solución amortiguadora de PBS y se les adicionó medio de enquistamiento, el cual contiene bilis porcina al 6.5%.

5.13 Determinación de la capacidad de enquistamiento de las cepas de *G. lamblia* que sobre expresan GITIM Wt, C202A y la proteína 2 de la pared del quiste (CWP-2)

Se indujeron a enquistamiento cultivos confluentes de cada una de las cepas de *G. Lamblia* transfectadas con la construcción GITIM Wt, C202A y con la proteína 2 de la pared del quiste (CWP-2) llevando HA en el extremo amino terminal. La inducción al enquistamiento se realizó como se explicó en la sección anterior. Posteriormente, se realizó el conteo de trofozoitos vivos y de quistes utilizando cámara de Neubauer.

5.14 Generación de anticuerpos policlonales anti-GITIM en ratón

Se sobre expresó y purificó la enzima GITIM recombinante (C202A) para llevar a cabo inmunizaciones en 3 ratones de la cepa Balb/c, para ello se les administraron 30 micro gramos de la enzima pura por vía intraperitoneal de manera semanal, a partir de la tercer semana se colectaron muestras de sangre y se hicieron ensayos de western blot con la proteína recombinante, así como con lisados de *G. lamblia* utilizando diferentes diluciones del suero para probar la sensibilidad y especificidad del anticuerpo generado.

6. RESULTADOS

6.1 Construcción de los genes *gltim* con las mutaciones múltiples de cisteínas.

En cada una de las reacciones de PCR realizadas se obtuvieron los productos de los tamaños esperados y con un rendimiento adecuado (figura 24).

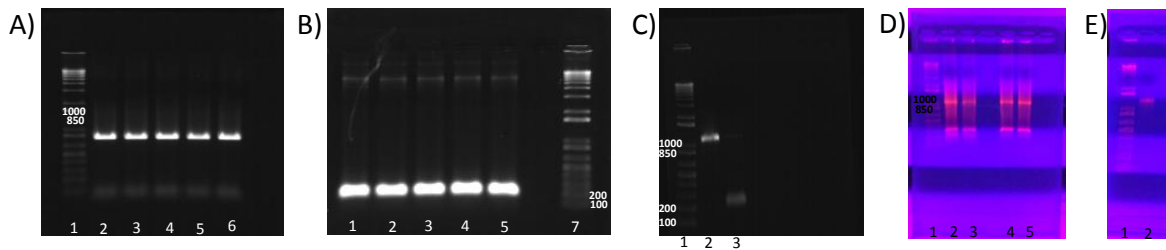


Figura 24. Construcción de la doble mutante de GITIM C202A + C228A.

A) PCR 1. Pozos: 1: Marcador de peso molecular; 2-6: Producto de 806pb. B) PCR 2. Pozos: 1-5 Producto de 126pb; 7: Marcador de peso molecular. C) Productos de los PCRs 1 y 2 purificados. Pozos: 1: Marcador de peso molecular; 2: PCR 1 purificado; 3: PCR2 purificado. D) PCR3. Pozos: 1. Marcador de peso molecular; 2,3,5,6: Producto de 906 pb. E) PCR3 purificado. Pozos: 1: Marcador de peso molecular; 2: Producto del PCR 3 purificado.

El producto del PCR3 obtenido se ligó 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, en la figura 25 se muestra una prueba positiva.

Resultados

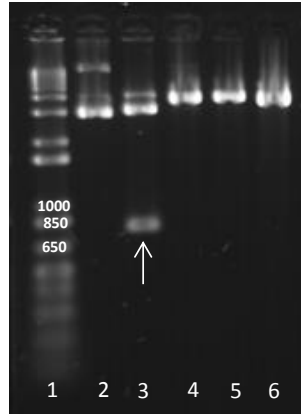


Figura 25. Pruebas de digestión con NdeI, BamHI para monitoreo de clonas de la doble mutante C202A-C228A del gen *gltim*. Pozos: 1: Marcador de peso molecular. 2, 4, 5 y 6: Prueba negativa. 3: Prueba positiva, se liberó un inserto correspondiente al tamaño del gen *gltim* (754pb, banda señalada con la flecha).

El DNA plasmídico de esta clona se secuenció utilizando los oligonucleótidos del plásmido pJET1.2blunt en ambas direcciones 5'-3' y 3'-5'. Se obtuvieron electroferogramas de buena calidad. Se verificó que la secuencia del gen *gltim* obtenido coincidiera con la secuencia de referencia (NW_002477110.1) (Sitio de internet del Gene Bank) y que únicamente tuviera los cambios para la sustitución de las cisteínas 202 y 228 por alaninas (Figura 26). Posteriormente se llevó a cabo la subclonación de los genes mutantes al plásmido de expresión pET3aHisTev y la posterior transformación de cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

Resultados

```

Range 1: 4 to 777Graphics Next Match Previous Match
Alignment statistics for match #1 Score Expect Identities
1408 bits(762) Gaps Strand 770/774 (99%) 0/774 (0%) Plus/Plus
0.0

Query 1 ATGCCTGCTCGTCGCCCTTCATCGGCGGTAACCTCAAGTGTAAACGGCTCTCTTGACTTT 60
|
Sbjct 4 ATGCCTGCTCGTCGCCCTTCATCGGCGGTAACCTCAAGTGTAAACGGCTCTCTTGACTTT 63

Query 61 ATCAAGAGCCACGTGGCGGCAATTGCTGCCATAAGATCCCTGATTCGGTGGACGTCGTC 120
|
Sbjct 64 ATCAAGAGCCACGTGGCGGCAATTGCTGCCATAAGATCCCTGATTCGGTGGACGTCGTC 123

Query 121 ATTGCCCTTCGCGCTACACCTGTCAACAGCCATTGGCGCAACACGTCAAACAGTTG 180
|
Sbjct 124 ATTGCCCTTCGCGCTACACCTGTCAACAGCCATTGGCGCAACACGTCAAACAGTTG 183

Query 181 AGGATAGCAGCGCAGAATGTGTACCTAGAGGGGAACGGGGCTGGACTGGCGAGACAAGT 240
|
Sbjct 184 AGGATAGCAGCGCAGAATGTGTACCTAGAGGGGAACGGGGCTGGACTGGCGAGACAAGT 243

Query 241 GTTGAGATGCTTCAGGACATGGGTTTGAAGCATGTGATAGTAGGGCAGCTCTGAAAGAGCG 300
|
Sbjct 244 GTTGAGATGCTTCAGGACATGGGTTTGAAGCATGTGATAGTAGGGCAGCTCTGAAAGAGCG 303

Query 301 AGAATCATGGGGGAGACCGACGAGCAAAGCGCCAAGAAGGCTAAGCGTGCCTGGAAAAG 360
|
Sbjct 304 AGAATCATGGGGGAGACCGACGAGCAAAGCGCCAAGAAGGCTAAGCGTGCCTGGAAAAG 363

Query 361 GGGATGACGGTCATCTTCTGCGTCGGAGAGACCTTGGACGAGCGCAAGGCCAACCGCACC 420
|
Sbjct 364 GGGATGACGGTCATCTTCTGCGTCGGAGAGACCTTGGACGAGCGCAAGGCCAACCGCACC 423

Query 421 ATGGAGGTGAACATCGCCAGCTTGAGGCGCTTGGCAAGGAGCTCGGAGAGTCCAAGATG 480
|
Sbjct 424 ATGGAGGTGAACATCGCCAGCTTGAGGCGCTTGGCAAGGAGCTCGGAGAGTCCAAGATG 483

Query 481 CTCTGGAAGGAGGTTGTCTTGTACGAGCCCGTGTGGTCCATTGGCAGGGCGTGGTG 540
|
Sbjct 484 CTCTGGAAGGAGGTTGTCTTGTACGAGCCCGTGTGGTCCATTGGCAGGGCGTGGTG 543

Query 541 GCCACGCCGAGCAGGAGGAGGATCCATGTGGGGCTCCGAAAGTGGTTTGGCGAGAAG 600
|
Sbjct 544 GCCACGCCGAGCAGGAGGAGGATCCATGTGGGGCTCCGAAAGTGGTTTGGCGAGAAG 603

Query 601 GTTGTGTCGAGGCGGCACAGCATATCCGTATCATTACGGGGATCGGCCAATGGAAGC 660
|
Sbjct 604 GTTGTGTCGAGGCGGCACAGCATATCCGTATCATTACGGGGATCGGCCAATGGAAGC 663

Query 661 AACTGCGAGAAGCTTGGCCAGTTCGGAATATTGACGGCTTCCTTGTGCGTGGCGCTTCC 720
|
Sbjct 664 AACTGCGAGAAGCTTGGCCAGTTCGGAATATTGACGGCTTCCTTGTGCGTGGCGCTTCC 723

Query 721 CTCAAGCCGGAGTTTATGACGATGATCGACATCTTACGAAGACCCGTACATAG 774
|
Sbjct 724 CTCAAGCCGGAGTTTATGACGATGATCGACATCTTACGAAGACCCGTACATAG 777
    
```

Figura 26. Alineamiento de secuencias de DNA del gen *gltim* silvestre (Query) y el gen *gltim* C202A-C228A (Sbjct). En los cuadros rojos se observa el cambio de cisteína por alanina en las posiciones 202 y 228 (sitio web BLAST TOOL).

6.2 Expresión y purificación de las enzimas GITIM recombinantes

Se obtuvieron las diferentes proteínas mutantes purificadas a partir de cultivos de 250-500 mL (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración de proteína de las mutantes de GITIM.

GITIM mutante	Concentración de la proteína purificada (mg/mL)
C202A-C228A	117.14
C202A-C222A	25.12
C222A-C228A	123.09
C202A-C222A-C228A	94.8

Resultados

En la figura 27 se muestra un ejemplo de las purificaciones realizadas.

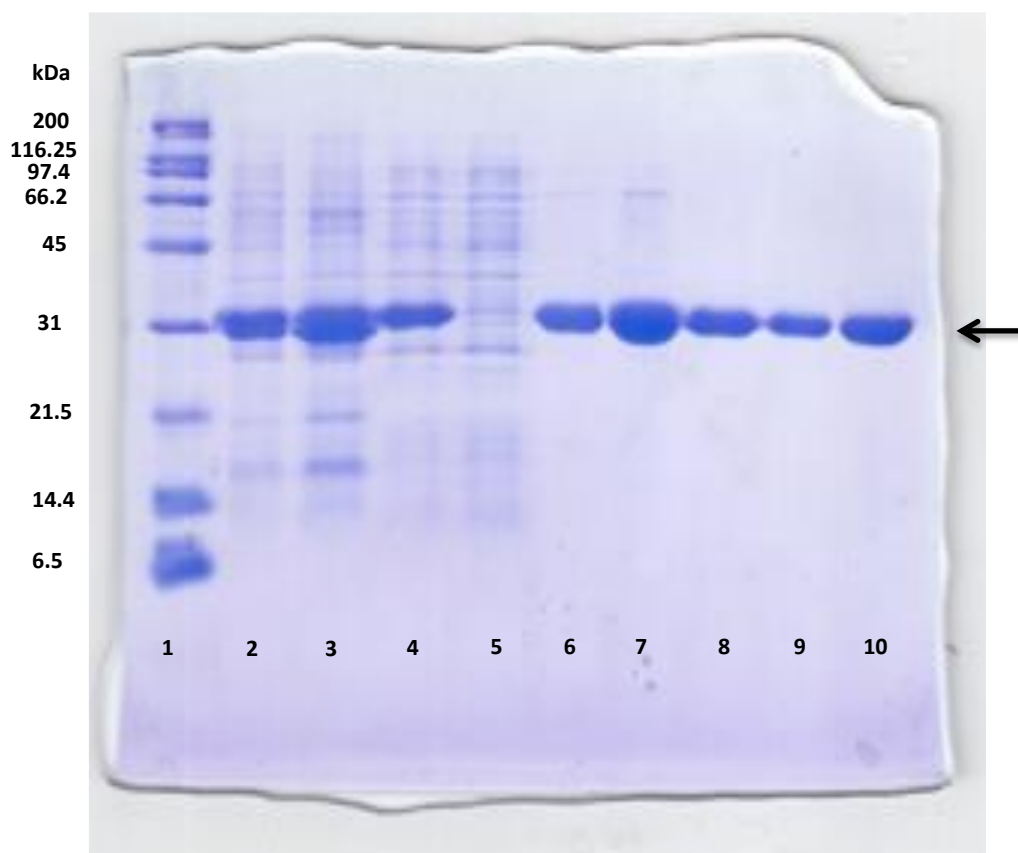


Figura 27. Fracciones de purificación de la enzima recombinante GITIM con la mutación C202A-C228A en SDS-PAGE. Pozos: **1**. Marcador de peso molecular en kDa; **2**. Lisado celular; **3**. Fracción membranal; **4**. Fracción celular soluble; **5**. Fracción que no fue retenida en la columna; **6**. Primera fracción de lavado; **7**. Segunda fracción de lavado, **8**. Fracción de elución; **9**. Proteína concentrada y dializada (10 µg); **10**. Proteína concentrada y dializada (20 µg). La flecha señala la banda correspondiente al monómero de GITIM sobre expresada.

Resultados

Se determinó la actividad enzimática de las diferentes fracciones de purificación (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad enzimática de las fracciones de purificación de GITIM C202A-C228A.

Fracción	Cantidad de proteína total (mg)	Actividad enzimática total ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Actividad enzimática específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)
Lisado	904.5	59,805.54	66.12
Fracción membranal	99.8	7,415.14	74.3
Fracción celular soluble	171	12,862.62	75.22
Fracción no retenida en columna	447.5	31,670.33	70.77
Proteína pura	25.12	75,683.08	3012.86

6.3 Determinación de los parámetros cinéticos de las enzimas GITIM recombinantes

Se determinaron los parámetros cinéticos de las diferentes mutantes de GITIM midiendo la actividad a concentraciones crecientes de sustrato y concentración constante de la enzima (5 ng/mL). La K_m de la mutante carente de las tres cisteínas superficiales aumentó 1.5 veces en comparación con la enzima silvestre; la K_m de la mutante C222A-C228A disminuyó a la mitad de la enzima silvestre (tabla 6). Los parámetros cinéticos del resto de las mutantes no mostraron diferencias significativas en comparación con la enzima silvestre.

