



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

**Expresión de proteínas involucradas
en la vía de señalización PRX en
*Giardia lamblia***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE:**

Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A :

Gabriela Isabel Hernández Pizano

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. Karla Berenice Acosta Virgen

ASESOR:

Q.F.B. Manuel Orduña Sánchez

Ciudad de México, 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento muy especial a la M. en C. Karla Berenice Acosta Virgen por aceptarme y permitirme realizar el servicio social y tesis en el laboratorio. Por su tiempo y dedicación en la elaboración de este trabajo, por todos los conocimientos transmitidos, por la confianza y amistad brindada.

A los doctores del laboratorio 1 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV: Dra. Bibiana Chávez Munguía, Dr. Adolfo Martínez Palomo y Dra. Martha Espinosa Cantellano por la donación de los anticuerpos y materiales empleados, sus aportaciones en este trabajo y por hacerme sentir parte de su laboratorio. A la Dra. Rosa María Del Ángel por la donación de las células HeLa.

Al Dr. Daniel Talamás Lara por las observaciones y correcciones en este escrito, por el apoyo en las sesiones del confocal y la amistad durante este tiempo en el laboratorio.

Agradezco a la Biól. Anel Lagunes Guillén y a la Biól. Lizbeth Salazar Villatoro por su apoyo técnico en la parte experimental de la tesis y del servicio social, principalmente por la asesoría para la realización de las técnicas de MET y Western Blot; asimismo, al técnico Ranferi Andrés Pérez por su ayuda en el laboratorio, muchas gracias.

A mis sinodales: MTRO. Gabriel Alejandro Romero Díaz, Q.F.B. Manuel Orduña Sánchez, Q.F.B. Alicia Cabrera Aguilar y M. en C. Luis Antonio Cervantes Candelas por sus observaciones y correcciones en la revisión de este trabajo.

Por último, agradezco enormemente a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, de igual manera a todos los profesores que durante la carrera fueron partícipes de mi formación académica.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a toda mi familia, en especial a mi madre Cristina por todo el apoyo recibido, por brindarme amor, educación y contribuir en mi formación profesional. A mi tía Paulina, mi madrina Tere y mi tía Luz por su apoyo y amor a lo largo de mi vida. A mi abuelita Isabel por todo el amor recibido y los cuidados brindados durante todos estos 24 años.

A mi queridísima Diana por ser como la hermana que nunca tuve. De igual manera a mi tío José, por ser como mi padre y a mi tía Ana, mis primos Luis y Jessica por los consejos, la convivencia y risas brindadas. A mi ahijado Alberto por ser un niño muy lindo y darle felicidad a esta pequeña gran familia que somos.

También dedico este trabajo a todas mis amistades que me han acompañado a lo largo de mi vida, secundaria, preparatoria y universidad. Con mucho cariño a mis amigas Abril y Tania que siempre han estado para mí. A mi queridísima Valerie por todas las vivencias, consejos, apoyo incondicional en los buenos y malos momentos, infinitas gracias.

Especialmente y con mucho amor a mi Daniel. Gracias por estar ahí siempre, por todo la paciencia, cariño y amor recibido durante este tiempo, por ser mi confidente y permitirme ser parte de tu vida.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Generalidades de <i>Giardia lamblia</i>	1
MARCO TEÓRICO	3
Epidemiología.....	3
Morfología del parásito	3
Trofozoíto.....	3
Quiste.....	4
Ciclo biológico.....	4
Respuesta del sistema inmunológico a <i>G. lamblia</i>	5
Factores de patogenicidad y virulencia	7
Especies reactivas de oxígeno, estrés oxidativo y antioxidantes.	9
Sistema antioxidante en otros parásitos.....	11
Respuesta al estrés oxidativo en <i>G. lamblia</i>	11
Peroxisomas y Vía de señalización PRX.....	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS.....	16
MATERIAL Y MÉTODOS	17
RESULTADOS.....	21
Prx	21
TrxR	26
Trx.....	32
Western Blot	37
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	44
REFERENCIAS.....	45

INTRODUCCIÓN

Generalidades de *Giardia lamblia*

Giardia lamblia es un parásito entérico, agente causal de la infección neotropical desatendida conocida como giardiasis, prevalente en sitios donde las condiciones de saneamiento son desfavorables, como en México. El grupo más susceptible a esta infección son niños menores de cinco años (1). La Organización Mundial de la Salud estima que al menos uno de cada siete niños son portadores de *G. lamblia* en países donde la enfermedad es endémica (2,3).

La vía de infección es la ruta fecal-oral, debido a esto, las principales causas para contraer giardiasis son los malos hábitos de higiene, el contacto con la tierra y la ingesta de agua o alimentos contaminados con quistes (3,4). El principal síntoma es la diarrea, seguido de náuseas y absorción deficiente de alimentos, no obstante la infección suele ser autolimitante en la mayoría de los casos, es decir que, la duración estará restringida por su propio patrón de características y no tendrá algún efecto perjudicial en la salud de la persona; sin embargo, en cuadros severos, pueden presentarse las complicaciones a largo plazo que tendrán afectaciones en el estado nutricional de los pacientes, siendo la disminución de peso uno de los más frecuentes debido a la malabsorción de nutrientes, grasas, lactosa, vitaminas, etc.

Si bien existen tratamientos muy exitosos contra la giardiasis algunos autores sugieren que niños que presentaron la infección en periodos de tiempo muy largos, son susceptibles a desarrollar deficiencias cognitivas o afectaciones en su crecimiento, pero hasta ahora no se han determinado los factores que relacionen directamente estas deficiencias con la giardiasis (5).

El enteroparásito *Giardia lamblia* (Syn. *G. duodenalis*, *G. intestinalis*) es un protista microaerófilo unicelular que presenta dos formas de vida: quiste y trofozoíto (3).

Los quistes son la fase infectiva, eclosionan y liberan los trofozoítos en el intestino delgado proximal. Los trofozoítos son la fase móvil del parásito, los cuales, una vez adheridos a los enterocitos del duodeno se reproducen por fisión binaria. Algunos trofozoítos al tener contacto con las sales biliares forman quistes en el yeyuno y pasan a las heces, completando el ciclo de transmisión. (Fig. 1) (4).

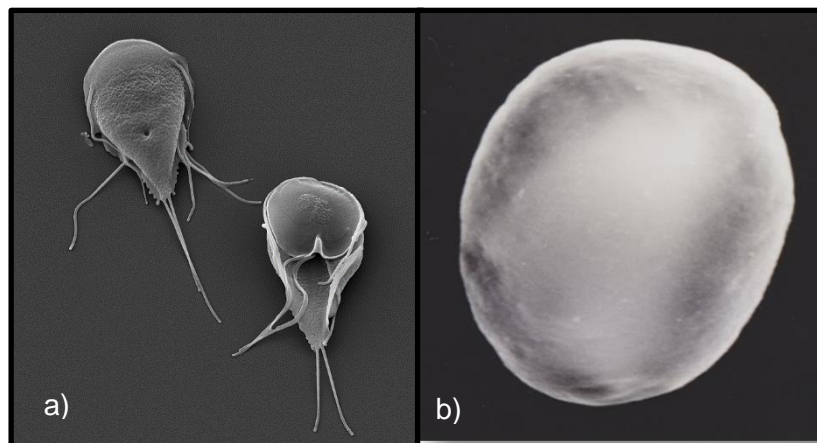


Figura 1. *G. lamblia* observada en microscopía electrónica de barrido. Se aprecian ambas fases del protozoario: a) Trofozoíto, b) Quiste. (Fotografía: Dra. Bibiana Chávez, CINVESTAV)

La biología de *G. lamblia* ha sido ampliamente estudiada mediante el uso de microscopía óptica convencional y electrónica, tanto de barrido, confocal o de transmisión; así como también a través de la biología molecular (6–8). Por su parte, el estudio de la infección es abordado principalmente analizando la patogénesis del parásito y de igual manera, la respuesta inmune del hospedero. Sin embargo, recientemente se comenzó a cuestionar las implicaciones que podría tener la microbiota del hospedero durante la infección. Estas tres perspectivas de estudio son abordadas mediante la implementación de estudios *in vitro* e *in vivo*.

MARCO TEÓRICO

Epidemiología

G. lamblia infecta a un gran número de hospederos vertebrados y tiene una distribución cosmopolita (9). Contraer esta parasitosis intestinal depende de muchos factores, principalmente de la región geográfica, condiciones ambientales, los niveles socioeconómicos, los hábitos de higiene, el hacinamiento y las condiciones de saneamiento ambiental (10)

Se estima que hay alrededor de 280 millones de personas infectadas al año en ciudades desarrolladas y en vías de desarrollo (9); la prevalencia varía dependiendo de la región geográfica, por ejemplo, en países industrializados oscila entre 3-5 %, mientras que en los países en vías de desarrollo puede ser mayor al 30% (11). En México, de acuerdo con la información proporcionada en el Boletín Epidemiológico Semana 52(2018), los estados que presentaron mayores números de casos de giardiasis son: Sinaloa (2016), Estado de México (967), Oaxaca (931), Veracruz (803) y Chiapas (792). En todo el país, se reportaron 11631 casos en el 2018 de los cuales 5305 fueron hombres y 6326 mujeres (12).

Morfología del parásito

Trofozoíto

La forma vegetativa es piriforme, su tamaño oscila de 12 a 15 μm de longitud, 5 a 9 μm de ancho y 1-2 μm de espesor (4). Su superficie dorsal es convexa y la ventral es cóncava. Esta fase se caracteriza por la presencia de disco ventral cuya función es principalmente de adhesión. El disco ventral está localizado en la región anteroventral del

trofozoíto, es cóncavo y está constituido principalmente de proteínas contráctiles, así como de giardinas, alfa y beta tubulinas. Además, tiene cuatro pares de flagelos que salen de un cuerpo basal, con axenomas los cuales tienen un arreglo estructural de 9 + 2 y posee dos núcleos transcripcionalmente activos (Fig. 2) (13).

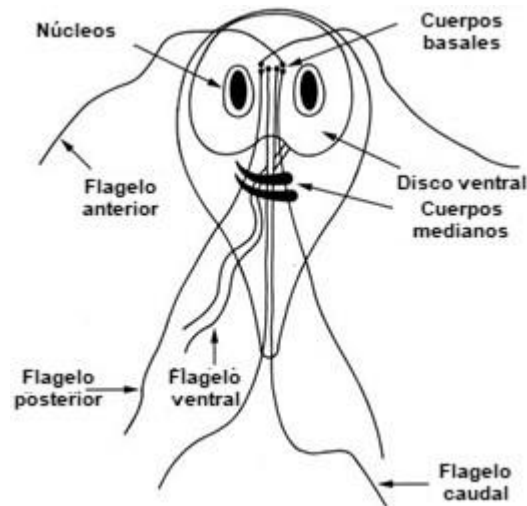


Figura 2. Trofozoíto de *G. lamblia*. Tiene una estructura piriforme, posee cuatro pares de flagelos: anterior, posterior, caudal y ventral, un disco ventral que le permite adherirse y dos núcleos. (Extraído de Faubert G., 2000)

Quiste

La estructura de resistencia es de forma ovoide, mide alrededor de 8 a 12 μm de longitud, 7 a 10 μm de ancho y de 0.3 a 0.5 μm de espesor. Posee de dos a cuatro núcleos, cuerpos basales, vacuolas, axonemas, ribosomas, fragmentos del disco ventral, así como del cuerpo medio (13).

Ciclo biológico

Los quistes presentes en agua y alimentos contaminados, inician la infección tras la ingesta (14). Al pasar por el tracto gastrointestinal se exponen al pH ácido de los jugos gástricos y a enzimas pancreáticas como la quimotripsina y tripsina, dando inicio al proceso de desenquistamiento en el duodeno; el colesterol favorece el crecimiento de los

trofozoítos, promoviendo la colonización en este sitio (15). Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria longitudinal y se adhieren a la mucosa intestinal mediante el disco ventral. Cuando llegan al íleon comienzan a enquistarse por el cambio de pH (alcalino), escaso colesterol y la presencia de sales biliares, una vez que se encuentran en el colon son expulsados en las heces (Fig. 3) (16,17).

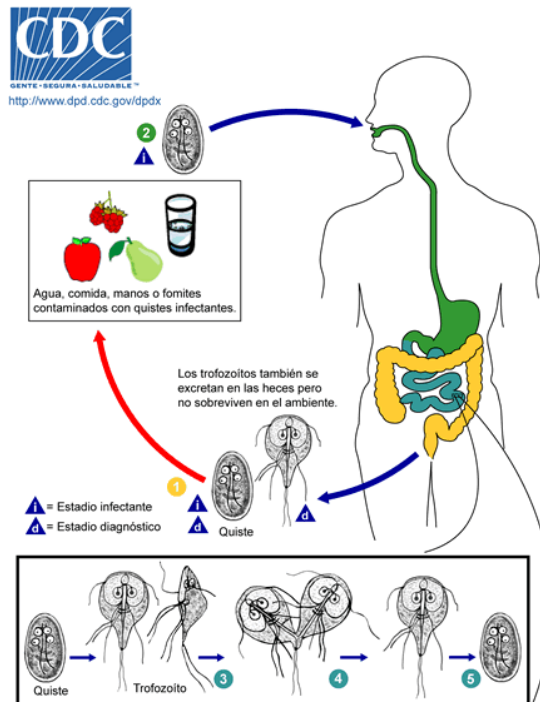


Figura 3. Ciclo de vida de *G. lamblia*. 1) La infección ocurre por la ingestión de quistes en agua contaminada, alimentos o por la ruta fecal-oral. 2) En el intestino delgado, cada quiste produce dos trofozoítos. 3) Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria longitudinal en el intestino delgado proximal, en este sitio se liberan o se unen a la mucosa mediante el disco ventral. 4) El enquistamiento ocurre cuando los trofozoítos viajan hacia el colon. 5) Los quistes son expulsados en las heces, al ser infecciosos es posible la transmisión de persona a persona. (Extraído de CDC., 2016).

Respuesta del sistema inmunológico a *G. lamblia*

El sistema inmunológico del hospedero actúa a nivel intestinal cuando *G. lamblia* coloniza en la luz del intestino delgado (Fig. 4) (18). La respuesta inmune innata en este sitio desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la barrera mucosa y lo conforman las secreciones antimicrobianas de las células de Paneth, que participan en

la defensa del epitelio intestinal. Estudios *in vitro* muestran que los péptidos lactoferrina y defensinas tienen función anti-giardial por lo que se infiere participan en la defensa contra este parásito (19).

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) y el óxido nítrico (NO) son moléculas citotóxicas e inmunomoduladoras durante las infecciones intestinales. En experimentos *in vitro*, el NO inhibe el crecimiento y el enquistamiento de *G. lamblia*, pero no repercute en su viabilidad (20). No obstante, *Giardia* compite con los enterocitos por la arginina, al consumirla impide que la NO sintetasas lleve a cabo la síntesis de NO, de esta manera coloniza con mayor facilidad el intestino delgado (20). Al igual que otros parásitos, *Giardia* tiene un gen que codifica la flavoproteína A, por lo que tiene actividad NO reductasa e inhibe el NO (21).

En la respuesta inmune adaptativa los linfocitos T son indispensables durante una infección por *Giardia*; se demostró que ratones CBA deficientes de linfocitos T son incapaces de controlar las infecciones por *G. lamblia* y *G. muris*; asimismo, la ausencia de células T CD4⁺ permite el desarrollo de cuadros de giardiasis crónica (22). Los linfocitos T CD4⁺ producen interferón gamma (IFN- γ) después de la estimulación con este parásito. El IFN- γ es una citocina que tiene la capacidad de activar macrófagos, aumentar la expresión de moléculas MHC I y II (del inglés *major histocompatibility complex*) e incrementar la presentación de antígeno, contribuyendo así con la eliminación del parásito. (23,24).

Los anticuerpos del isotipo IgA y las células B también son necesarias para la eliminación de este parásito en los modelos murinos y en el intestino del humano (25,26). Las personas con deficiencia de inmunoglobulinas son propensas a desarrollar giardiasis crónica (27). La IgA es una inmunoglobulina que predomina en las secreciones de las

mucosas, tales como las lágrimas, saliva, secreciones respiratorias, gastrointestinales y leche materna. Tras una infección aumenta la producción de IgA, y ante la presencia de *Giardia* se cree que actúa mediante la “exclusión inmune”, es decir, por desprendimiento de trofozoítos del epitelio, en lugar de eliminación directa, aunque se infiere que la IgA anti*giardial* puede ejercer efectos citotóxicos en *G. lamblia* (24,28).

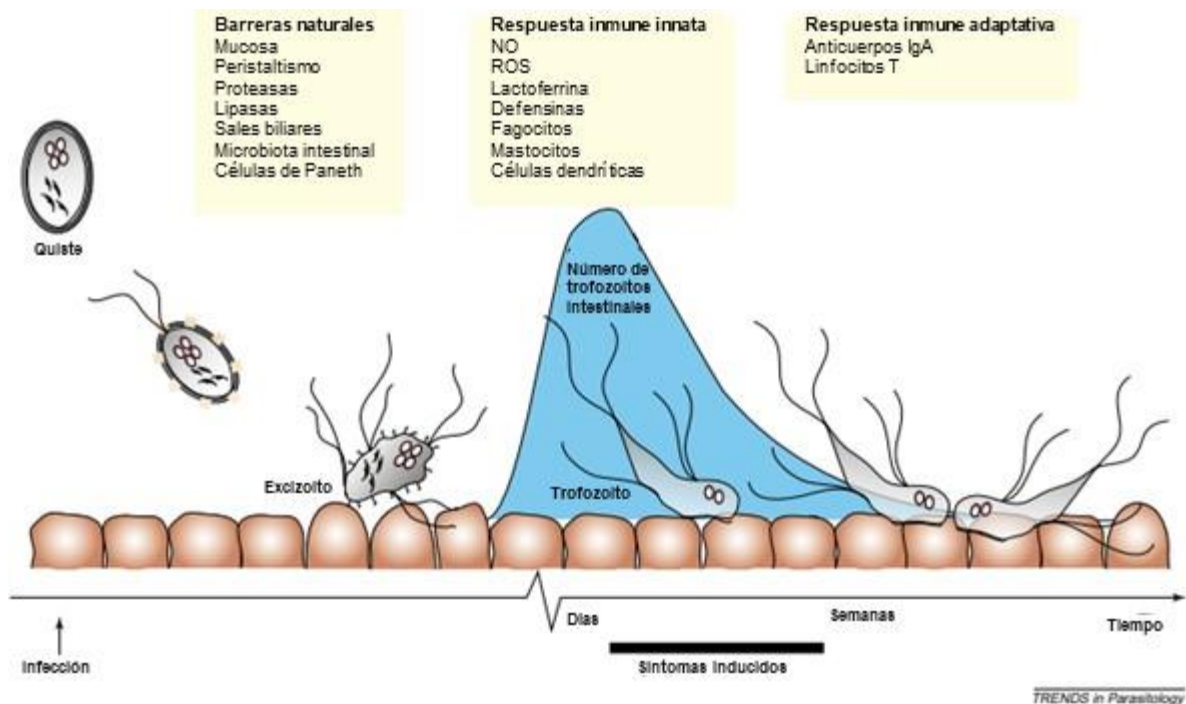


Figura 4. Interacción de *G. lamblia* con el intestino humano. La infección del intestino delgado comienza con la ingestión de quistes que se excretan en la parte superior del intestino delgado, seguidos de la liberación de excizoítos. La dosis infecciosa es baja, de 10 a 100 quistes de *Giardia* son suficientes para establecer una infección. El excizoíto se diferencia rápidamente en trofozoítos que se replican en la luz intestinal. A cierta concentración intestinal de trofozoítos, se inducen síntomas, generalmente de 6 a 15 días después de la infección. El epitelio intestinal además de ser una barrera física, tiene un papel central en la inmunidad innata y adaptativa de la mucosa en respuesta a estímulos externos. (Extraído de Roxström-Lindquist, 2006)

Factores de patogenicidad y virulencia

La patogenicidad es la capacidad de un microorganismo para causar daño a un hospedero, mientras que la virulencia es el grado de daño que un microorganismo puede causar a un hospedero (29).

Las proteasas son importantes factores de patogenicidad, dentro de las enzimas proteolíticas más abundantes en *Giardia* se encuentran las cisteína-proteasas y una de sus tantas funciones es que participa en el proceso de infección (30).

G. lamblia interacciona con las células epiteliales *in vitro* regulando la expresión de algunas proteínas mediante la inducción de cambios transcripcionales como las proteínas de membrana con alto contenido de cisteína (HCMP) (31). Las proteínas de superficie variable (del inglés *variant-specific surface protein* VSP) son los principales antígenos localizados en toda la superficie del trofozoíto. *Giardia* cambia constantemente la expresión de 200 genes que codifican para VSP diferentes en el genoma y sólo una proteína VSP se expresa por trofozoíto, por ello existe variación antigénica. Su papel biológico aún no está claro, pero sugiere que tienen actividad cisteína-proteasas (CP), por lo tanto actúan como mecanismo de defensa ante el sistema inmunológico del hospedero y cambios ambientales (32–34).

Se ha demostrado que las cisteína-proteasas (CP) catepsina B, CP14019, CP16160 y CP16779 son secretadas por *Giardia* tras la interacción con las células del hospedero *in vitro*, además, éstas pueden alterar y romper los complejos de unión apical (AJ) y las uniones estrechas (TJ). Además, pueden atravesar la barrera epitelial, escindir las IgA e IgG, y defensinas, degradar tanto el moco intestinal como a las quimiocinas que liberan las células epiteliales en respuesta a la infección parasitaria (Fig. 5) (35,36).