Resultados

Tabla 6. Comparación entre los parámetros cinéticos de GITIM silvestre, las mutantes sencillas de cisteínas y las mutantes múltiples obtenidas en el presente trabajo.

Enzima GITIM	K_m por G3P (mM)	K_{cat} (min^{-1})	Eficiencia catalítica K_{cat}/K_m (mM/min)	Referencia bibliográfica
Silvestre (Wt)	0.78	4.6×10^5	5.47×10^5	Enríquez-Flores <i>et. al.</i> 2011 ¹⁹
C202A	0.61	2.9×10^5	4.75×10^5	Enríquez-Flores <i>et. al.</i> 2011 ¹⁹
C222A	1.41	5×10^5	3.68×10^5	Enríquez-Flores <i>et. al.</i> 2011 ¹⁹
C228A	0.4	1.87×10^5	4.6×10^5	Enríquez-Flores <i>et. al.</i> 2011 ¹⁹
C202A-C228A	0.18	1.56×10^5	8.6×10^5	Presente trabajo
C202A-C222A	0.83	4.7×10^5	5.6×10^5	Presente trabajo
C222A-C228A	0.38	3.78×10^5	9.9×10^5	Presente trabajo
C202A-C222A-C228A	1.2	2.35×10^5	1.15×10^5	Presente trabajo

6.4 Evaluación de la estructura secundaria de las enzimas recombinantes

Los espectros de dicroísmo circular de las diferentes mutantes de GITIM fueron similares al de la enzima silvestre (Figura 28 A y B).

La temperatura media de desnaturalización para las mutantes C202A-C228A y C202A-C222A fue de 56.1°C y 55.8 °C respectivamente (Figura 28 C y D).

Resultados

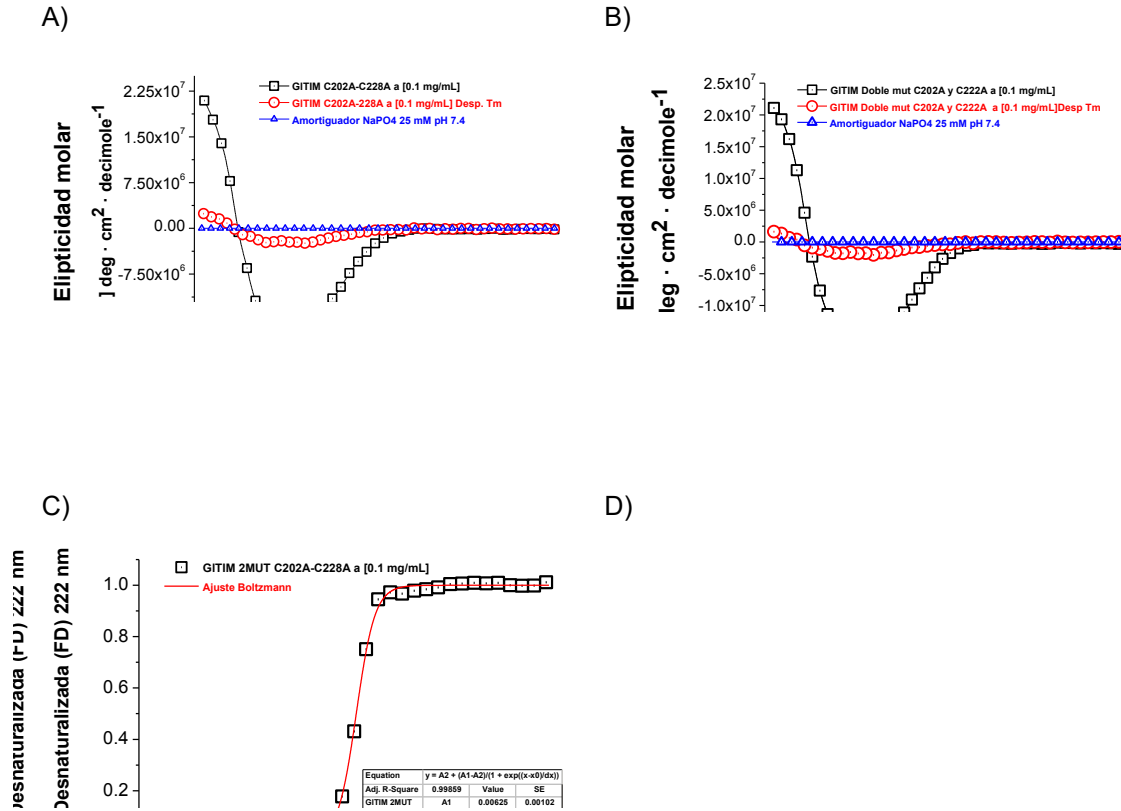


Figura 28. Espectros de dicroísmo circular (A y B) y temperatura media de desnaturalización (C y D) de las enzimas GITIM dobles mutantes C202A-C228A y C202A-C222A.

6.5 Cinética de formación de tetrámeros de GITIM

Dentro de la caracterización estructural se incluyó la descripción de la génesis de los oligómeros de GITIM tanto silvestre como mutantes. La formación del tetrámero se siguió mediante SDS-PAGE durante 1 mes de almacenamiento para las diferentes enzimas, las cuales fueron purificadas tanto en presencia como en ausencia de β -mercaptoetanol. Las figuras 29 a 31 contrastan el tiempo cero contra el tiempo = 1 mes.

Resultados

Cuando las proteínas que no tuvieron tratamiento con agente reductor se sometieron a SDS-PAGE presentaron dos bandas, una correspondiente al peso molecular de 55 kDa y otra de 27 kDa, lo cual es indicativo de la presencia de tetrámeros de GITIM formados mediante enlaces disulfuro entre cada par de dímeros participantes (Figura 14); mientras que las proteínas que fueron tratadas con DTT únicamente presentaron la banda de 27 kD, esto debido a que el tratamiento con el agente reductor escindió el enlace disulfuro.

6.5.1 Oligomerización de GITIM silvestre

Al mes de almacenamiento de la proteína que fue purificada en presencia de β -mercaptoetanol se observó una banda de 55 kDa en una proporción del 54% con respecto a la banda de 27 kDa (Figura 28). Cuando esta fracción fue tratada con DTT, únicamente se observó la banda correspondiente a 27 kDa, indicando la escisión de puentes disulfuro. En cambio, la banda correspondiente a 55 kDa de esta misma proteína cuando fue purificada en ausencia de β -mercaptoetanol, solo presentó el 24% con respecto a la banda de 27 kDa (Figura 29).

Resultados

GITIM Wt purificada con β -mercaptoetanol			Wt purificada sin β -mercaptoetanol		
Tiempo cero	1 mes de almacenamiento		Tiempo cero	1 mes de almacenamiento	
		Incubación con DTT 2h a 25°C			Incubación con DTT 2h a 25°C
% Actividad					
100%	29.2%	101.15%	100%	112.5%	108.8%

Figura 29. Cinética de formación del tetrámero de GITIM Wt mediante SDS-PAGE, purificada en presencia y ausencia de β -mercaptoetanol.

6.5.2 Oligomerización de las mutantes C202A y C202A-C228A

Las mutantes carentes de cisteína 202 no presentaron la banda correspondiente al 55 kDa durante el mes de almacenamiento bajo ninguna de las dos condiciones de purificación, en la figura 30 se muestran como ejemplo la mutante sencilla y una de las dobles.

Resultados

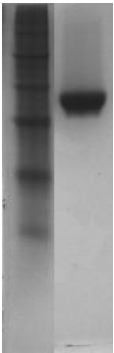

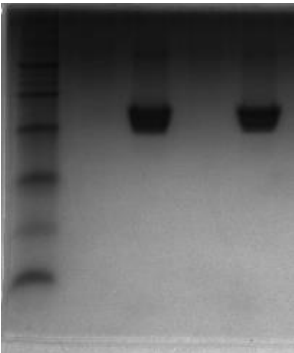

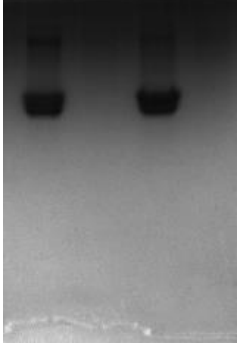
C202A purificada con β -mercaptoetanol				C202A-C228A purificada con β -mercaptoetanol		
Tiempo cero		1 mes		Tiempo cero		1 mes
kDa				kDa		
		Incubada con DTT 2h a 25°C			Incubada con DTT 2h a 25°C	Incubada con DTT 2h a 25°C
% Actividad						
100%	100%	100%	98.1%	100%	100%	90.95%

Figura 30. Seguimiento de la formación de tetrámeros de dos GITIMs mutantes carentes de cisteína 202.

6.5.3 Oligomerización de la mutante C222A

La formación del tetrámero en aquella proteína que fue purificada en presencia de β -mercaptoetanol fue más eficiente (100%) comparada con la enzima que nunca estuvo en contacto con los agentes reductores (90%) (Figura 31). A nivel de actividad enzimática también hubo diferencias como resultado de adicionar o no adicionar agente reductor al momento de la purificación; aquella enzima purificada en presencia de β -mercaptoetanol presentó un 58% de actividad al mes de almacenamiento comparada con aquella proteína que nunca estuvo en contacto con agente reductor, cuya actividad fue del 85% con respecto a la proteína recién purificada.

Resultados

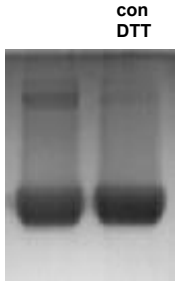
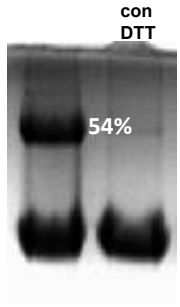

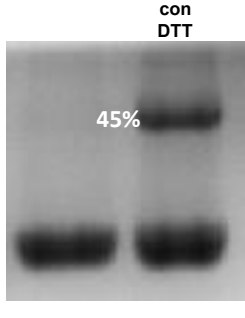
GITIM C222A purificada con β -mercaptoetanol		GITIM C222A purificada sin β -mercaptoetanol	
Día uno	1 mes de almacenamiento	Día uno	1 mes de almacenamiento
			
% Actividad			
100%	58% 57%	100%	85% 124%

Figura 31. Génesis de tetrámeros en la mutante sencilla C222A purificada en presencia y ausencia de β -mercaptoetanol. A un lado de las bandas del dímero se muestran los porcentajes de proteína, de acuerdo a los análisis de densitometría.

6.5.4 Oligomerización de la mutante C228A

La formación de tetrámeros de la mutante carente de cisteína 228 que fue purificada en presencia de β -mercaptoetanol fue similar a la de la enzima silvestre. Al mes de almacenamiento se generó un 100% de tetrámeros y la actividad bajó un 40%, misma que se recuperó al 100% al incubar a la proteína con un agente reductor (Figura 33).

6.5.5 Determinación espectrofotométrica de la formación del tetrámero de GITIM mediante ataque nucleofílico de la Cys 202 reducida hacia la Cys 202 oxidada

Se registró la absorbancia inicial a 412nm que resultó de medir la absorbancia de la proteína GITIM unida a TNB en la celda del espectrofotómetro, en el espectro se observa la aparición de un primer pico (*), el cual representa la señal inicial de la

Resultados

proteína unida al TNB, se continuó con el registro de la absorbancia hasta que la señal se estabilizó nuevamente a una respuesta basal, posteriormente se adicionó a la celda la mitad restante de la proteína reducida. Tras la adición de esta última, se observó un aumento en la señal (**) (Figura 32), lo cual indica que al adicionar GITIM reducida (S^-), ésta desplaza al TNB en la Cys oxidada. El TNB se libera aumentando la absorbancia a 412 nm y formándose oligómeros como resultado.

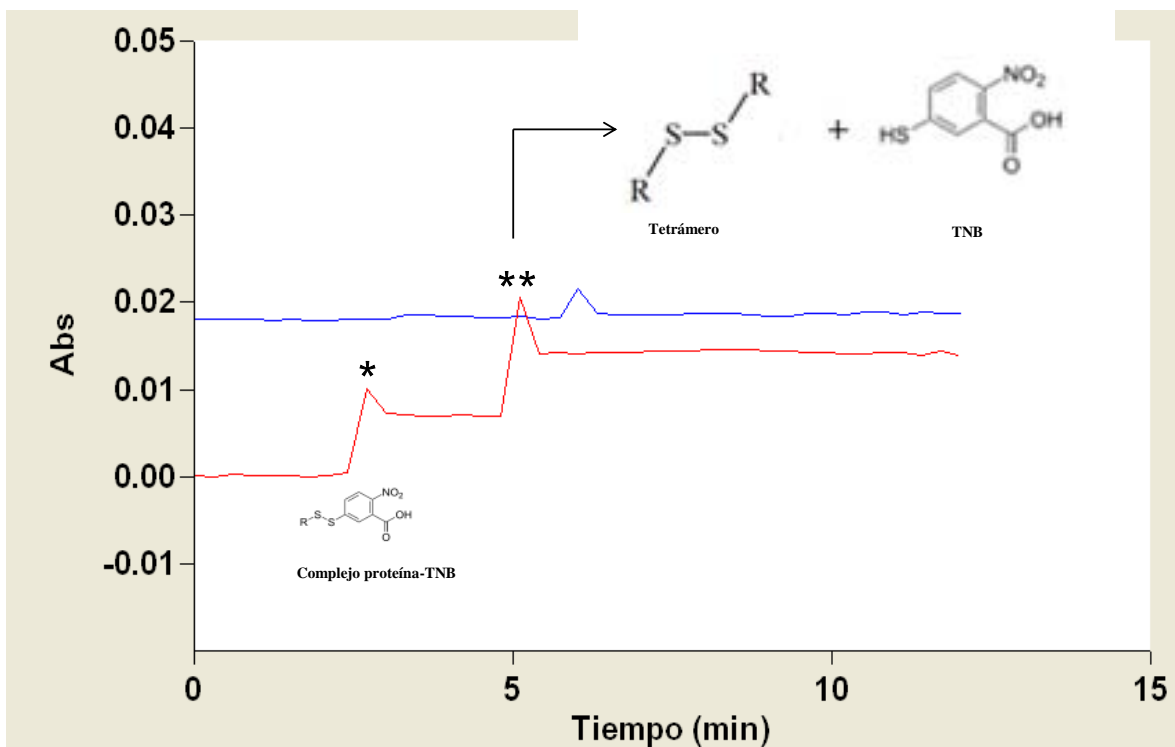


Figura 32. Determinación espectrofotométrica de la formación en tiempo real del tetrámero de GITIM mediante ataque nucleofílico de la Cys 202 reducida hacia la Cys 202 oxidada. Color rojo: Muestra. Color azul: Blanco de reacción (amortiguador TE).