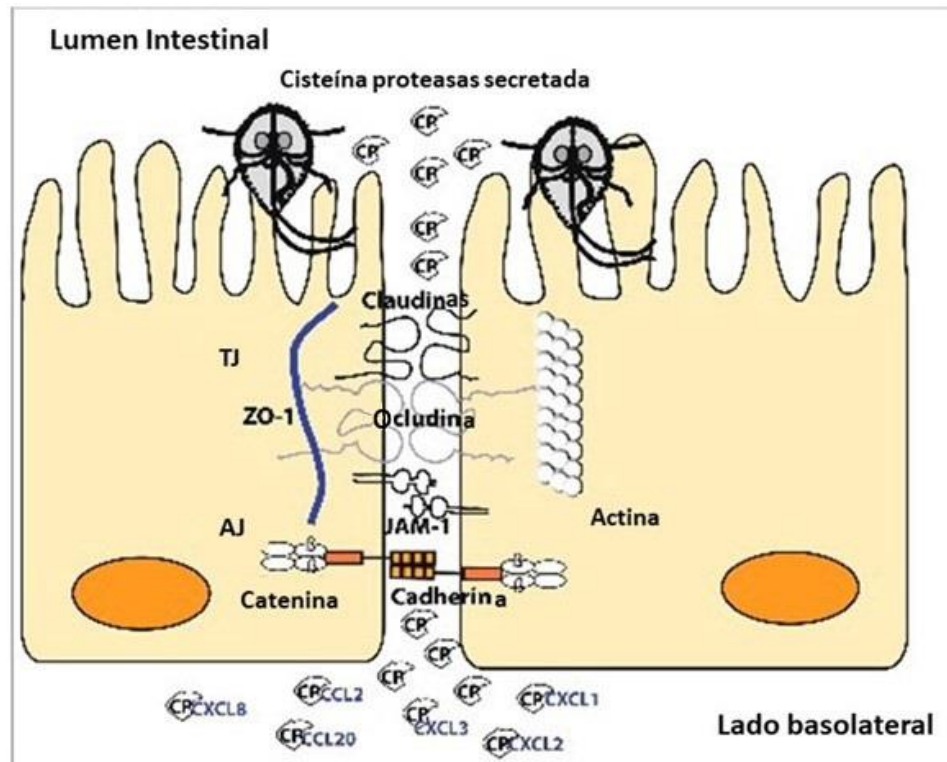


Figura 5. Modelo del funcionamiento de la CP catepsina B durante la interacción entre *G. lamblia* - células epiteliales. Las cisteína-proteasas: catepsina B de *Giardia* son liberadas durante la interacción hospedero-parásito tienen actividad proteolítica y son capaces de destruir los complejos de unión (TJ y AJ). Las CP pueden pasar la barrera epitelial y degradar las quimiocinas inducidas por las células epiteliales intestinales (Extraído de Liu J., 2018)

Especies reactivas de oxígeno, estrés oxidativo y antioxidantes.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^-) están formadas por la reducción parcial de oxígeno (37). Los ROS celulares se genera en cuatro fuentes definidas:

- a) Endógenamente en el proceso de fosforilación oxidativa mitocondrial: las mitocondrias consumen O_2 y lo reducen secuencialmente hasta producir agua. Una pequeña fracción del O_2 se metaboliza vía reducción univalente y los productos intermedios de esta reacción son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo.

- b) Los peroxisomas que contienen acil-coA oxidasa, dopamina β -hidroxilasa, y urato oxidasa generan peróxido de hidrógeno como producto intermediario.
- c) El sistema enzimático citocromo P450 constituye una defensa primaria contra varios xenobióticos y sustancias endógenas que aumentan la producción de radicales libres (RL).
- d) Los aniones superóxido pueden ser producidos cuando los fagocitos (monocitos, neutrófilos y macrófagos) destruyen células infectadas, mediante una descarga oxidante compuesta básicamente por el peróxido de hidrógeno, hipoclorito y óxido nítrico, además del anión superóxido (38).

Asimismo, pueden surgir de interacciones con fuentes exógenas tales como el Fe^{2+} y Cu^+ que promueven la generación de RL al reaccionar con peróxidos (39), de igual manera la radiación, algunos solventes orgánicos y pesticidas, la hiperoxia, entre otros (40). Cuando las ROS sobre pasan el sistema antioxidante por un aumento en los niveles de ROS o una disminución en la capacidad antioxidante celular, se produce el estrés oxidativo. El estrés oxidativo es una alteración producida por el desequilibrio entre la generación de RL y la defensa antioxidante, el cual conduce a un estado de daño de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (41).

Dado que las ROS y otras formas de RL se producen constantemente en forma inevitable durante los procesos metabólicos, las células desarrollan un sistema de defensa para limitar la exposición a estos agentes que reciben el nombre genérico de antioxidantes (AO) (42) y pueden definirse como moléculas que previenen la formación descontrolada de RL o inhiben sus reacciones con estructuras biológicas (43).

Sistema antioxidante en otros parásitos

Los parásitos muestran actividades enzimáticas para contrarrestar el estrés oxidativo provocado por células fagocíticas durante los procesos infecciosos. Por ejemplo, el parásito *Entamoeba histolytica* carece de los mecanismos de defensa antioxidantes que están presentes en otros organismos procariontes y eucariontes como la catalasa, peroxidasa y enzimas del sistema del glutatión (44). Durante la invasión tisular al hospedero, los trofozoítos se defienden contra las ROS y las especies reactivas del nitrógeno (RNS) a través de enzimas como la peroxirredoxina, superóxido dismutasa, flavoproteína A, tiorredoxina y tiorredoxina reductasa (45). El sistema Trx / Trx reductasa es crucial para amortiguar proteínas sensibles bajo estrés oxidativo (46). Además, se ha descrito la presencia de ROS cuando *E. histolytica* adhiere sus trofozoítos sobre las células epiteliales del colon, desencadenando la activación de enzimas NADPH oxidasa 1 (NOX1) que provocan la muerte celular dependiente de ROS (45).

Por otra parte, *Trypanosoma cruzi* posee antioxidantes como la tryparredoxin peroxidasa citoplásmica (TcCPX) que confiere resistencia a la muerte por los macrófagos y al igual que la peroxidasa mitocondrial (TcMPX) son esenciales para la desintoxicación por ROS (47,48).

Respuesta al estrés oxidativo en *G. lamblia*

El duodeno infectado por *Giardia* tiene un ambiente aeróbico y las concentraciones de O₂ alcanzan un máximo de 60 μM (49). Las ROS se producen en niveles bajos para la señalización y la homeostasis intestinal, cuando hay una invasión parasitaria los niveles

de ROS son altos (49). Por su parte, *G. lamblia* puede consumir pequeñas cantidades de O₂, sin embargo esta actividad cesa en 90 min a concentraciones de O₂ superiores a 50 μM (50). Su capacidad para consumir O₂ se debe a que el oxígeno puede servir como un aceptor terminal de electrones.

Tras la reducción de O₂, se producen el anión O₂⁻ y H₂O₂; ambos pueden reaccionar con hierro endógeno (Fe²⁺) para producir radicales hidroxilo (OH^{*}) altamente tóxicos (51). Además, se ha demostrado que la enzima DT diaforasa (NADPH: menadiona oxidorreductasa), aumenta la susceptibilidad de *G. lamblia* por el O₂ al aumentar los niveles de H₂O₂ intracelular. En condiciones aeróbicas, el metabolismo de la glucosa sigue siendo fermentativo; sin embargo, el catabolismo de piruvato experimenta diferentes vías dependiendo de la presión de O₂. Lo antes mencionado sobre el metabolismo de *Giardia* afirman que el O₂ y sus productos metabólicos afectan la viabilidad de este parásito (49).

Se conoce que el estrés oxidativo en *Giardia* afecta la permeabilidad de la membrana plasmática, el volumen celular y la homeostasis intracelular, conduciendo al bloqueo del ciclo celular y por lo tanto la muerte del trofozoíto (50).

A pesar de que el sistema inmunológico en el intestino delgado induciría un alto estrés oxidativo en *Giardia*, es increíble como este microorganismo que carece de mitocondrias y aparentemente de los sistemas de detoxificación de O₂ (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa), prospera en el ambiente hostil del duodeno (52).

La defensa de *G. lamblia* ante el estrés oxidativo se debe a los tioles reducidos y al sistema de tiorredoxina, que incluyen tiorredoxina (Trx), tiorredoxina reductasa (TrxR) y NADPH, los cuales desempeñan un papel importante en el mantenimiento de un

entorno intracelular reducido (51). La cisteína es el tiol principal antioxidante y se encarga de la defensa oxidativa mediante la regulación positiva de la transcripción de los genes que codifican las proteínas de superficie variable (VSP) ricas en cisteína y las proteínas de membrana con alto contenido de cisteína (HCMP); estas proteínas desempeñan funciones de defensa contra el estrés oxidativo exógeno, básicamente debido a su ubicación en la superficie y a su composición aminoacídica (51,53).

Para mantener una relación óptima de tiol-disulfuro intracelular, *Giardia* utiliza la enzima disulfuro-reductasa similar a Trx dependiente de NADPH. Dicha enzima es capaz de reducir la cistina, preservando los niveles intracelulares de cisteína. Los electrones se transfieren desde NADPH a sus respectivos sustratos que contienen tiol y esto ayuda a regenerar los niveles de NADP⁺ (53).

Los genes en el sistema de tiorredoxina (Prx1, Trx y Trx reductasa) tienen un papel central en la respuesta de expresión génica ante el estrés oxidativo, en conjunto con los genes que codifican para algunas enzimas metabólicas, como enzimas productoras de NADPH o enzimas que participan en la biosíntesis de glutatión y glicerol, así como en la desintoxicación del óxido nítrico, entre otras (49).

Gracias a la secuenciación del genoma y a los avances en el estudio de la biología molecular de *Giardia*, recientemente se pudo demostrar la presencia de peroxirredoxinas (Prxs), que son un conjunto de enzimas antioxidantes que participan en la detección y desintoxicación del H₂O₂, ROS, NOS y el peroxinitrito (ONOO⁻) producido a partir de la reacción de O₂ con NO (54).

En algunos mamíferos como el humano, se sabe que las Prxs participan en la regulación de la transducción de señales mediante el control de los niveles de peróxido

inducido por citocinas. La actividad de la tiorredoxina peroxidasa (POX) es el sello distintivo de las proteínas Prx (55).

Peroxisomas y Vía de señalización PRX

Uno de los organelos celulares involucrados en la detoxificación de ROS son los peroxisomas, pero a diferencia de organelos como el núcleo o las mitocondrias no se han estudiado lo suficiente, debido en gran medida a la diversidad en tamaño, forma y componentes entre las diferentes especies (56).

En la mayoría de las células eucariontes, las peroxirredoxinas forman parte de la maquinaria metabólica de los peroxisomas que aparentemente no están presentes en todos los organismos eucariontes (56).

Las peroxirredoxinas son proteínas antioxidantes que se encuentran dispersas en el citoplasma o que pueden estar presentes en compartimentos celulares como mitocondria, núcleo, membrana, cloroplastos, peroxisomas e incluso ser exportadas de la célula (57). Están altamente conservadas a lo largo de la evolución, ya que están presentes desde las bacterias hasta los eucariontes superiores, incluido el humano. Estas proteínas metabólicas se encargan principalmente de la oxidación y reducción del peróxido en el sistema antioxidante de los peroxisomas (57,58).

En la vía de señalización PRX están involucradas principalmente 3 proteínas la tiorredoxina (Trx), tiorredoxina reductasa 1 (TXNRD1/ TrxR) y peroxirredoxina (Prx).

La Trx es una enzima de bajo peso molecular (12 kDa) que se encarga de la reducción de otras enzimas mediante el intercambio de cistina tiol-disulfuro; juega un papel importante en la reducción de cantidades de ROS y en los procesos de señalización redox. La Trx1 tiene un peso molecular de 55 kDa, se localiza en el citoplasma y posee

actividad glutarredoxina y tiorredoxina reductasa. Trx utiliza su enlace disulfuro redox-activo para reducir la tiorredoxina oxidada. Por último, la peroxirredoxina 1 es una enzima antioxidante de 22 kDA de peso molecular que ayuda a regular los niveles de peróxido y de igual manera está involucrada en la señalización redox; la actividad de dicha enzima se regenera después de ser reducida por la tiorredoxina (59,60).

Durante décadas se ha reportado en la literatura que *G. lamblia* es uno de esos organismos que carecen de peroxisomas (4,56,58). Sin embargo, recientemente se identificaron proteínas características de peroxisomas localizadas en vesículas similares a dichos organelos, lo que podría, en conjunto con los hallazgos de peroxirredoxinas, sugerir la presencia de dicho organelo en el parásito (54,61).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El parásito *G. lamblia* carece de los sistemas de desintoxicación de O₂ que poseen otras células eucariotas como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa e incluso de organelos involucrados en dicho proceso, como la mitocondria o el peroxisoma; sin embargo, el parásito es capaz de vivir en el ambiente hostil del duodeno.

Recientemente se han identificado proteínas que pudieran sugerir la presencia de peroxisomas en el parásito como la acil- CoA sintetasa de cadena larga 4, la peroxina-4 o las peroxirredoxinas GiPrx1a y GiPrx1b; todas ellas proteínas relacionadas a los peroxisomas en otros sistemas biológicos, fundamentales para el sistema antioxidante de las células eucariontes.

La tiorredoxina (Trx), la tiorredoxina reductasa 1 (TXNRD1 o TrxR) y la peroxirredoxina 1 (PRDX o Prx) son enzimas fundamentales en el sistema antioxidante

de muchas células eucariontes, por lo que en este trabajo nos enfocaremos en analizar su expresión en extractos de trofozoítos de *G. lamblia*.

Resulta de nuestro interés analizar la expresión de las proteínas de la vía de señalización PRX para ampliar las evidencias que sustenten la presencia de un sistema antioxidante y de peroxisomas en *Giardia*. De ser así, estas proteínas podrían ser un nuevo blanco terapéutico en el tratamiento de la giardiasis.

HIPÓTESIS

Se ha descrito que los trofozoítos de *Giardia lamblia* poseen peroxisomas-like y proteínas relacionadas con los peroxisomas, por ello, se espera que expresen al menos una de las proteínas de la vía Peroxirredoxina: PRX (Trx, TrxR y Prx).

OBJETIVOS

GENERAL:

- Analizar la expresión de proteínas involucradas en la vía de señalización Prx en la fase de trofozoíto de *Giardia lamblia*

PARTICULARES:

1. Análisis bioinformático de las proteínas involucradas en la vía de señalización Prx (Trx, TrxR y Prx) en *Giardia lamblia* y sus respectivos ortólogos en otros organismos.
2. Evaluación de la expresión de las proteínas Prx, TrxR y Trx en extractos de trofozoítos de *Giardia lamblia*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

Tipo de estudio: Observacional, comparativo, prolectivo y transversal.

- **Objetivo particular 1:**

Se utilizaron diferentes bases de datos (KEGG, NCBI, EuPathDB, *Giardia*DB) para la obtención de secuencias de proteínas involucradas en la vía PRX (Prx, TrxR y Prx) de *G. lamblia* y sus respectivos ortólogos. A las secuencias obtenidas se les hizo un análisis que comenzó con la identificación de dominios funcionales mediante el programa HMMSCAN y PFAM. La predicción de estructuras terciarias se realizó mediante el servidor RaptorX. Para la comparación de las estructuras terciarias se usó el software Chimera y se hizo a partir de las estructuras obtenidas en formato PDB en RaptorX. Las secuencias obtenidas en *Giardia* y sus ortólogos en otros organismos se alinearon mediante los programas Muscle y Needle. Para la predicción de la localización subcelular de las tres proteínas, se usó el servidor PSORTII y la predicción de los interactomas se hizo mediante el programa STRING 2.0.

- **Objetivo particular 2:**

- ✓ Cultivo de *Giardia lamblia* en la fase de trofozoíto

Se realizaron cultivos de trofozoítos de la cepa IMSS-3 de *G. lamblia* en medio TYI-S33 complementado con suero bovino adulto más vitaminas al 10% y penicilina-estreptomicina al 1% (62,63) hasta que alcanzó su fase logarítmica de crecimiento óptimo.

✓ Cultivo de células HeLa

Se realizaron los cultivos de células HeLa en cajas Corning® de 25 cm² en medio DMEM advanced complementado con suero fetal bovino al 5%, glutamina al 2% y penicilina-estreptomicina al 1%.

✓ Preparación de extractos de proteínas

Se prepararon extractos celulares de cultivos confluentes de trofozoítos y de células HeLa (grupo control); dichos extractos fueron tratados con buffer de lisis (RIPA) complementado con un cocktail de inhibidores de proteasas: N-etilmaleimida (NEM), Clorhidrato de Tosil-L-lisil-clorometano (TLCK), leupeptina, aprotinina, yodoacetamida (IAA) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Las células se lisaron mediante cinco ciclos de sonicación-hielo (30" sonicación - 1' en hielo). Posteriormente se centrifugaron los extractos a 14000 rpm durante 20 min a 4°C, se colocó el sobrenadante de los extractos en tubos eppendorf y se cuantificó la concentración de proteína utilizando un método fluorométrico en el equipo Qubit. Posteriormente se tomaron 20 µg de proteína de cada uno los extractos obtenidos, se mezclaron con buffer de muestra 1x en proporción 1:1 y se colocaron a 95° C durante 5 min para la desnaturalización de las proteínas.

✓ Electroforesis unidimensional

Se realizó una electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida al 13.5% para separar las proteínas con base en su peso molecular. Se cargaron los pozos del gel en el siguiente orden: marcador de peso molecular (6 µL), extracto de trofozoítos de *Giardia* (20 µg de proteína), HeLa (20 µg de proteína), marcador de peso molecular (6 µL), extracto de trofozoítos de *Giardia* (20 µg de proteína) y HeLa (10 µg de proteína).

La corrida electroforética se realizó en dos etapas, la primera a 150 V durante 15 min para permitir la concentración de las proteínas en el gel y la segunda a 80 V durante 150 min o hasta su completa separación. Por experimento, se corrieron de dos a tres geles, un gel fue teñido con azul de Coomassie para obtener el perfil proteico y los restantes se transfirieron a una membrana PVDF. El gel correspondiente al perfil proteico fue digitalizado en el equipo Gel Doc™ EZ Gel Documentation System.

✓ Western blot

Para observar la expresión de las proteínas de la vía PRX (Trx, TrxR y Prx) los geles fueron transferidos a membranas de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas con leche en polvo baja en grasa al 5% disuelta en TBS-T (solución bloqueadora) durante 1 h a temperatura ambiente. Para la detección de las proteínas de la vía, se utilizó el anticuerpo anti-PRX Pathway Cocktail (Abcam ab184868) a una dilución 1:1000 en solución bloqueadora y se dejó durante toda noche a 4°C. Después de la incubación del anticuerpo primario, la membrana se lavó con TBS-T (10 veces, 5 min). Como anticuerpo secundario se utilizó HRP IgG anti-rabbit; (Jackson ImmunoResearch 111-035-003) en dilución 1:10000 en TBST y posteriormente se lavó la membrana con TBS-T (10 veces, 5 min).

El revelado se realizó utilizando la técnica convencional de quimioluminiscencia con luminol-H₂O₂ Immobilon Western (WBKLS0500) y se emplearon placas radiográficas de la marca Carestream; una vez que la membrana comenzó a dar la reacción quimioluminiscente, se procedió a colocar las placas de revelado, dejándolas exponer entre 10 y 60 segundos, para posteriormente colocarlas en solución reveladora (Carestream, REF 515 813) y después de la aparición de bandas se fijó la placa con la

solución fijadora (Carestream, REF 515 813). Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis densitométrico en el programa ImageJ.

Después de haber revelado la membrana, se colocó en stripping buffer pH 2.2 (15 min), se lavó con: PBS 1X (10 min), TBS 1X (10 min), TBS-T 1X (5 min) previo a la activación de la membrana con metanol (5 min), se lavó con TBS-T 1X (5 min) y se bloqueó con leche al 5% (1h). La técnica de stripping se realizó para desnudar y re-utilizar la misma membrana, para de esta manera monitorear la concentración de proteína que se había cargado en cada carril y verificar que haya sido equivalente (control de carga). Para este segundo ensayo como control de carga se utilizó el anticuerpo primario anti-actina (Millipore MAB1501R) en dilución 1:1000 durante una hora. Después de la incubación, la membrana se lavó con TBS-T (10 veces, 5 min). Como anticuerpo secundario se utilizó HRP IgG anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology sc-2005) en una dilución 1:5000 en TBST 1X y se lavó la membrana con TBS-T (10 veces, 5 min). Finalmente se reveló con la técnica de quimioluminiscencia ya mencionada.

RESULTADOS

Objetivo 1. Análisis bioinformático de las proteínas involucradas en la vía de señalización Prx (Prx, TrxR y Trx) en *G. lamblia* y sus respectivos ortólogos en otros organismos

La Bioinformática es una herramienta que engloba técnicas computacionales, estadísticas y matemáticas para el análisis y generación de datos biológicos. A continuación, se describirá el análisis *in silico* de las proteínas Prx, TrxR y Trx.

Prx

De la base de datos KEGG se obtuvieron las secuencias de la proteína peroxirredoxina Prx para diferentes especies: *Giardia lamblia* (Gla), *Homo sapiens* (Hsa), *Drosophila melanogaster* (Dme), *Arabidopsis thaliana* (Ath), *Entamoeba histolytica* (Ehi), *Naegleria gruberi* (Ngr) y *Saccharomyces cerevisiae* (Sce); dichas secuencias se analizaron en diferentes programas online, obteniendo el alineamiento de pareado y múltiple de las secuencias, identificación de dominios funcionales (Fig. 6 II), predicción de localización celular y de estructuras terciarias, así como la formación de interactomas.