6.5.6 Comparación de la generación de tetrámeros entre GITIM silvestre y las mutantes carentes de cisteína

La cinética de formación de tetrámeros de GITIM fue dependiente de las cisteínas superficiales 202, 222 y 228. Las mutantes carentes de la cisteína 202 no

Resultados

presentaron la banda correspondiente 55 kDa formada por puentes disulfuro ni en presencia ni en ausencia de agente reductor durante la purificación (Figura 30). En cambio, la mutante carente de la cisteína 222 presentó una génesis más lenta y menos eficiente en comparación con la enzima Wt (100% de tetrámeros al mes de almacenamiento versus 100% de tetrámeros y aproximadamente 20 % de oligómeros mayores en la enzima silvestre) (Figura 33).

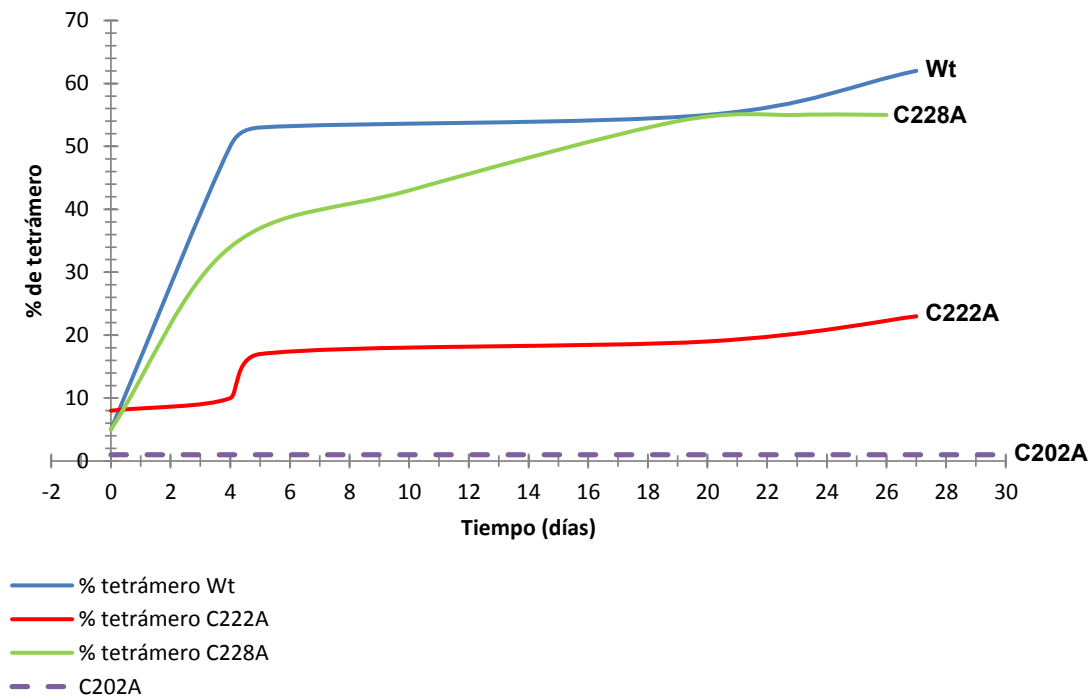
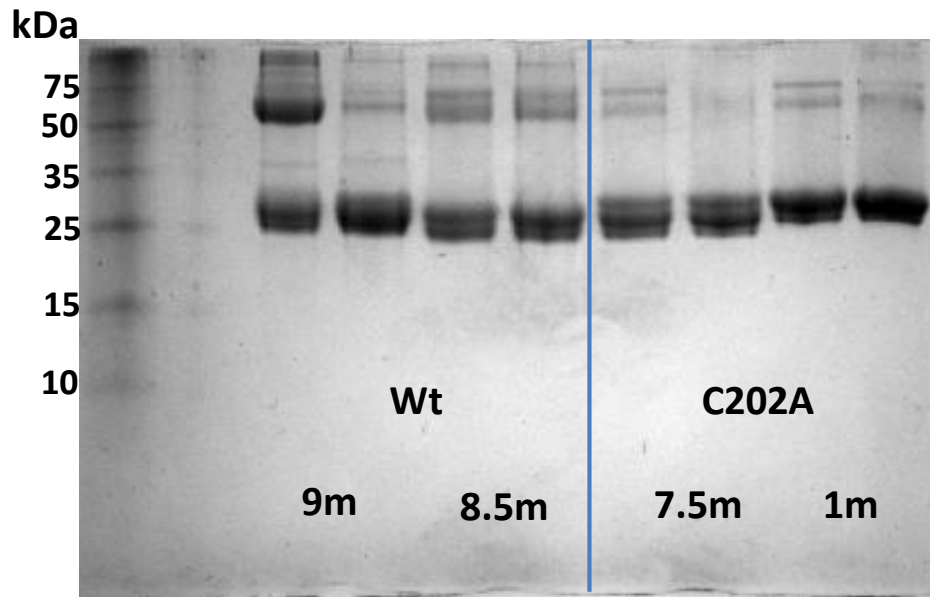


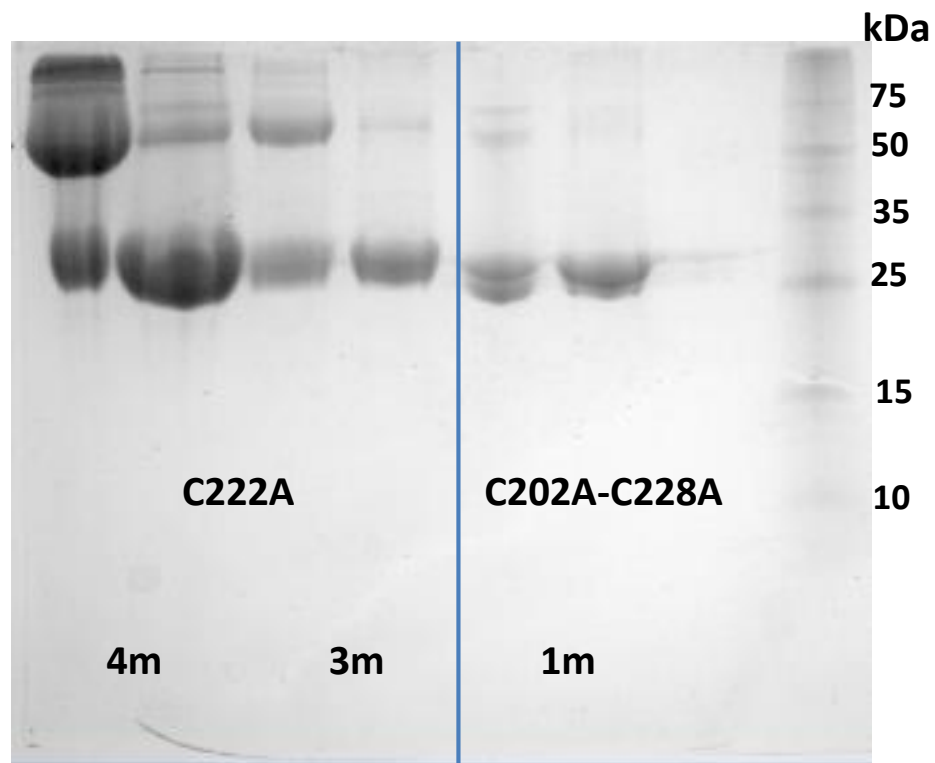
Figura 33. Cinética de formación de tetrámeros de las GITIM recombinantes mediante SDS-PAGE, purificadas en presencia de β -mercaptoetanol.

Con el objetivo de ver si la proporción de tetrámeros y dímeros se conservaba a tiempos mayores de 1 mes de almacenamiento, las proteínas silvestres y las mutantes C202A, C222A y C202A-C228A se sometieron a SDS-PAGE a tiempos más largos (Figura 34), encontrando que para la mutante carente de la cisteína 222, la proporción dímero/tetrámero cambió drásticamente (Figura 34B).

A)



B)



C)

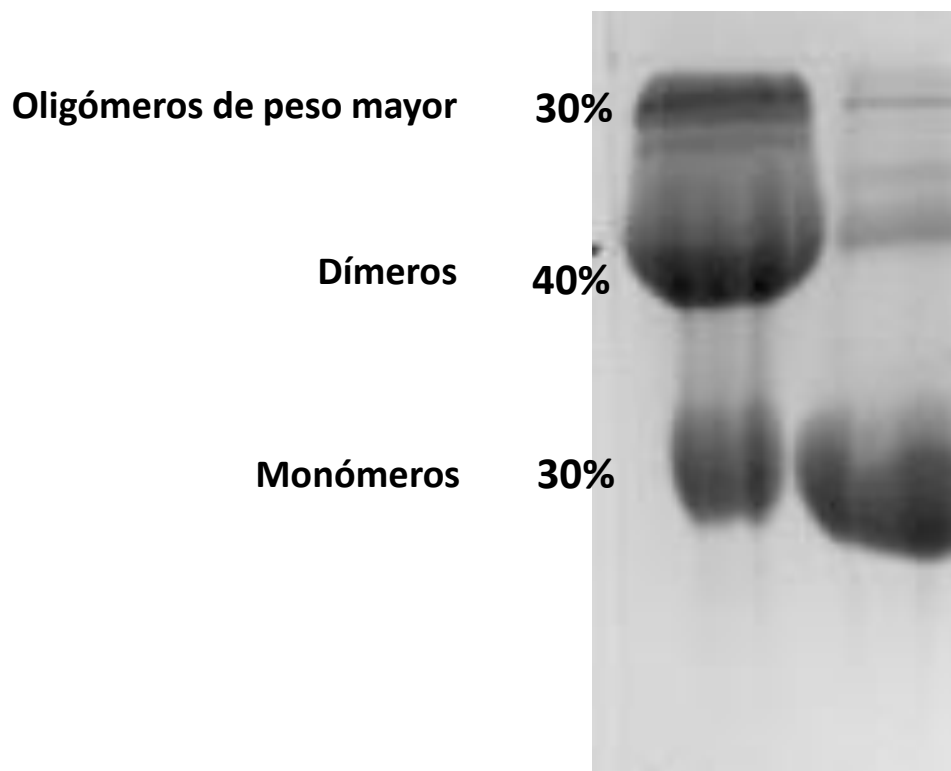


Figura 34. Geles SDS-PAGE de las diferentes GITIM a tiempos prolongados de almacenamiento. A) Enzima silvestre y mutante C202A. B) Mutantes C222A y C202A-C228A. C) Imagen ampliada de la mutante C222A. Abreviaturas: m= tiempo de almacenamiento en meses.

Posteriormente se repitió el ensayo bloqueando con iodoacetamida cualquier cisteína libre para asegurar que la oligomerización no se diera por un artefacto al correr la electroforesis, para ello, se incubaron 15 μg de proteína durante 20 minutos en presencia de urea en una concentración 10M, seguida de la adición de iodoacetamida en concentraciones crecientes. Se obtuvo una imagen con mejor resolución de los oligómeros que constituyen a las especies mayores al tetrámero (Figura 35).

Resultados

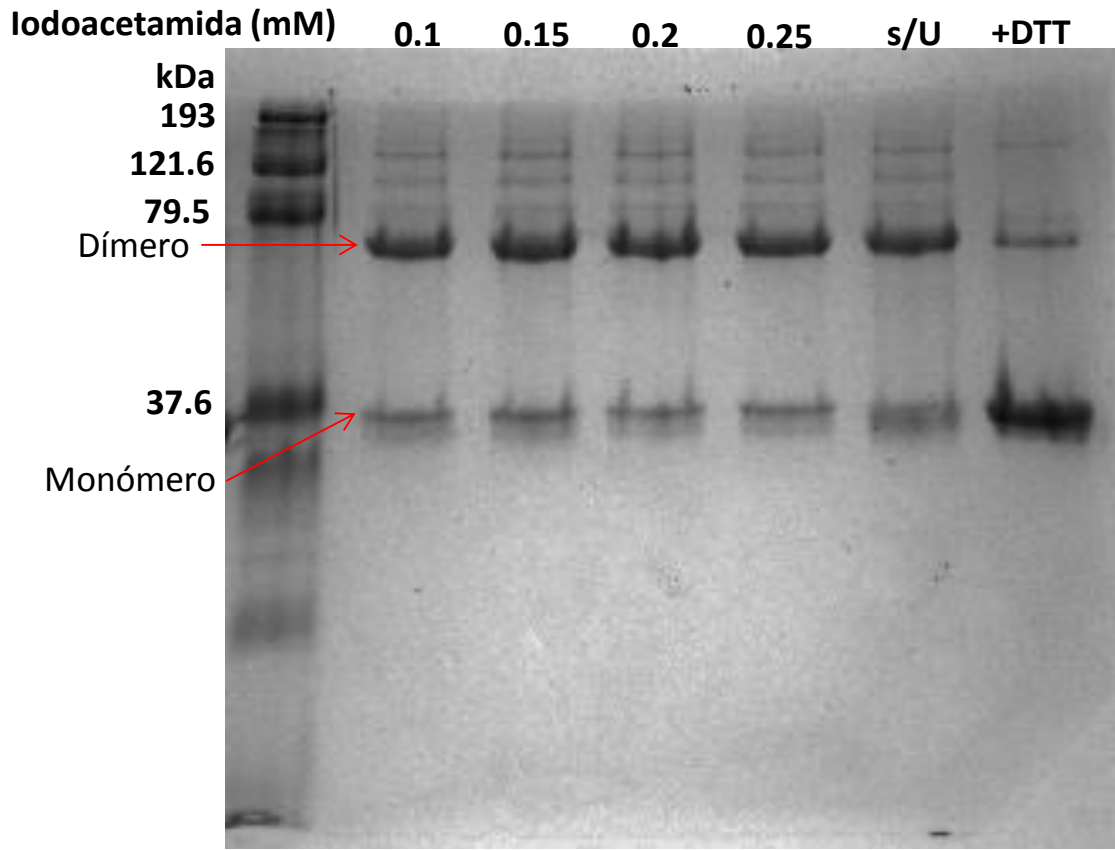


Figura 35. Gel de SDS-PAGE de la proteína GITIM C222A con 4 meses de almacenamiento, obtenido previa incubación de la proteína con urea y iodoacetamida en concentraciones crecientes. Como controles se incluyeron una alícuota de proteína a la que no se le adicionó urea (carril 6) y una de proteína que fue incubada con DTT (carril 7).