Se realizó la búsqueda de ortólogos en la base de datos KEGG utilizando como referencia la secuencia PRX1 de *H. sapiens* (5052 K13279); al realizar el blast, se identificó el ortólogo PRX1 de *G. lamblia* (GL50803_14521), proteína conformada por 201 aminoácidos y tres dominios: C-terminal de la peroxirredoxina 1-Cys (1-cysPrx), redoxin y el dominio compuesto por dos moléculas: la alquilhidroperóxido reductasa (AhpC) y el antioxidante específico de tiol (TSA) (Fig. 6 I).

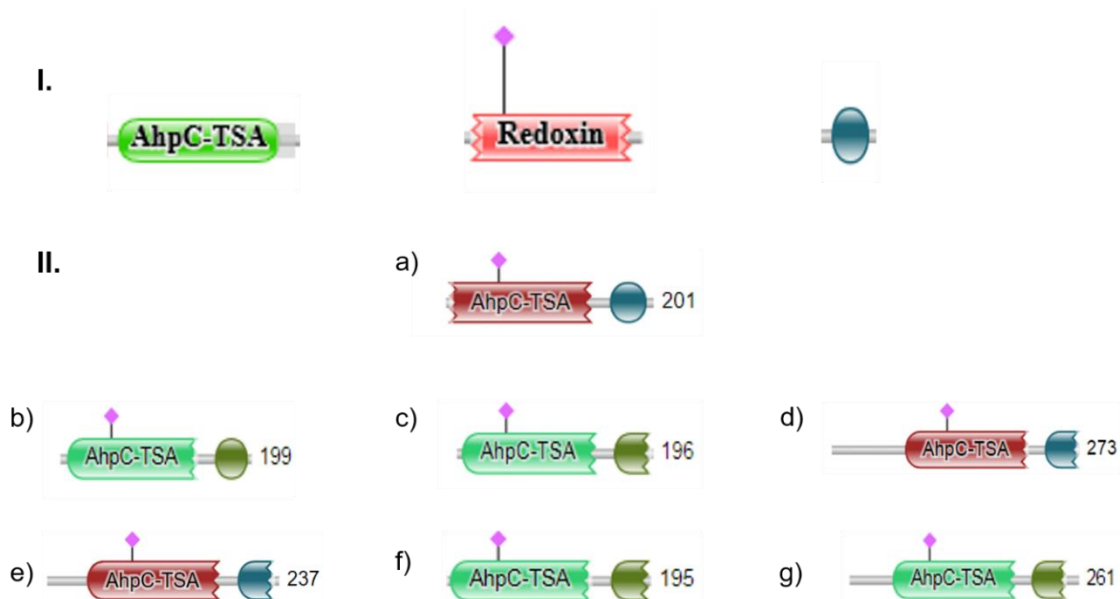


Figura 6. I. Dominios de la PRX. Está constituido por el dominio compuesto por dos moléculas: la alquilhidroperóxido reductasa (AhpC) y el antioxidante específico de tiol (TSA), redoxin y el C-terminal de la peroxirredoxina 1-Cys (1-cysPrx), **II.** Dominios de las proteínas PRX: a) *G. lamblia*, b) *H. sapiens*, c) *D. melanogaster*, d) *A. thaliana*, e) *E. histolytica*, f) *N. gruberi*, g) *S. cerevisiae*.

Posteriormente se realizó un alineamiento pareado en el servidor EMBOSS Needle entre la secuencia de *G. lamblia* con su respectivo ortólogo en las demás especies, mostrándose el porcentaje de similitud e identidad de ambas secuencias en la tabla 1 y sus respectivos alineamientos en la figuras subsecuente (Fig. 7) (64).

Organismo	% Identidad	% Similitud
<i>H. sapiens</i>	50.0	65.5
<i>D. melanogaster</i>	40.9	59.6
<i>A. thaliana</i>	34.3	46.8
<i>E. histolytica</i>	35.0	51.7
<i>N. gruberi</i>	46.8	63.7
<i>S. cerevisiae</i>	21.6	35.8

Tabla 1. Porcentaje de identidad y similitud de la Prx con respecto a *G. lamblia*. La identidad es el porcentaje de coincidencias de los mismos aa entre las dos secuencias alineadas, mientras que la similitud es el porcentaje de aa que tienen características fisicoquímicas similares.

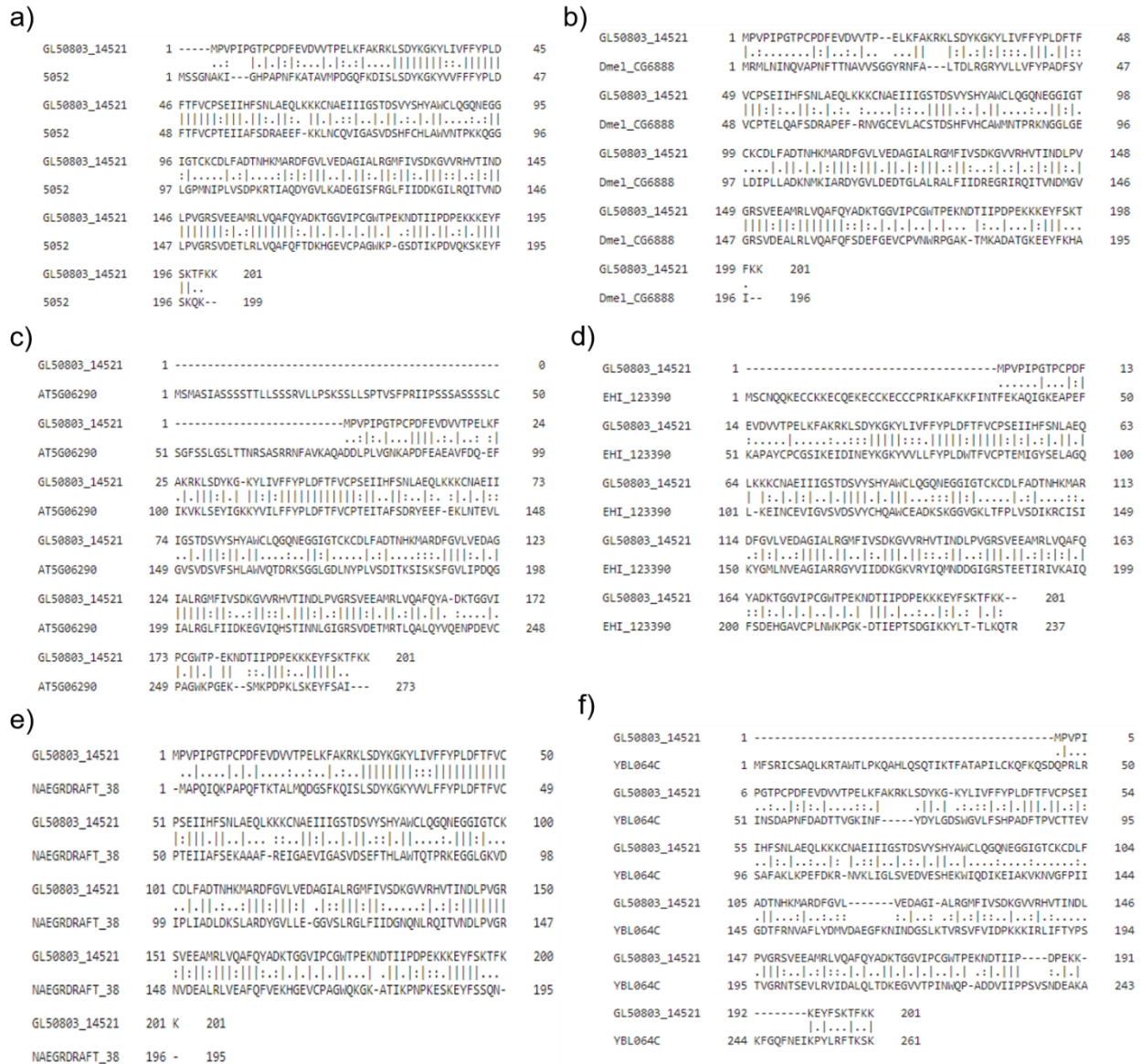


Figura 7. Alineamiento pareado de las proteínas Prx: a) *G. lamblia* contra *H. sapiens*, b) *G. lamblia* contra *D. melanogaster*, c) *G. lamblia* contra *A. thaliana*, d) *G. lamblia* contra *E. histolytica*, e) *G. lamblia* contra *N. gruberi*, f) *G. lamblia* contra *S. cerevisiae*. En los alineamientos pareados se observan las siguientes acotaciones: “I” significa que en esa posición tiene un aminoácido conservado, “:” indica la conservación entre grupos de propiedades muy similares y finalmente “.” se refiere a la conservación entre grupos de propiedades débilmente similares.

De igual manera se tomaron los ortólogos de la Prx de los siete organismos ya mencionados para la realización de un alineamiento múltiple en MUSCLE (Fig. 8).