6.6 Generación de cepas de *G. lamblia* que sobre expresan GITIM

Se generaron cepas de *G. lamblia* que sobre expresan GITIM silvestre y la mutante C202A mediante transfección de los respectivos plásmidos pTubNTerm. En una primera etapa se realizó la subclonación de las construcciones de los genes *gltim* al plásmido pTubNTerm.

6.6.1 Experimentos de PCR para generar los sitios de restricción para subclonar al pTub

En ambas reacciones de PCR se amplificó el gen *gltim* (Figura 36), sin embargo la prueba B, en la que se incluyeron 10 ciclos con una temperatura de alineamiento de 35°C, seguidos de 20 ciclos con alineamiento a 55°C, se obtuvo una banda más intensa, por lo que se decidió trabajar con las condiciones experimentales de la prueba B.

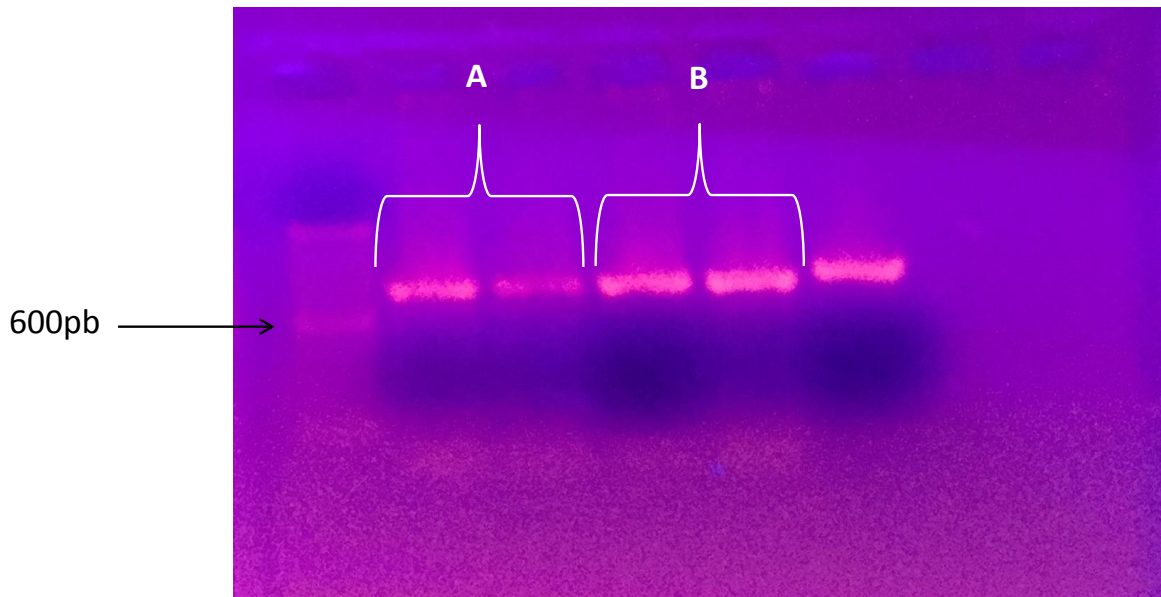


Figura 36. Pruebas de PCR para la generación de los sitios de restricción BamHI-EcoRV en el gen *gltim*. Gel de agarosa al 1% en donde se observan los productos de PCR obtenidos con ambas pruebas (A y B).

Después de purificar los productos de PCR, digerir, ligar y transformar, se purificó DNA plasmídico para la realización de pruebas confirmatorias que permitieran corroborar la presencia de las diferentes construcciones del gen *gltim*.

6.6.2 Confirmación de la subclonación de los genes *glTim* al plásmido pTubHA-NTerm

La correcta subclonación de los genes *glTim* al plásmido pTubHA-NTerm se corroboró mediante secuenciación automatizada; se corroboró también la generación de los sitios de restricción BamHI-EcoRV, la presencia de la secuencia codificante para el epítipo HA (Figura 37A); también se verificó que no se produjeran mutaciones no deseadas durante las reacciones de PCR para generar los sitios de restricción antes mencionados, el alineamiento relacionó la secuencia problema con el gen que codifica para la GITIM de *G. lamblia* (Figura 37B).

A)

```
CCATGGCCGATACCCATACGATGTTCCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCGCCGACTATGCAGGCTCCATCCAI  
ATGACGTTCCAGATACGCTGCTGTAAACGATCCATGCTGCTCGTCGCCCCCTTCATCGGCCGTAACCTCAAGTGTAAACG  
GCTCTCTTGACTTTATCAAGAGCCACGTGGCGGCAATTGCTGCCCATAAAGATCCCTGATTCCGTGGACGTCGCTCATTGCC  
CTTCCGCCGTACACCTGTCAACAGCCATTGCGGCAACACGTCAAAAAGTTGAGGATAGCAGCGCAGAAATGTGTACCTAG  
AGGGAAACGGGGCGTGGACTGGCGAGACAAGTGTGAGATGCTTCAGGACATGGGTTTGAAGCATGTGATAGTAGGGCACT  
CTGAAAGACGCAGAAATCATGGGGAGACCGACGAGCAAAGCGCCAAGAAGGCTAAGCGTGCCTGGAAAAGGGGATGACGG  
TCATCTTCTGCGTCGGAGAGACCTTGGACGAGCGCAAGGCCAACCGCACCATGGAGGTGAACATCGCCCAGCTTGAGGCGC  
TTGCAAGGAGCTCGGAGATCCAAGATGCTCTGGAAGGAGGTTGTCAITGCTTACGAGCCCGTGTGGTCCATTGGCACGG  
GCGTGGTGGCCACGCCCAGCAGGCAGAGGAGGTCATGTGGGCTCCGAAAGTGGTTTGGCGAGAAGGTTTGTGCCGAGG  
GCGCACAGCATATCCGTATCAITTAACGGGGATCGGCCAATGGAAGCAACTGCGAGAAGCTTGGCCAGTGTCCGAATATTG  
ACGGCTTCCTTGTGCGGTGGCGCTTCCCTCAAGCCGAGTTTATGACGATGATCGACATTCCTACGAAGACCCGTACATAG  
TATCGTTTCATCTGCGGCCGAGTGAATTCCTTCCGTGACCTTTGCATCATCGTGCTCGGTGCTGCTCGTAAMA
```

Resultados

B)

Giardia lamblia ATCC 50803 Triosephosphate isomerase, cytosolic (GL50803_93938) mRNA, complete cds. Sequence ID: [XM_001706778.1](#) Length: 774 Number of Matches: 1 Range 1: 1 to 774

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	1430 bits(774)	0.0	774/774 (100%)	0/774 (0%)	Plus/Plus	
Query	1		ATGCCTGCTCGTCGCCCTTCATCGGCGGTA			60
Sbjct	1		ATGCCTGCTCGTCGCCCTTCATCGGCGGTA			60
Query	61		ATCAAGAGCCACGTGGCGGCAATTGCTGCC			120
Sbjct	61		ATCAAGAGCCACGTGGCGGCAATTGCTGCC			120
Query	121		ATTGCCCTTCCGCGGTACACCTGTCAACAG			180
Sbjct	121		ATTGCCCTTCCGCGGTACACCTGTCAACAG			180
Query	181		AGGATAGCAGCGCAGAATGTGTACCTAGAG			240
Sbjct	181		AGGATAGCAGCGCAGAATGTGTACCTAGAG			240
Query	241		GTTGAGATGCTTCAGGACATGGGTTTGAAG			300
Sbjct	241		GTTGAGATGCTTCAGGACATGGGTTTGAAG			300
Query	301		AGAATCATGGGGGAGACCGACGAGCAAAGC			360
Sbjct	301		AGAATCATGGGGGAGACCGACGAGCAAAGC			360
Query	361		GGGATGACGGTCATCTTCTGCGTCGGAGAG			420
Sbjct	361		GGGATGACGGTCATCTTCTGCGTCGGAGAG			420
Query	421		ATGGAGGTGAACATCGCCCAGCTTGAGGCG			480
Sbjct	421		ATGGAGGTGAACATCGCCCAGCTTGAGGCG			480
Query	481		CTCTGGAAGGAGGTTGTCATTGCTTACGAG			540
Sbjct	481		CTCTGGAAGGAGGTTGTCATTGCTTACGAG			540
Query	541		GCCACGCCCGAGCAGGCAGAGGAGGTCCAT			600
Sbjct	541		GCCACGCCCGAGCAGGCAGAGGAGGTCCAT			600
Query	601		GTTTGTGCCGAGGGCGCACAGCATATCCGT			660
Sbjct	601		GTTTGTGCCGAGGGCGCACAGCATATCCGT			660
Query	661		AACTGCGAGAAGCTTGGCCAGTGTCCGAAT			720
Sbjct	661		AACTGCGAGAAGCTTGGCCAGTGTCCGAAT			720
Query	721		CTCAAGCCGGAGTTTATGACGATGATCGAC			774
Sbjct	721		CTCAAGCCGGAGTTTATGACGATGATCGAC			774

Figura 37. Confirmación de la correcta inserción del gen *gltim* Wt al vector pTubHA-NTerm.

A) Secuencia del gen *gltim* Wt con el epítipo HA y los respectivos sitios de restricción señalados (3xHA: Secuencia del epítipo HA. **ATG**: Metionina 1, codón de inicio de la transcripción. **GGATCC**: Sitio de restricción BamHI. **TAG**: Codón de término de la transcripción. **GATATC**: Sitio de restricción EcoRV.). B) Alineamiento de la secuencia del gen *gltim* con la base de datos del GenBank (Genbank).

6.6.3 Transfección de trofozoitos de *G. lamblia* con los plásmidos pTubNTerm

Mediante la técnica de transfección antes mencionada se obtuvieron cepas transfectantes de *G. lamblia* que sobre expresan la GITIM silvestre, la mutante carente de cisteína 202, y como control positivo se incluyó una cepa que sobre expresa la proteína 2 de pared del quiste (CWP-2). En las 24 horas posteriores a la transfección se observaron trofozoitos de *G. lamblia* transfectados y vivos, mismos que sobrevivieron en el medio de selección con puromicina.

6.7 Ensayos de inmunocitoquímica para estudiar la distribución *in situ* de TIM de *G. lamblia* silvestre cepa WB y de las cepas que sobre expresan GITIM C202A.

6.7.1 Distribución *in situ* de GITIM endógena en la cepa WB de *G. lamblia*

En imágenes de la cepa WB de *G. lamblia* obtenidas por microscopía de fluorescencia, se observó que la GITIM endógena y silvestre se distribuye de manera diferencial, es decir, se distribuye en un patrón disperso en el citoplasma como una enzima soluble pero además, también muestra un patrón de distribución en zonas enriquecidas principalmente hacia la periferia del trofozoito muy similares a vesículas (Figura 38).

Resultados

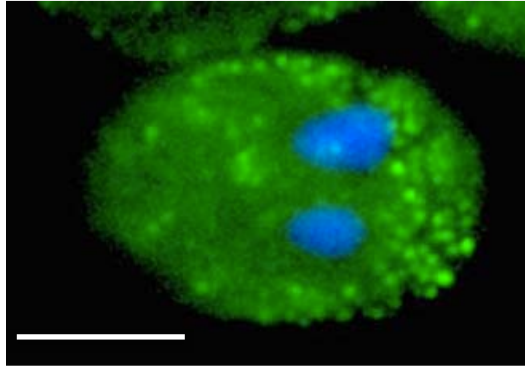


Figura 38. Distribución *in situ* de GITIM endógena (verde) en trofozoito de *G. lamblia*, cepa WB. Imagen obtenida mediante microscopía de fluorescencia. En azul se observan los núcleos celulares teñidos con DAPI. Barra = 5 micras

Para detallar la localización diferenciada de esta enzima y apoyar la propuesta de su localización en vesículas, se llevaron a cabo ensayos de inmunocitoquímica en los que se trataron células de *G. lamblia* WB tanto con anticuerpos anti-GITIM (verde), como con anticuerpos anti-vesículas periféricas (5B11) (rojo) y se encontró que GITIM co-localiza con estas vesículas periféricas en algunos sitios. Estas vesículas contienen a la catepsina lisosomal B3 de *G. lamblia* (Figura 39).

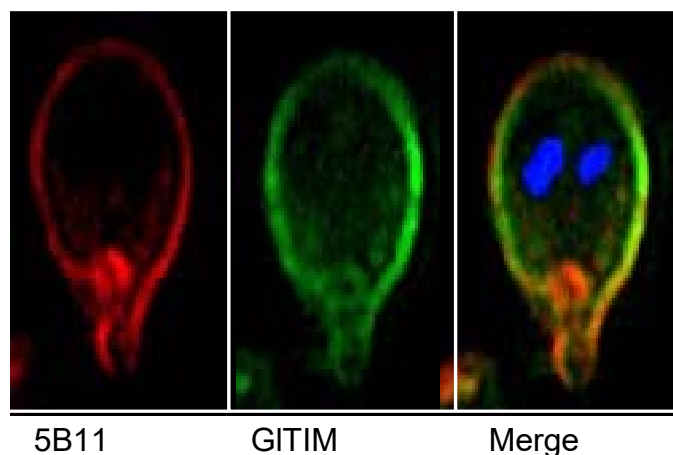
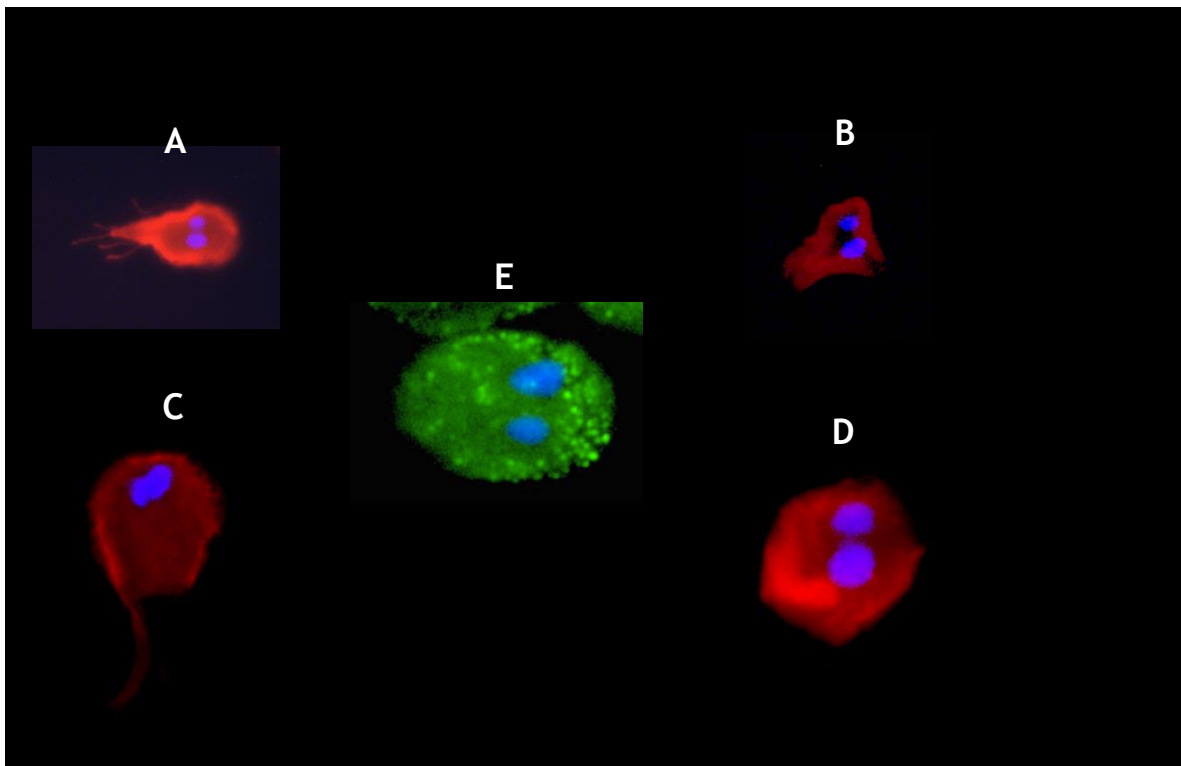


Figura 39. Co-localización de GITIM con vesículas periféricas (verde), anticuerpo 5B11 (rojo) contra catepsina B3 en *G. lamblia*. Las zonas con tonalidades entre naranja y amarillo indican sitios de colocalización de GITIM con PVs de catepsina B3. En azul se muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI.

6.7.2 Distribución *in situ* de la mutante de GITIM C202A en trofozoitos transfectados

Al realizar los ensayos de inmunocitoquímica para la descripción de la distribución *in situ* de la mutante C202A, se observó que su patrón de distribución cambió con respecto a la enzima silvestre (Figura 40E). Se perdieron las zonas de enriquecimiento tipo vesículas para dar lugar a una distribución que pareciera se está localizando en retículo endoplásmico (Figura 40 A-D, F, G).



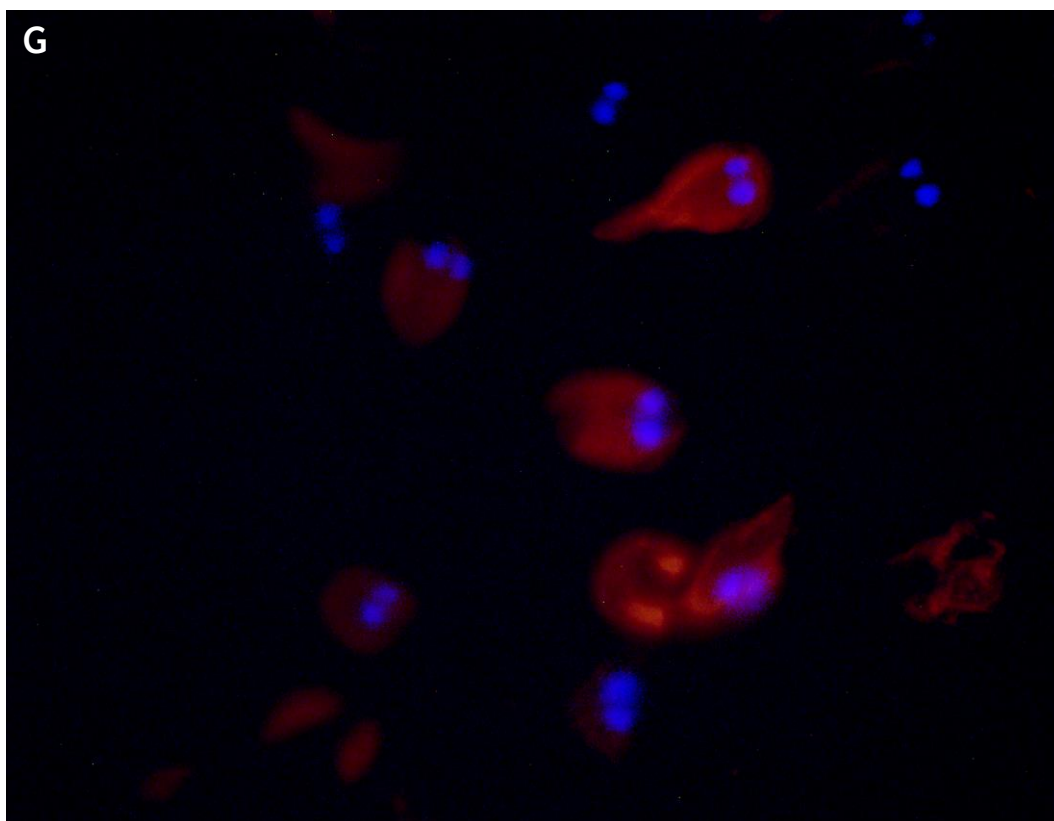
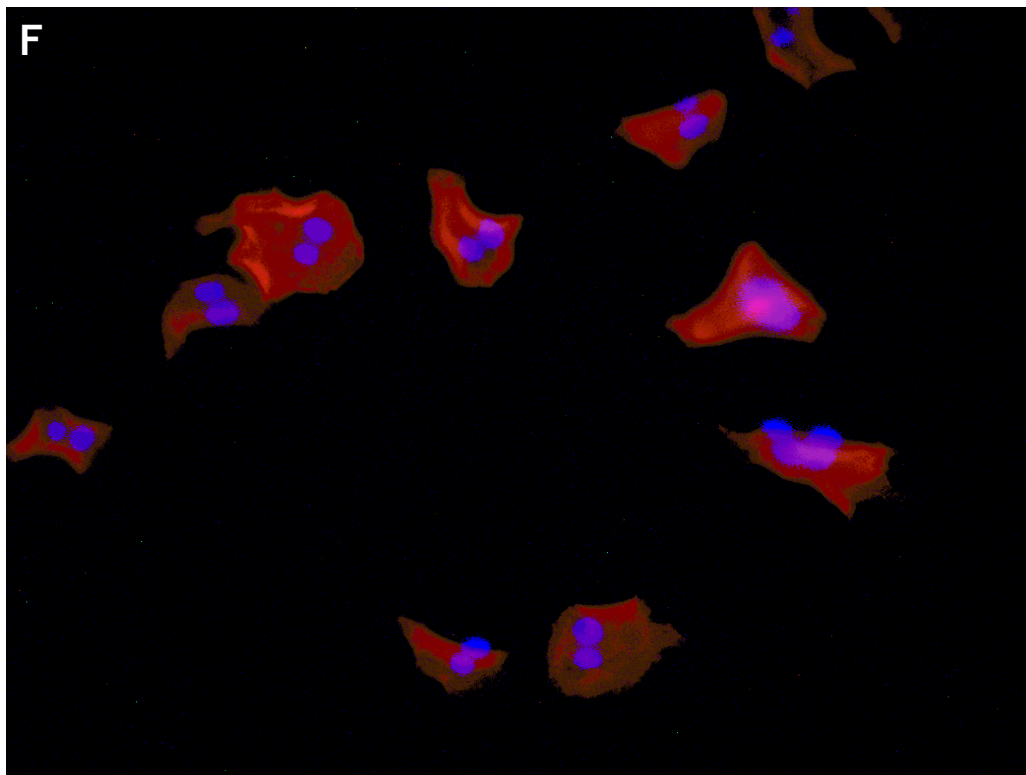


Figura 40. Distribución *in situ* de GITIM silvestre (E) y mutante C202A (A-D, F y G). Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia.

6.8 Cinética de enquistamiento de *G. lamblia* cepa WB y su relación con GITIM

Con el objetivo de analizar más a detalle el comportamiento de GITIM silvestre en diferentes etapas del proceso de enquistamiento de *G. lamblia*, se realizaron ensayos de western blot con lisados celulares obtenidos a diferentes tiempos después de inducir las células al enquistamiento (Figura 41), se observa como a medida que aumenta el tiempo de inducción al enquistamiento aparecen oligómeros de GITIM mayores al dímero.

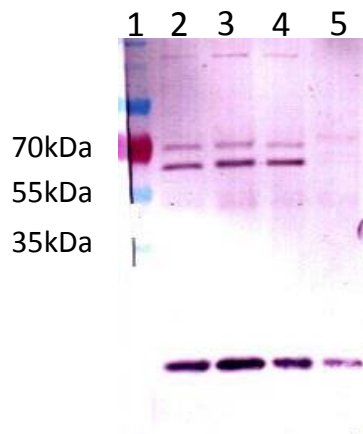


Figura 41. Ensayos de western blot para la detección de GITIM en las diferentes etapas del enquistamiento de *G. lamblia*. Pozos: 1: Marcador de peso molecular, pozo 2: Lisado de trofozoitos con 24 horas de inducción al enquistamiento; pozo 3: Lisado celular con 12 horas de inducción al enquistamiento; pozo 4: Lisado celular con 6 horas de inducción al enquistamiento; pozo 5: Control de células no inducidas.

6.9 Capacidad de enquistamiento de las cepas de *G. lamblia* que sobre expresan GITIM Wt, C202A y CWP-2.

Se determinó la capacidad de enquistamiento que tienen las cepas de *G. lamblia* mutantes, para ello, se indujeron a enquistamiento cultivos confluentes de cada una de las cepas. En la tabla 7 se observa que el número de trofozoitos vivos en las mutantes Wt y CWP-2 disminuyó en un 30 y 40% respectivamente comparado con el número de trofozoitos vivos en la cepa WB. El número de trofozoitos vivos de la cepa transfectada con la mutante C202A, no cambió con respecto a la cepa WB. El porcentaje de quistes generados no varió de manera significativa entre ninguna de las cepas mutantes y la cepa WB (Tabla 7, Figura 42).

Tabla 7. Conteo de trofozoitos y quistes de las diferentes cepas de *G.lamblia* estudiadas.

Cepa	# Trofozoitos vivos + # quistes	# Quistes	Porcentaje de quistes generados
WB	4, 390, 625	1, 078, 125	24%
Transfectada con GITIM Wt	3, 093, 751	546, 876	17.6%
Transfectada con GITIM C202A	4, 114, 189	859, 376	20.8%
Transfectada con GITIM CWP-2	2, 628, 906	535, 156	20.35%

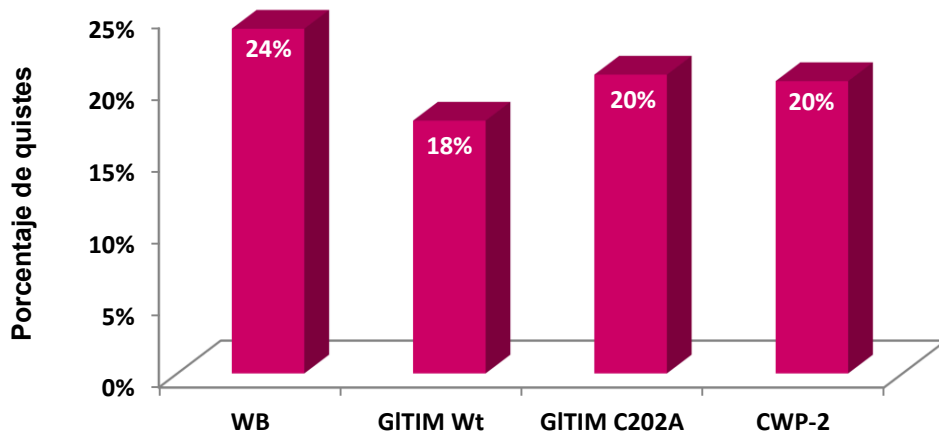


Figura 42. Porcentaje de quistes generados de las cepas de *G. lamblia* silvestre y transfectadas. Estos resultados representan el promedio de los ensayos realizados por duplicado.

6.10 Generación de anticuerpos anti-GITIM en ratón

Los ensayos de western blot mostraron que el suero de ratón tiene una alta sensibilidad y especificidad para la detección de la GITIM tanto recombinante (Figura 43, pozos 3, 6 y 9) como la de los lisados celulares de *G. lamblia* (Figura 43, pozos 1, 4, 7, 2, 5 y 8).