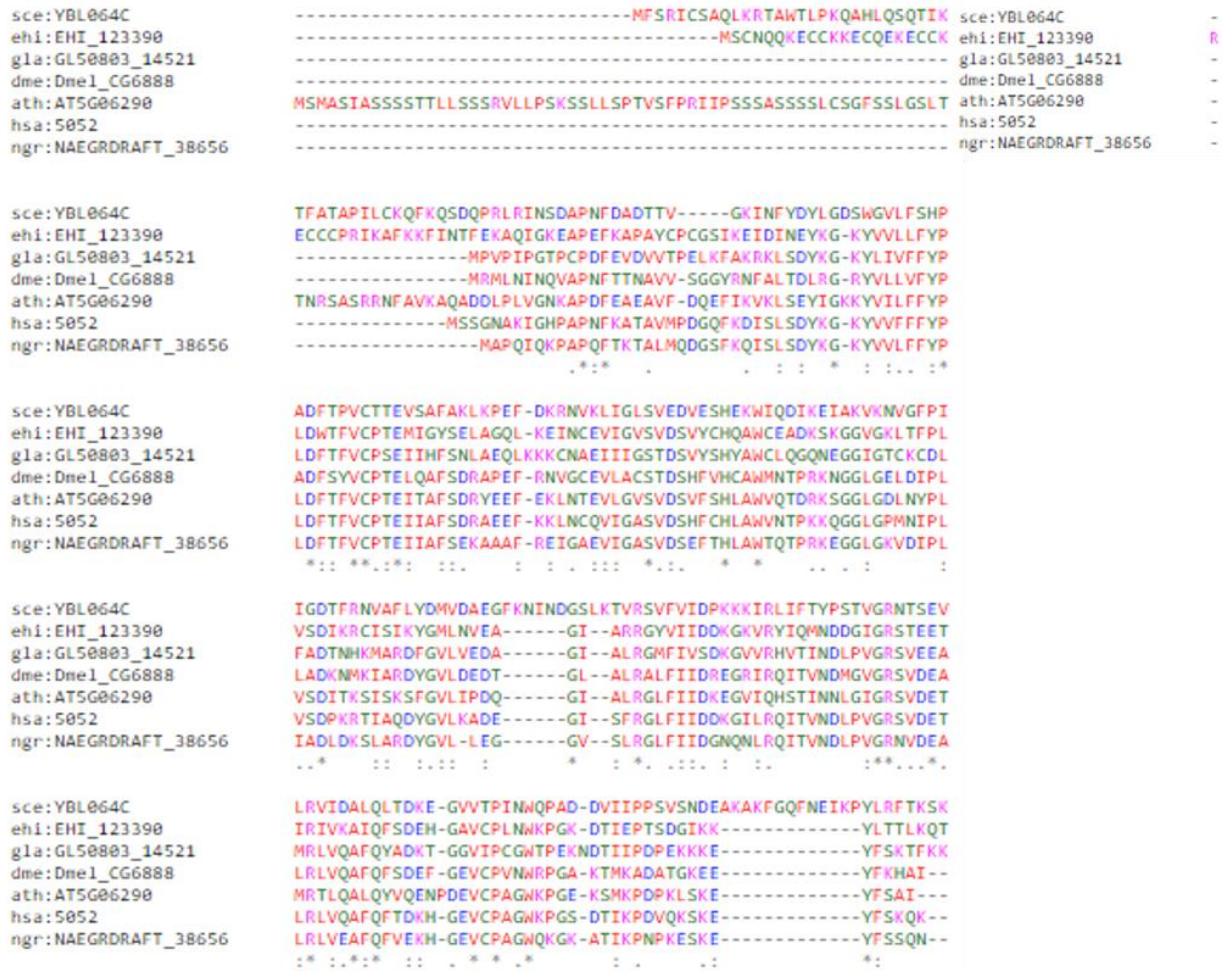


Figura 8. Alineamiento múltiple en MUSCLE de las proteínas Prx. Cada color representa una propiedad del aminoácido; rojo: aminoácidos con cadena lateral hidrofóbica, azul: ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), rosa: básicos, y verde: aminoácidos que en su cadena lateral tienen un grupo hidroxilo, sulfhidrilo o amino. La acotación “*” indica que en esa posición presentan un aminoácido conservado, “:” indica la conservación entre grupos de propiedades muy similares y por último “.” se refiere a la conservación entre grupos de propiedades débilmente similares.

Por otro lado, se realizó la predicción de las estructuras terciarias en el programa Raptor X de las Prxs para *G. lamblia*, *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *A. thaliana*, *E. histolytica*, *N. gruberi* y *S. cerevisiae* (Fig. 9). Debido a su alta similitud las secuencias de *G. lamblia* y *H. sapiens* se recuperaron en formato PDB para hacer la superposición de las estructuras en el programa USCF Chimera (Fig. 10)

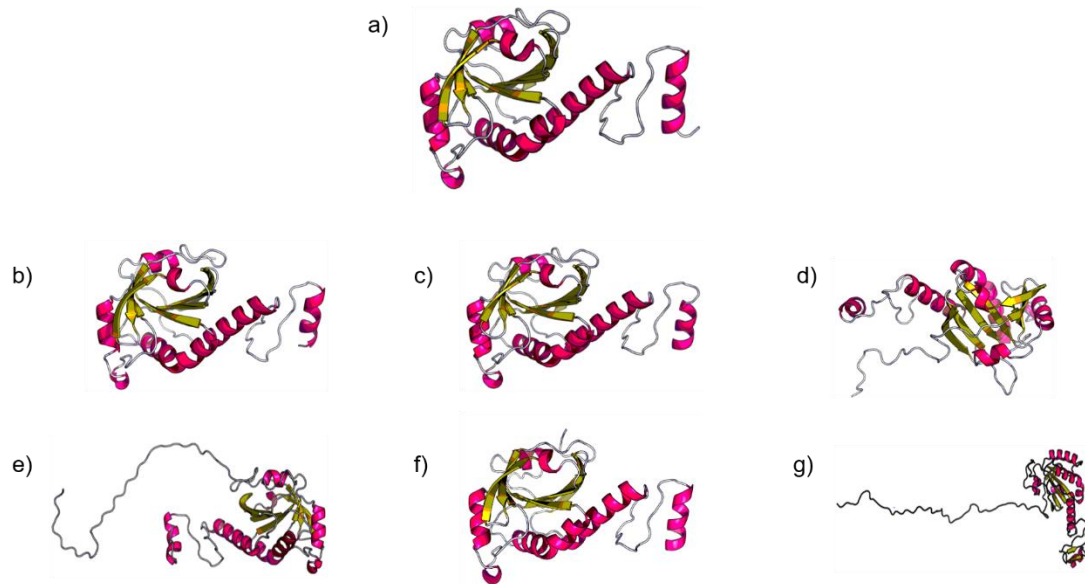


Figura 9. Predicción de estructuras terciarias de la PRX de: a) *G. lamblia*, b) *H. sapiens*, c) *D. melanogaster*, d) *A. thaliana*, e) *E. histolytica*, f) *N. gruberi*, g) *S. cerevisiae*. En la imagen se observa la similitud entre las proteínas de *G. lamblia*, *H. sapiens*, *D. melanogaster* y *N. gruberi*.

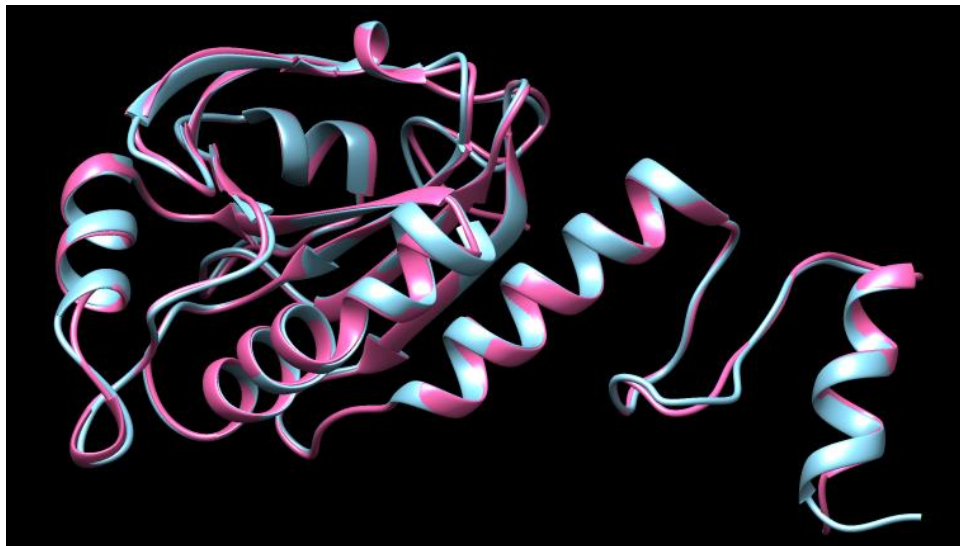


Figura 10. Superposición en USCF Chimera de las PRX de *H. sapiens* (rosa) y *G. lamblia* (azul). En la imagen se observa la similitud de las proteínas TrxR.

Empleando el programa PSORT II se hizo la predicción de la localización celular *in silico*, se obtuvo que la PRX de *G. lamblia* tiene una probabilidad del 47.8% de encontrarse en el citoplasma y del 34.8% en el núcleo.

Finalmente, con el programa String 2.0 se obtuvo que PRX 1 de *G. lamblia* tiene la capacidad de interactuar con proteínas de la superfamilia redox tiorredoxina como las proteínas disulfuro isomerasa (PDI1, PDI2, PDI3, PDI4 y PDI5), la tiorredoxina reductasa, de igual manera con la piruvato-flavodoxina oxidorreductasa y la ADN topoisomerasa II (Fig. 11).

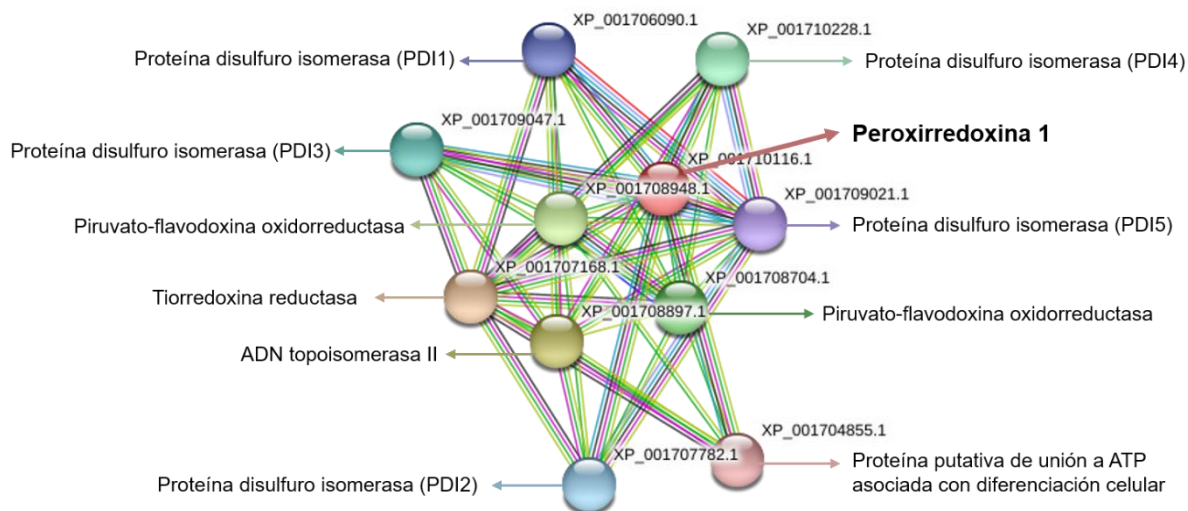


Figura 11. Interactoma de la PRX de *G. lamblia* en String 2.0

TrxR

La tiorredoxina reductasa (TrxR) cataliza la reducción dependiente de NADPH de la tiorredoxina (Trx), así como también de otros compuestos endógenos y exógenos (65). Debido a que la especie *D. melanogaster* carece de esta proteína se sustituyó por *T. vaginalis*; para el análisis bioinformático se utilizaron las secuencias de *G. lamblia* y los ortólogos de *H. sapiens*, *A. thaliana*, *E. histolytica*, *N. gruberi*, *S. cerevisiae* y *T. vaginalis*. Se encontró que la proteína TrxR de *G. lamblia* (GL50803_9827) tiene 314 aa, está codificada en un gen de 945 nucleótidos y constituida por 3 dominios de Piridina nucleótido-disulfuro oxidorreductasa: Pyr_redox, Pyr_redox_2 y Pyr_redox_3. (Fig. 12).