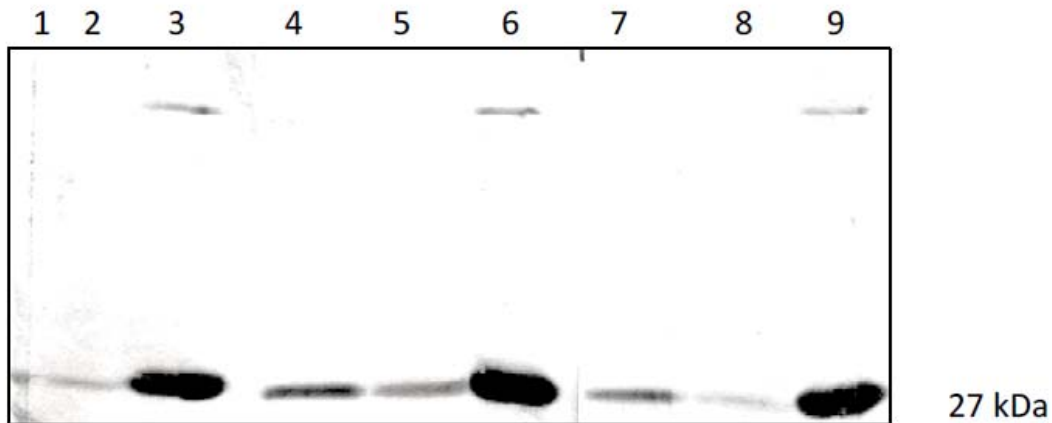


Figura 43. Ensayos de western blot para probar la sensibilidad y especificidad del anticuerpo hecho en ratón contra GITIM. Pozos 1, 4 y 7: 30 µg proteínas totales de trofozoitos con 24 h de inducción al enquistamiento; 2, 5 y 8: 30 µg proteínas totales de trofozoitos sin inducción; 3, 6 y 9: 250 ng GITIM C202A recombinante. Los pozos 1 a 3 fueron tratados con el suero del ratón número 1, los pozos 7 a 9 con el suero del ratón 2 y los pozos 1, 4 y 7 con el del ratón número 3.

7. DISCUSIÓN

Localización *in vivo* de GITIM en dos compartimentos celulares

El objetivo de este trabajo fue realizar la caracterización funcional y estructural *in vitro* e *in situ* de las mutantes sencillas y múltiples de cisteínas superficiales 202, 222, y 228 de la triosafosfato isomerasa de *G. lamblia*. Encontramos que las propiedades catalíticas y estructurales de la enzima recombinante están íntimamente relacionadas con sus cisteínas superficiales, más aún, los estudios *in vivo* permitieron corroborar que esta enzima tiene una distribución celular diferencial, encontrándose en zonas enriquecidas que colocalizan con catepsina B3 de vesículas periféricas; lo cual no coincide con lo descrito previamente para esta enzima glicolítica (López-Velázquez, *et al.*, 2004; Reyes-Vivas, *et al.*, 2007); además, dicho patrón en las cepas que sobre expresan la mutante carente de la cisteína 202 cambia de tal manera que, se pierden las zonas de enriquecimiento para dar lugar a una distribución que pareciera estar localizada en retículo endoplásmico.

7.1 La capacidad de oligomerización de GITIM depende del estado redox de las cisteínas participantes

En publicaciones previas se reportó que GITIM es la única enzima de organismos mesofílicos que además de la unidad funcional dimérica, es capaz de presentar tetrámeros; más aún, se demostró que este estado tetramérico se da mediante la formación de un enlace covalente de tipo puente disulfuro entre las cisteínas 202

Discusión

de cada uno de los monómeros que forman parte de los dímeros participantes (Figura 14) (López-Velázquez, *et al.* 2004, Reyes-Vivas, *et al.* 2007); sin embargo, hasta ahora, no se habían analizado a detalle las condiciones experimentales necesarias para que se diera la formación de este estado oligomérico, tales como la influencia que tiene la presencia de un agente reductor desde la purificación de la proteína. Se observó que para el caso de la Wt la diferencia en la cantidad de tetrámero obtenida en presencia de β -mercaptoetanol fue del 100% en comparación con la proteína que no estuvo en contacto con los agentes reductores. Para el caso de la mutante C222A también se encontró que la formación del tetrámero fue más eficiente en la proteína que fue purificada en presencia de β -mercaptoetanol (Figuras 29-31). Una posible explicación al respecto podría darse si se toman en cuenta los factores de los que depende que ocurra alguna modificación química en un residuo de cisteína, tales como el equilibrio tiol(SH)/tiolato(S⁻) en el que se encuentra su grupo sulfhidrilo, mismo que se desplaza hacia la prevalencia de una especie u otra dependiendo del pH del medio, la proximidad de estos residuos a las especies reactivas relevantes, su grado de exposición al solvente y su localización subcelular, entre otros (Poole, *et al.* 2015, Chouchani, *et al.* 2011). En este caso específico, en el que se tiene a las proteínas en solución a pH 7.4, el cual es menor al pKa (8.5), el equilibrio estará desplazado hacia la prevalencia del grupo SH, dicho equilibrio es aún más favorecido al haber purificado a la GITIM en presencia del agente reductor β -mercaptoetanol, de tal manera que el grupo tiol, al ser susceptible de oxidación por agentes oxidantes como el oxígeno del ambiente, dispara la reactividad de la

cisteína y permite que se lleve a cabo más rápidamente la formación de puentes disulfuro con otras cisteínas del medio, incluyendo las cisteínas superficiales de otras GITIMs que se encuentren cercanas. Analizando de manera integral toda la evidencia generada, en este trabajo proponemos un mecanismo de oligomerización de GITIM basado en una de las conocidas reacciones químicas de oxidación de un grupo tiol, que explica el aumento en la formación del tetrámero de la GITIM recombinante, como una contribución que complementa lo que hasta ahora sabemos de la capacidad de la GITIM de formar oligómeros mayores al dímero: En la Figura 44 se observa que cuando se acaba de purificar a la GITIM, se tiene una población de especies diméricas (ejemplificadas como R-SH) y especies tetraméricas (ejemplificadas como R-S-S-R), si la purificación se lleva a cabo en presencia de β -mercaptoetanol, se favorece el desplazamiento del equilibrio hacia la prevalencia de las formas diméricas en forma de tiol, con el paso del tiempo, durante su almacenamiento, estas proteínas entran en contacto con el oxígeno ambiental, mismo que las oxida y forma el aducto de ácido sulfénico, con esto se favorece la formación de los puentes disulfuro entre residuos vecinos para dar lugar a los tetrámeros que vemos en el gel tras un mes de almacenamiento. Esta oxidación al mismo tiempo estaría favoreciendo la formación del puente intracatenario propuesto entre las cisteínas 222 y 228 (Reyes-Vivas, *et al.* 2007), mismo que al ser escindido por el tratamiento con DTT, también contribuiría a la recuperación de la actividad enzimática (Figura 29). Es importante notar que dentro de este modelo químico es estrictamente necesario que las cisteínas que

Discusión

van a formar el enlace disulfuro se encuentren en estados redox opuestos, es decir, una debe estar en estado oxidado y la otra en estado reducido.

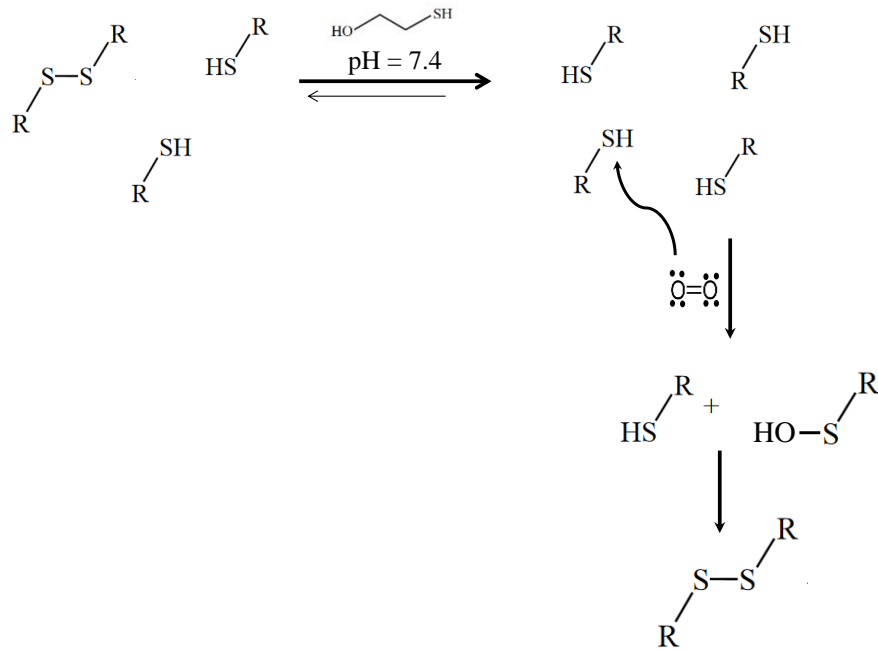


Figura 44. Propuesta de mecanismo que explica la formación más acelerada del tetrámero en la proteína GITIM Wt cuando es purificada en presencia de un agente reductor.

Para demostrar que la formación del tetrámero se da mediante un enlace covalente de tipo puente disulfuro entre cisteínas en estados redox opuestos, se utilizó DTNB, el cual reacciona con cisteínas libres oxidándolas (Figura 20, 32). Podríamos inferir que en el primer paso del experimento se llevó a cabo la oxidación de la proteína por el DTNB y como consecuencia se formó un puente disulfuro entre estas dos moléculas. Posteriormente al adicionar la proteína reducida a la mezcla de reacción, se llevó a cabo una reacción de sustitución del TNB que estaba formando parte del puente disulfuro, liberándolo al medio, para

Discusión

dar lugar a la formación del puente disulfuro entre la GITIM oxidada y la reducida, y con ello, a la concomitante formación del tetrámero de GITIM (Figuras 32 y 45).

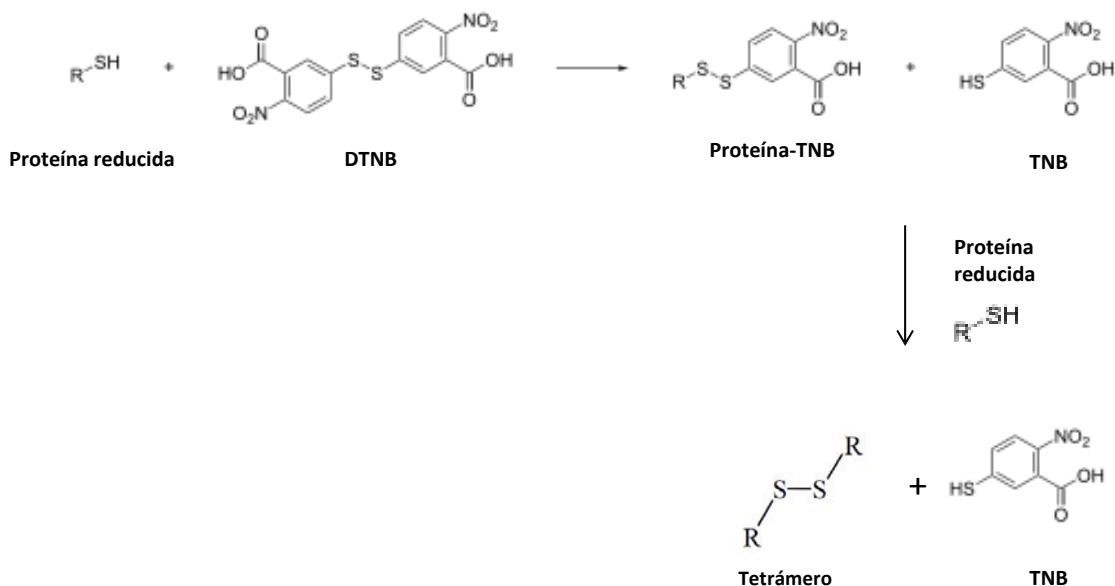
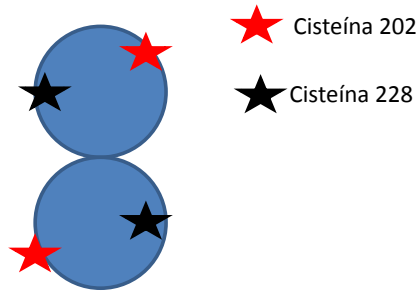


Figura 45. Esquema del modelo propuesto de formación *in vitro* del tetrámero de GITIM.

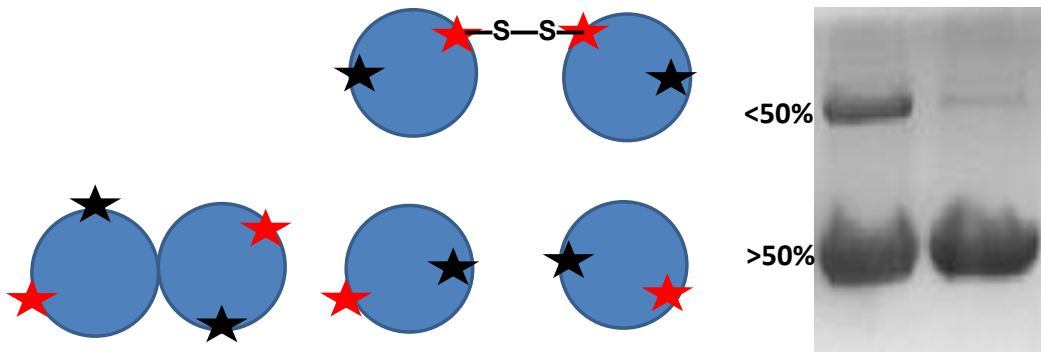
Este resultado apoya el modelo hipotético propuesto, en el que es necesario que una de las dos cisteínas participantes se encuentre en estado oxidado para que se lleve a cabo la formación del tetrámero, y que en el caso de estos ensayos *in vitro*, el β -mercaptoetanol hace las veces de este “componente preparador de cisteínas para la oligomerización”, el cual seguramente tiene un representante natural en la célula.

A partir de estos resultados y su análisis, también elaboramos una propuesta de interpretación de los geles SDS-PAGE con respecto a la génesis de los tetrámeros de GITIM, la cual se esquematiza en la figura 46.