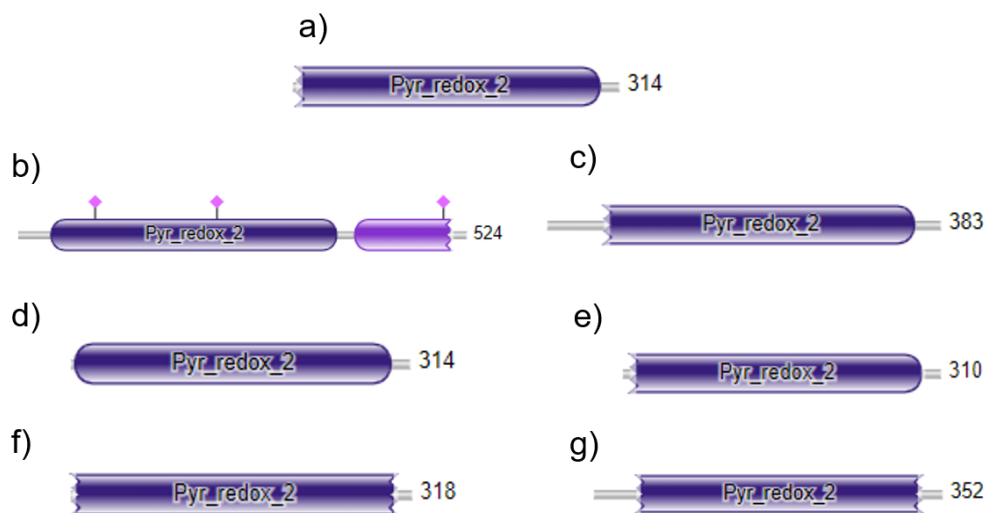


Figura 12. Dominios de las proteínas TrxR: a) *G. lamblia*, b) *H. sapiens*, c) *A. thaliana*, d) *E. histolytica*, e) *N. gruberi*, f) *S. cerevisiae*, g) *T. vaginalis*. La proteína TrxR está constituida por 3 dominios de Piridina nucleótido-disulfuro oxidorreductasa: Pyr_redox, Pyr_redox_2 y Pyr_redox_3.

Luego de identificar los dominios para todas las secuencias, se hizo un alineamiento pareado en el servidor EMBOSS Needle, obteniéndose el porcentaje de identidad y similitud de las secuencias de *G. lamblia* contra las demás especies mostrados en la tabla 2, y sus alineamientos correspondientes. (Fig. 13).

Organismo	% Identidad	% Similitud
<i>H. sapiens</i>	15.7	24.7
<i>A. thaliana</i>	39.0	52.8
<i>E. histolytica</i>	44.1	61.5
<i>N. gruberi</i>	20.3	38.1
<i>S. cerevisiae</i>	44.0	61.8
<i>T. vaginalis</i>	37.3	53.2

Tabla 2. Porcentaje de similitud e identidad de la TrxR con respecto a *G. lamblia*. La identidad es el porcentaje de coincidencias de los mismos aa entre las dos secuencias alineadas, mientras que la similitud es el porcentaje de aa que tienen características fisicoquímicas similares.

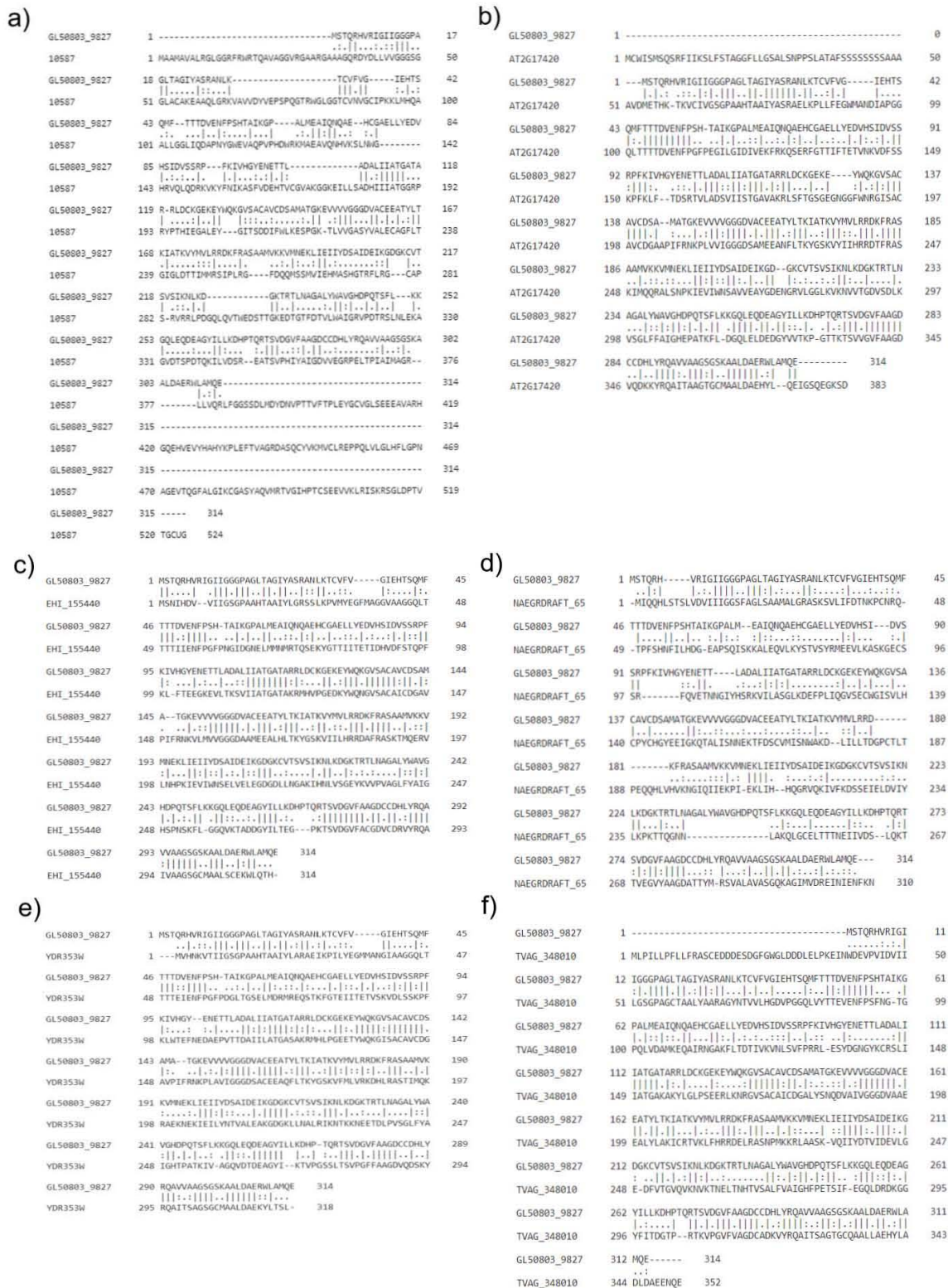


Figura 13. Alineamiento pareado de las proteínas TrxR: a) *G. lamblia* contra *H. sapiens* b) *G. lamblia* contra *E. histolytica*, c) *G. lamblia* contra *E. histolytica*, d) *G. lamblia* contra *N. gruberi*, e) *G. lamblia* contra *S. cerevisiae*, f) *G. lamblia* contra *T. vaginalis*. El símbolo “|” significa que en esa posición tiene un aminoácido conservado, “:” indica la conservación entre grupos de propiedades muy similares y finalmente “.” se refiere a la conservación entre grupos de propiedades débilmente similares.