A)



B)



C)

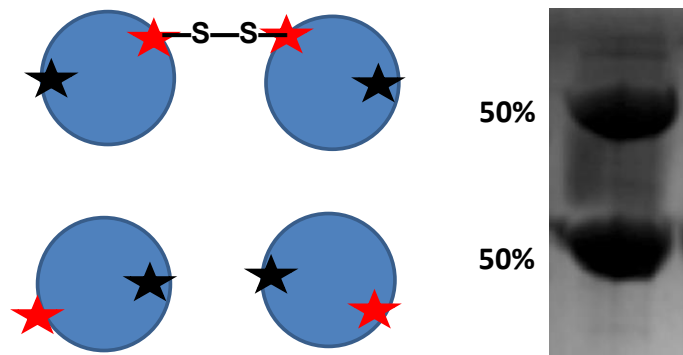


Figura 46. Poblaciones preponderantes de GITIM al mes de almacenamiento. A) Dímero formado por la unión de dos monómeros mediante interacciones débiles, se observan las cisteínas 202 de cada uno. B) A los 15 días de almacenamiento, se observa cómo se va enriqueciendo la población de tetrámeros, hasta que se llega a una proporción del 50% de dímeros y 50% de monómeros (C).

7.2 Las cisteínas superficiales influyen importantemente en la cinética y en la forma de oligomerización de GITIM

Se observaron diferencias en cuanto a la cinética de oligomerización (Figura 33). Si comparamos la velocidad de formación del tetrámero entre la mutante de GITIM carente de la cisteína 222 y la forma silvestre de la proteína, podemos ver que mientras que a la enzima silvestre le toma de 3 a 4 días llegar a una proporción de dímeros y tetrámeros del 50%, a la enzima C222A le tomó un mes. Con estos resultados estamos contribuyendo al conocimiento de los factores implicados en la formación de tetrámeros de GITIM ya que resulta muy interesante que la cisteína 222 está jugando un papel importante en la regulación de la formación de estas especies oligoméricas e influyendo de alguna manera para hacer más eficiente la formación del tetrámero. De esta forma, demostramos que en el proceso de oligomerización de GITIM no solo están involucradas las cisteínas 202 sino que la región de la C222 influye también.

Hasta el momento habíamos dado por concluido el seguimiento de la formación de los tetrámeros hasta un mes de almacenamiento, sin embargo, decidimos investigar si la proporción de tetrámeros y dímeros se conservaba 50% / 50% a tiempos de almacenamiento más largos, para ello se sometieron a SDS-PAGE las proteínas que estaban almacenadas desde el inicio del proyecto y encontramos que para la mutante carente de la cisteína 222, la proporción dímero/tetrámero cambió drásticamente (Figura 34C), de manera tal que el mecanismo de oligomerización previamente propuesto y esquematizado en la figura 46 no es

suficiente para explicar dicho fenómeno, el cual podría ser explicado mediante el siguiente modelo (Figura 47).

Modelo de oligomerización propuesto para la GITIM

A)

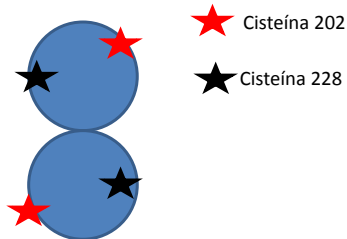


Figura 47A. Dímero formado por la unión de dos monómeros mediante interacciones débiles, se observan las cisteínas 202 de cada uno, posicionadas hacia lados contrarios, así como las cisteínas 228.

B)

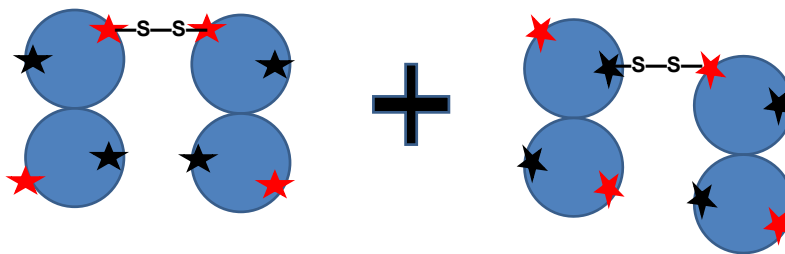


Figura 47B. De lado izquierdo se observa la forma “convencional” de oligomerización de GITIM por enlaces disulfuro entre las cisteínas 202, sin embargo, el comportamiento observado en la figura 34C se podría explicar incorporando la oligomerización “no convencional” entre las cisteínas 202 y 228 (lado derecho de esta figura).

C)

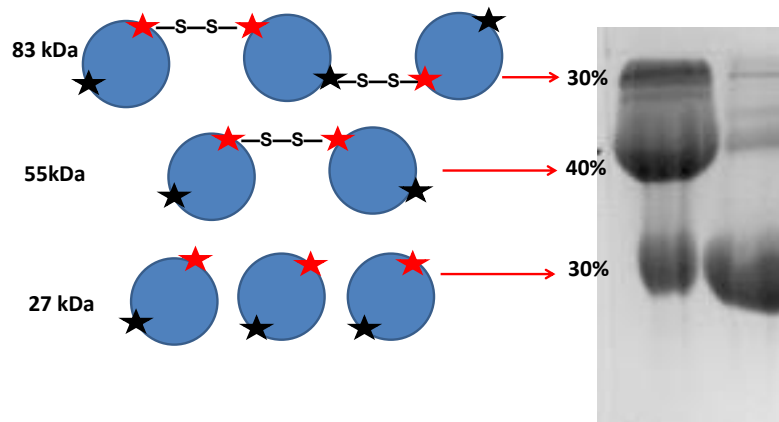


Figura 47C. Los pesos moleculares de las especies encontradas corresponden a monómeros, dímeros y trímeros

D)

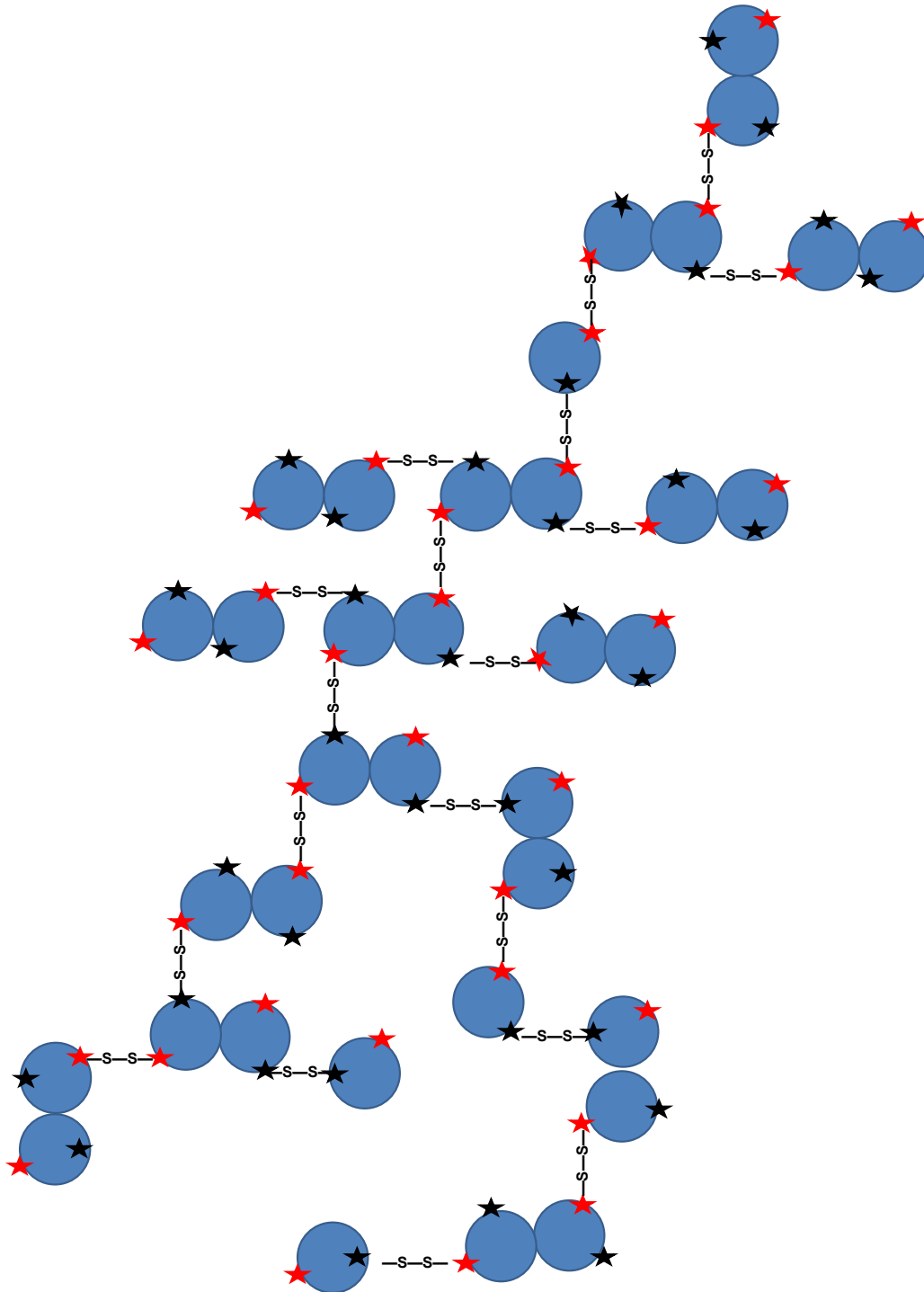


Figura 47D. Modelo propuesto de la posible forma de oligomerización de GITIM. Se integran dímeros entre cisteínas 202-202, dímeros entre cisteínas 202-228 y dímeros entre cisteínas 228-228 para dar lugar a un multímero, mismo que al ser tratado con agente reductor daría origen a monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros de GITIM.

7.3 La mutante carente de las tres cisteínas superficiales se afecta a nivel de plegamiento y por ende también a nivel funcional

Las mutantes sencillas de cisteínas fueron previamente caracterizadas a nivel funcional y estructural por Enríquez-Flores y colaboradores, encontrando que estas no presentan diferencias significativas con respecto a la enzima silvestre. Para el caso de las dobles mutantes estudiadas en el presente trabajo se encontró que tuvieron un comportamiento similar al de las mutantes sencillas, excepto por la mutante carente de las tres cisteínas superficiales, cuya afinidad por el sustrato disminuyó a una tercera parte de la K_m de la enzima silvestre, lo cual probablemente esté indicando que la enzima está afectada a nivel de plegamiento. Al evaluar la estructura secundaria de las mutantes múltiples de cisteína, se encontró que tanto los espectros de dicroísmo circular como la temperatura media de desnaturalización fueron similares comparados con el espectro de la enzima silvestre y las mutantes sencillas previamente reportados (Enríquez-Flores et al 2011) (Figura 28) lo cual sugiere que estas mutantes presentan una estabilidad similar a la de las enzimas antes mencionadas.

7.4 La cepa WB de *G. lamblia* presenta una distribución *in situ* distinta a la de una enzima completamente citoplásmica

En la figura 38 se muestra la distribución *in situ* que presenta la GITIM silvestre, se observa que además de presentar una distribución homogénea característica de una enzima soluble en citoplasma, también se encuentra en zonas enriquecidas

hacia la periferia del trofozoito. Esto es sugestivo de que la enzima se encuentra en vesículas; para comprobarlo, se llevaron a cabo ensayos de inmunocitoquímica con anticuerpos anti-vesículas periféricas y se encontró que GITIM co-localiza con vesículas periféricas que contienen a la catepsina lisosomal B3 de *G. lamblia* (Figura 39). Esta es la primera vez que se encuentra una enzima glicolítica en un compartimento celular en *G. lamblia*, además de estar soluble en el citoplasma. Este importante hallazgo abre más interrogantes: ¿cuál es la razón por la que una enzima glicolítica se localiza en vesículas? ¿Será la compartimentalización de GITIM dependiente de su estado de oligomerización? Para tratar de contestar estas preguntas es necesario complementar estos estudios con la cepa que sobre expresa la mutante de GITIM C202A, debido a que esta enzima no es capaz de oligomerizar.

Los primeros ensayos con la cepa que sobre expresa la mutante C202A mostraron que su patrón de distribución cambia con respecto a la enzima silvestre (Figura 40). Se perdieron las zonas de enriquecimiento para dar lugar a una distribución que pareciera se está localizando en retículo endoplásmico, dicha similitud se puede observar al comparar nuestras imágenes de la figura 40 con imágenes de la red túbulo vesicular (RTV) previamente reportada por Benchimol y colaboradores (Figura 48), para confirmarlo, es necesario obtener imágenes del parásito tratado con anticuerpos que reconozcan la RTV.

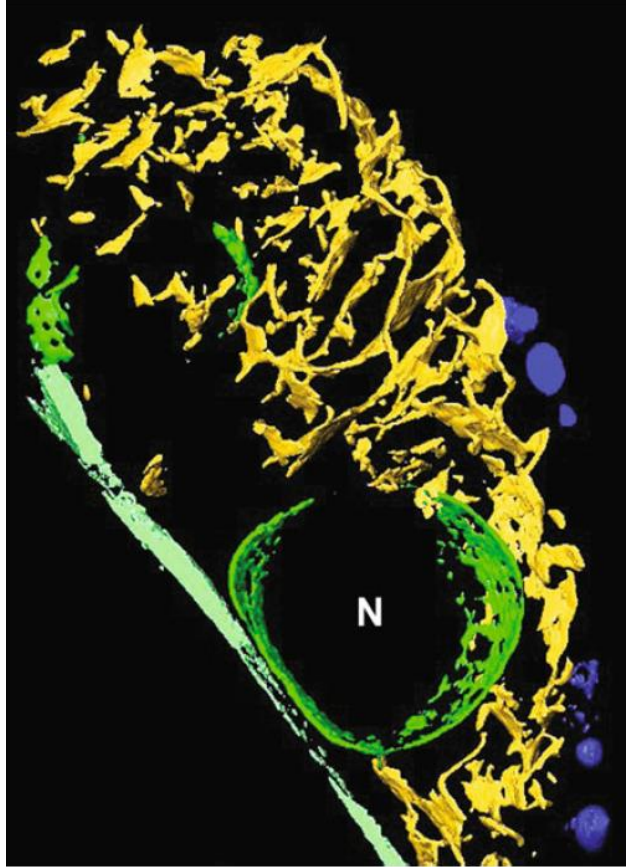


Figura 48. Reconstrucción tridimensional de un trofozoito de *G. lamblia*. En amarillo se observa la red túbulo vesicular; en color verde se muestran las cisternas del retículo endoplásmico rodeando al núcleo (N) y las vesículas periféricas en azul. (Imagen tomada de Benchimol M *et. al.* 2011).

7.5 La aparición de oligómeros de GITIM es dependiente del estadio de vida del parásito

En la figura 41 se observa como a medida que aumenta el tiempo de inducción al enquistamiento aparecen oligómeros de GITIM mayores al dímero, esto corrobora los resultados previamente reportados por Reyes y colaboradores quienes se encontraron oligómeros de alto peso molecular en lisados de quistes de *Giardia*,

además proporciona información más detallada acerca de la cinética de formación de los dichos oligómeros.

Es necesario llevar a cabo este mismo ensayo con la cepa de *G. lamblia* mutante *gltim-C202A* para determinar la capacidad de formación de oligómeros de alto peso molecular de GITIM a medida que aumentan las horas de inducción al enquistamiento, para compararlo con los resultados obtenidos con la cepa silvestre.

7.6 La transfección de *G. lamblia* con la mutante C202A aumenta su viabilidad

En la tabla 6 se observa que el número de trofozoitos vivos en las mutantes Wt y CWP-2 disminuyó en un 30 y 40% respectivamente comparado con el número de trofozoitos vivos en la cepa WB. Esto probablemente nos esté indicando el efecto deletéreo que produjo la transfección *per se* sobre la viabilidad celular, es decir, el hecho de tener sobre producción de alguna enzima, puede resultar tóxico para la célula. En cambio, el número de trofozoitos vivos de la cepa que sobre expresa la mutante C202A, no cambió con respecto a la cepa WB. Si tomamos en cuenta que esta enzima no es capaz de formar oligómeros y que de esta manera tiene una eficiencia catalítica del doble comparada con la enzima Wt (de acuerdo con lo reportado en Reyes-Vivas, *et al.*, 2007), proponemos que está dotando al trofozoito de un aporte extra de energía, por lo tanto, estaría compensando el efecto deletéreo de la transfección, lo cual se vio reflejado en el número mayor de trofozoitos vivos a pesar del efecto por la transfección.

7.7 La capacidad de enquistamiento de las cepas de *G. lamblia* no se ve modificada por la sobre expresión de GITIM Wt, C202A ni CWP-2

A pesar de que las transfecciones con las cepas Wt y CWP-2 probablemente tuvieron un efecto deletéreo sobre la viabilidad celular, el porcentaje de quistes generados no varió de manera significativa entre ninguna de las cepas transfectadas y la cepa WB (Tabla 7, Figura 42). Esto indica que la GITIM y la CWP-2 no influyen en la capacidad de enquistamiento de *G. lamblia*. En conjunto con los datos de seguimiento de la oligomerización de GITIM en sincronía con la inducción al enquistamiento (Fig. 41), nuestros resultados indican que el enquistamiento induce la oligomerización de GITIM pero que la oligomerización de GITIM no acelera ni detiene el enquistamiento.

8. CONCLUSIONES

8.1. De los estudios *in vitro* con las proteínas recombinantes se propone que las cisteínas que están involucradas en la formación del enlace disulfuro que da lugar a los oligómeros de alto peso molecular de GITIM, deben tener estados RedOx opuestos, para lo cual es indispensable la participación de algún agente “preparador” que propicie la formación de dichos enlaces.

8.2. De los estudios *in vivo*, se demostró por primera vez la localización de la enzima GITIM endógena en vesículas periféricas.

8.3. También se demostró que la oligomerización de GITIM endógena es inducida por el enquistamiento de *G. lamblia*.

8.4. El patrón de distribución *in situ* de la GITIM cambia drásticamente al perder la capacidad de oligomerización (cepa transferctada con C202A), y parece ser reclutada en retículo endoplásmico quizás por reconocerse como anómala.

9. LITERATURA CITADA

- Adam R.D. The Giardia lamblia genome. *Int J Parasitol* 2000;30(4):475-84.
- Adam RD. Biology of Giardia lamblia. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(3):447-475.
- Almirall P, Alfonso M, Ávila I, Salazar Y, Escobedo AA, Núñez FA, Cimerman S. Clinical features of giardiasis in different age groups of pediatric in-patients. *Rev Chilena Infectol* 2013;30(5):502-506.
- Álvarez G, Aguirre-López B, Varela J, Cabrera M, Merlino A, López GV, Lavaggi ML, Porcal W, Di Maio R, González M, Cerecetto H, Cabrera N, Pérez-Montfort R, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A. *Eur J Med Chem* 2010;45(12):5767-72.
- 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, Svärd S (eds). *Giardia: A model organism.* Springer Science + Business Media, New York, EUA, 2011.
- Biagini GA, Park JH, Lloyd D, Edwards MR. The antioxidant potential of pyruvate in the amitochondriate diplomonads Giardia intestinalis and Hexamita inflata. *Microbiology* 2001;147(Pt 12):3359-65.
- Blumenthal T. Split genes: another surprise from Giardia. *Curr Biol* 2011;21(4):R162-3.
- Boletín epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud. 2016; 33(46): 25. Dirección de internet:

Literatura citada

http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd_boletin.html. Consultado el 5 de diciembre de 2016.

-Botero-Garcés JH, García-Montoya GM, Grisales-Patino D, Aguirre-Acevedo DC, -Álvarez-Uribe MC. Giardia intestinalis and nutritional status in children participating in the complementary nutrition program, Antioquia, Colombia, May to October 2006. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2009;51(3):155-162.

-Brown DM, Upcroft JA, Upcroft P. A thioredoxin reductase-class of disulphide reductase in the protozoan parasite Giardia duodenalis. Mol Biochem Parasitol 1996;83 211-220.

-Brown DM, Upcroft JA, Upcroft P. Cysteine is the major low-molecular weight thiol in Giardia duodenalis. Mol Biochem Parasitol 1993; 61:155-158.

-Brown DM, Upcroft JA, Upcroft P. Free radical detoxification in Giardia duodenalis. Mol Biochem Parasitol 1995;72:47-56.

-Cedillo-Rivera R, Leal YA, Yépez-Mulia L, Gómez-Delgado A, Ortega-Pierres G,

-Chouchani ET, James AM, Fearnley IM, Lilley KS, Murphy MP. Proteomic approaches to the characterization of protein thiol modification. Curr Opin Chem Biol 2011;15(1):120-8.

-Davids BJ, Gillin FD. Methods for Giardia Culture, Cryopreservation, Encystation, and Excystation In Vitro. En: Luján HD, Svard S (eds). Giardia: A model organism. Springer Science + Business Media, New York, EUA, 2011.

-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.

Literatura citada

- Desai KK, Miller BG. A metabolic bypass of the triosephosphate isomerase reaction. *Biochemistry* 2008;47(31):7983-5.
- Eckman L. Mucosal defenses against Giardia. *Parasit Immunol* 2003;25:259–270.
- Elmendorf HG, Dawson SC, McCaffery JM. The cytoskeleton of Giardia lamblia. *Int J Parasitol* 2003;33(1):3-28.
- 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.
- Faghiri Z, Widmer G. A comparison of the Giardia lamblia trophozoite and cyst transcriptome using microarrays. *BMC Microbiol* 2011;11:91.
- 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.
- Gardner TB, Hill DR. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(1):114-28.
- Hanahan D. DNA cloning. Vol 1. En: Glover D. (Ed). IRL Press, LTD 109, 1985.
- Hansen R, Winther JR. An introduction to methods for analyzing thiols and disulfides: Reactions, reagents, and practical considerations. *Analyt Biochem* 2009; 394;147–158.

Literatura citada

- Hehl AB. Intracellular protein tracking. En: Luján HD, Svard S (eds). *Giardia: A model organism*. Springer Science + Business Media, New York, EUA, 2011.
- Hernández-Alcántara G, Torres-Larios A, Enríquez-Flores S, García-Torres I, Castillo-Villanueva A, Méndez ST, de la Mora-de la Mora I, Gómez-Manzo S, Torres-Arroyo A, López-Velázquez G, Reyes-Vivas H, Oria-Hernández J. Structural and functional perturbation of *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase by modification of a non-catalytic, non-conserved region. *PLoS One* 2013;8(7):e69031.
- 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.
- Janagond AB, Sasikala G, Agatha D, Ravinder T, Thenmozhivalli PR. Enteric Parasitic Infections in Relation to Diarrhoea in HIV Infected Individuals with CD4 T Cell Counts <1000 Cells/mul in Chennai, India. *J Clin Diagn Res* 2013;7(10):2160-2162.
- 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.
- Kabnick KS, Peattie DA. In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *J Cell Sci* 1990;95(Pt 3):353-60.
- Korneta I, Magnus M, Bujnicki JM. Structural bioinformatics of the human spliceosomal proteome. *Nucleic Acids Res* 2012;40(15):7046-65.
- Lane S, Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol* 2002;28(2):123-147.

Literatura citada

- Lauwaet T, Davids BJ, Reiner DS, Gillin FD. Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Curr Opin Microbiol* 2007;10(6):554-9.
- 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.
- Lindmark DG. Energy metabolism of the anaerobic protozoon *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 1980;1(1):1-12.
- 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.
- Lloyd D, Williams CF. Comparative biochemistry of *Giardia*, *Hexamita* and *Spironucleus*: Enigmatic diplomonads. *Mol Biochem Parasitol* 2014;197(1-2):43-9.
- Lujan HD, Nash TE. The uptake and metabolism of cysteine by *Giardia lamblia* trophozoites. *J Eukaryot Microbiol* 1994;41(2):169-75.

- Luján HD, Svard S. Preface. En: Luján HD, Svard S (eds). *Giardia: A model organism*. Springer Science + Business Media, New York, EUA, 2011.
- 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.
- Mowatt MR, Weinbach EC, Howard TC, Nash TE. Complementation of an *Escherichia coli* glycolysis mutant by *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase. *Exp Parasitol* 1994;78:85–92.
- Nixon JE, Wang A, Morrison HG, et al. A spliceosomal intron in *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 19 2002;99(6):3701-3705.
- Penefsky HS. A centrifuged-column procedure for the measurement of ligand binding by beef heart F1. *Methods Enzymol*. 1979;56:527-30.
- Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *Int J Hyg Environ Health* 2010;213:321–333.
- Poole LB. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radic Biol Med* 2015;80:148-57.

- Pyrih J, Pyrihová E, Kolísko M, Stojanovová D, Basu S, Harant K, Haindrich AC, Doležal P, Lukeš J, Roger A, Tachezy J. Minimal cytosolic iron-sulfur cluster assembly machinery of *Giardia intestinalis* is partially associated with mitosomes. *Mol Microbiol* 2016. doi: 10.1111/mmi.13487.
- 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.
- Reiner DS, McCaffery M, Gillin FD. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *Eur J Cell Biol*. Oct 1990;53(1):142-153.
- 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.
- 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.
- Singer SM, Yee J, Nash TE. Episomal and integrated maintenance of foreign DNA in *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 1998;92(1):59-69.

Literatura citada

-Sitio de internet de la biblioteca nacional de medicina de los Estados Unidos (PubMed). Dirección URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=giardia+lambliia>. Consultado el 10 de septiembre de 2016.

-Sitio de internet de la herramienta de alineamiento de secuencias de nucleótidos (BLAST). Dirección URL:

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome. Consultado 2 de octubre de 2014.

-Sitio de internet de Thermo Scientific. Dirección URL:

<http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CgQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.thermoscientificbio.com%2FuploadedFiles%2FResources%2Fk1230-productinformation.pdf&ei=LfF1VMXhM8SjNt7JgaAG&usg=AFQjCNGRy-s6oyJWES8Fs0CI7DIUwScgWw&bvm=bv.80642063,d.eXY>. Consultado el 01 de octubre de 2014.

-Sitio de internet del Gene Bank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de Estados Unidos. Dirección URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NW_002477110.1?report=fasta&from=1484149&to=1484922&strand=true. Consultado el 25 de noviembre de 2014.

-Slifko TR, Smith HV, Rose JB. Emerging parasite zoonosis associated with water and food. *Int J Parasitol* 2000;30(12-13):1379-1393.

-Smith NC, Bryant C, Boreham PF. Possible roles for pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thiol-dependent peroxidase and reductase activities in

resistance to nitroheterocyclic drugs in *Giardia intestinalis*. *Int J Parasitol* 1988;18(7):991-7.

-Sullivan PB, Marsh MN, Phillips MB, et al. Prevalence and treatment of giardiasis in chronic diarrhoea and malnutrition. *Arch Dis Child* 1991;66(3):304-306.

-Tachezy J, Dolezal P. The *Giardia* mitosomes. En: Luján HD, Svard S (eds). *Giardia: A model organism*. Springer Science + Business Media, New York, EUA, 2011.

Tapia-Conyer R, Muñoz O. Seroepidemiology of giardiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80(1):6-10.

-Thompson RC, Reynoldson JA, Mendis AH. *Giardia* and giardiasis. *Adv Parasitol* 1993;32:71-160.

-Thompson RC. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 2000;30(12-13):1259-1267.

-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.

-Tovar J, Leon-Avila G, Sanchez LB, et al. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*. Nov 13 2003;426(6963):172-176.

-Trejo-Soto PJ, Aguayo-Ortiz R, Yépez-Mulia L, Hernández-Campos A, Medina-Franco JL, Castillo R. Insights into the structure and inhibition of *Giardia intestinalis* arginine deiminase: homology modeling, docking, and molecular dynamics studies. *J Biomol Struct Dyn* 2016;34 (4):732-48.

Literatura citada

-Walden H, Bell GS, Russell RJ, Siebers B, Hensel R, Taylor GL. Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J Mol Biol* 2001;306(4):745-57.

-Wierenga RK, Kapetaniou EG, Venkatesan R. Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. *Cell Mol Life Sci* 2010;(23):3961-82.

-Yu LZ, Birky CW Jr, Adam RD. The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis. *Eukaryot Cell* 2002;1(2):191-9.