Asimismo, se hizo un alineamiento múltiple (Fig. 14)

```

ngr:NAEGRDRAFT_65055          -----MIQQHLSTSLVD
hsa:10587                      -----MAAMAVALLRGLGGRFRVRTQAVAGGVRGAARGAAGQRDYD
gla:GL50803_9827              -----MSTQRHVR
tva:TVAG_348010              -----MLPILLPFLFRASCEDDESDGFGHGLDDLELPKEINNDQVPIID
ehi:EH1_155440              -----MSNIHD
sce:YDR353W                  -----MWHNK
ath:AT2G17420                MCHISMSQSRFIIKSLFSTAGGFLLSALSNPPSLATAFSSSSSSSSAAAADVNETHKTK

ngr:NAEGRDRAFT_65055          VIIIGGSFAGLSAAMALGRASKSVLIFD--TNKPCNRQTFFSHNFILHD-GEAPSQI-SK
hsa:10587                      LLVWGGSSGLACAKAAQLGRKVAVD--YVEPSQGTNRNGLGGTCVMVGCIPKLMHQ
gla:GL50803_9827              IGIIGGPGAGLTAGIYASRANLKTQVFD----GIEHTSQMFTTDDVENFPFH-TAI-KG
tva:TVAG_348010              VIILGSGPAGCTAALYARAGYNTVVLH----GDVPGGQLVYTTIEVENFPFNG--TG
ehi:EH1_155440              VVIIGSGPAAHTAAIYLGRSSLKPMVYEGFMAGGVAAGGQLTTTTIIEENFPFNGI-DG
sce:YDR353W                  VTIIIGSGPAAHTAAIYLARAEIKPILYEGFMANGIAAGGQLTTTTIEENFPFNGI-DG
ath:AT2G17420                VCIIGSGPAAHTAAIYASRAELKPLLEFGMAMANDIAPGGQLTTTTDVENFPFNGI-LG
                                :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
                                :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

ngr:NAEGRDRAFT_65055          KALEQVLKYSTVSYRMEE-----VLKA-----SKGECSSR-FQVET---
hsa:10587                      AALLGGLIQDAPNYGVEVAQPVPHDWRKMAEAVQNHVKSLNWHGRVQLQDRKVKYFNIA
gla:GL50803_9827              PALMEAIQQAIEHCGAEL-----LYEDV-----HSIDVSSRPFKIVH---
tva:TVAG_348010              POLVDANKQAIKNGAKF-----LTDTI-----VKVNLVFPFRRLS-
ehi:EH1_155440              NELMMNRTQSEKYGTTI-----ITETI-----DHVDFSTQPFKLF-
sce:YDR353W                  SELMDNRREQSTKFGTEI-----ITETV-----SKVDLSSKPFKLT-
ath:AT2G17420                IDIVEKFRKQSERFGTTI-----FTETV-----NKVDFSSKPFKLF-
                                :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
                                :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

ngr:NAEGRDRAFT_65055          -----NNGIYH--SRKVLASGLKDEFF-LIQGVSE----CWGISVLHCPYC
hsa:10587                      SFVDEHTVCGVAKGGKILLSDHIIITATGGPRPYPTHEGAL-----Y---GITSDDFF
gla:GL50803_9827              GYENETTL--ADALIIATGATARRL-DCKGEKE----YWKGVSAACAVC
tva:TVAG_348010              YDNGYK--CRSLIATGAKAKYL-GLPSEER----LKNRQVSAACIC
ehi:EH1_155440              EEGEVL--TKSVIIATGATAKRM-HVPGEDK----YWKGVSAACIC
sce:YDR353W                  EFNEDAEPVT--TDAILATGASAKRM-HLPGEET----YWKGVSAACAVC
ath:AT2G17420                DSRITVL--ADSVIISTGAVAKRL-SFTGSGEGNGGPNRGISACAVC
                                :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
                                :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

ngr:NAEGRDRAFT_65055          HGVEEI--GKQTALISNNEKTFDSCVMISMAKDLILLT-----DGPCTLTPEQ
hsa:10587                      WLKESP--GKTL-VVGASYVALECAGFLTGIGLDTTMMRSIPLRGFDQQMSSMVEIHA
gla:GL50803_9827              DSAMAT--GKEVWVGGGDVACEEATYTKIATKVVYMLRRDKFRA-----SAAMKXVMN
tva:TVAG_348010              DGALYS--NQDVAIVGGDVAEEALYLAKICRTVKLFHRRDELRA-----SNPKKR-LA
ehi:EH1_155440              DGAVPIFRNKVLMVGGDAAEALHLTKYGSKVIIILRRDRA-----SKTNGQEVLN
sce:YDR353W                  DGAVPIFRNKPLAVIIGGDSACEAQFLTKYGSKVFMVLRKDLRA-----STIMQKRAE
ath:AT2G17420                DGAAPIFRNKPLVVIIGGDSAMEEANFLTKYGSKVYIIHRRDRA-----SKINQORALS

ngr:NAEGRDRAFT_65055          QHLVHMVNGIIEIKPIE--KLIHQGRVQKIVFKDSSEIELDVIYLPKTTQGNLAKQ
hsa:10587                      SHGTRFLRGCAPSRVRLPDQSL--QVTHEDSTTGIEDTGTFTVLHAGRVFDRSLNL
gla:GL50803_9827              EKLIEIIVDSAIDETKGD--GKCVTSVSIKINKLKGKTRTLNAGALYNAVGHDPQTSFLK-
tva:TVAG_348010              ASKVQIIVDTVIDEVLGE--DFVTGVQKIVKTNELTNHTVSALFVAIGHFPETSIF--
ehi:EH1_155440              HPKIEIWINSELVELEGD--GDLNGAKIHNLSGSEYKVPVAVGLFYAIGHSPNSKFL--
sce:YDR353W                  NEKIEIILYNTVALEAKGD--GKLLNALRIKNTKKNNEETDLPVSGLFYAIHTPATKIV--
ath:AT2G17420                NPKIEIWINSAVVEAYDENGRLVGLKVKVWVTDVSDLVKVSGLFFAIGHPEPATKFL--

ngr:NAEGRDRAFT_65055          LGCELTITNE--IIVD-SLQKTTVEGVYAGDAT-----
hsa:10587                      EKAGVDTSPDQKILVD-SREATSVPHIYAGDVVEGRPELTPAIAMGRLLVQRLFSGS
gla:GL50803_9827              KGLEQDEAGYILLKDHPTQRTSVDFVFAAGDCC-----
tva:TVAG_348010              EGQLDRDKGGY-FITD-GTPRTKVPGVFVAGDCA-----
ehi:EH1_155440              GGQVKTADGGYILTEG-P--KTSVDGVFAAGDVC-----
sce:YDR353W                  AGQVDTDEAGYIKTVP-GSSLTSVPGFFAAGDVQ-----
ath:AT2G17420                DGQLELDEDGVVTKP-GTTKTSVVGFFAAGDVQ-----
                                :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
                                :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

ngr:NAEGRDRAFT_65055          -----TYMRSVALAVASGQKAGIMVD-----
hsa:10587                      SDLMDYDNVPTTFTPLEYGCVGLSEEEAVARHGQEHVEVYHAHYKPLEFTVAGRDASQC
gla:GL50803_9827              DHLVYRQAVVAAGSGSKAALDAE-----
tva:TVAG_348010              DKVYRQAITSAGTGCAALLAE-----
ehi:EH1_155440              DRVYRQAIVAAGSGMAALDACE-----
sce:YDR353W                  DSKYRQAITSAGSGMAALDAE-----
ath:AT2G17420                DKKYRQAITAAGTGMAALDAE-----
                                :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
                                :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

ngr:NAEGRDRAFT_65055          -----REINIEFNK-----
hsa:10587                      YVKMVCLEPPQLVLGLHFLGNAGEVTQGFALGIKCGASYAQVMRTVGIHPTCSEEVVK
gla:GL50803_9827              RNLAMQE-----
tva:TVAG_348010              HYLADLDAEENQE-----
ehi:EH1_155440              KWLQTH-----
sce:YDR353W                  KYLTSLE-----
ath:AT2G17420                HYLQEIGSQEGKSD-----
                                :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
                                :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

ngr:NAEGRDRAFT_65055          -----
hsa:10587                      LRISKRSGLDPTVTGGG-----
gla:GL50803_9827              -----
tva:TVAG_348010              -----
ehi:EH1_155440              -----
sce:YDR353W                  -----
ath:AT2G17420                -----

```

Figura 14. Alineamiento múltiple de las proteínas TrxR en MUSCLE. Cada color representa una propiedad del aminoácido; rojo: aminoácidos con cadena lateral hidrófoba, azul: ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), rosa: básicos, y verde: aminoácidos que en su cadena lateral tienen un grupo hidroxilo, sulfhidrilo o amino. El símbolo “*” indica que en esa posición presentan un aminoácido conservado, “:” indica la conservación entre grupos de propiedades muy similares y por último “.” se refiere a la conservación entre grupos de propiedades débilmente similares.

Se encontró que la proteína TrxR de *G. lamblia* tiene un 60.9% de probabilidad de encontrarse en el citoplasma y 26.1% en el núcleo.

Posteriormente, se realizó la predicción de las estructuras terciarias de la TrxR para *G. lamblia* y las demás especies. (Fig. 15).

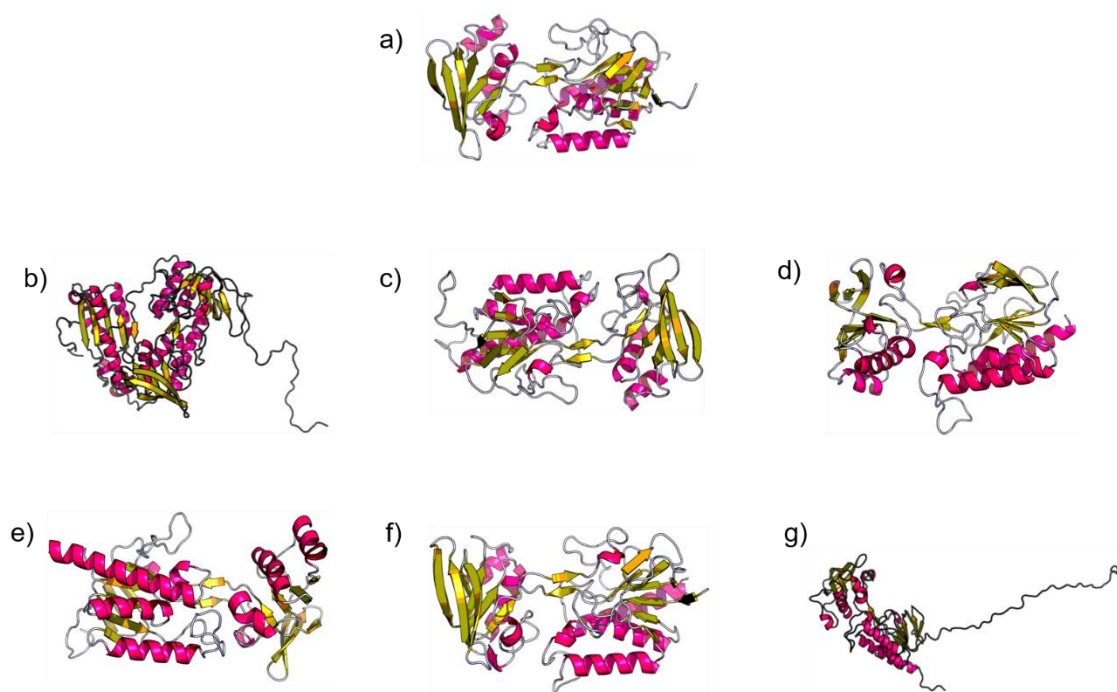


Figura 15. Predicción de estructuras terciarias de la TrxR de a) *G. lamblia*, b) *H. sapiens*, c) *A. thaliana*, d) *E. histolytica*, e) *N. gruberi*, f) *S. cerevisiae*, g) *T. vaginalis*.

Asimismo, dichas secuencias en formato PDB se emplearon para hacer la superposición de sus estructuras. (Fig. 16).

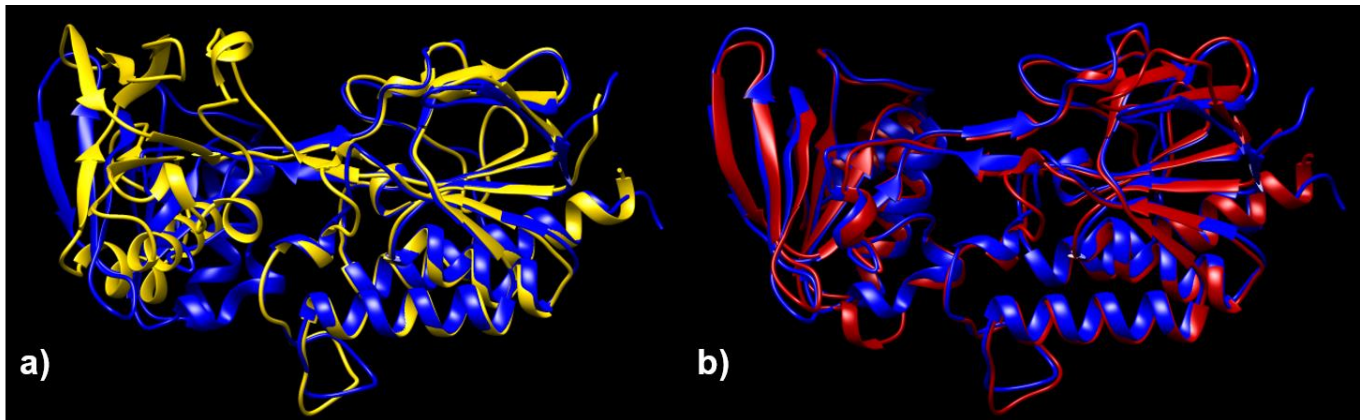


Figura 16. Superposición en USCF Chimera de las TrxR: a) *G. lamblia* (azul) y *E. histolytica* (amarillo), b) *G. lamblia* (azul) y *S. cerevisiae* (rojo). En la imagen se observa la similitud de las proteínas TrxR.

Por último, se generó el interactoma de la TrxR de *G. lamblia* con el programa String 2.0 (Fig. 17), resultando que la TrxR puede interactuar con las enzimas alcohol deshidrogenasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Asimismo, con otras proteínas como la ADN topoisomerasa II, la Acetil-CoA carboxilasa / piruvato carboxilasa y con las proteínas piruvato-flavodoxina oxidoreductasa, peroxirredoxina 1 y flavohemoproteína.

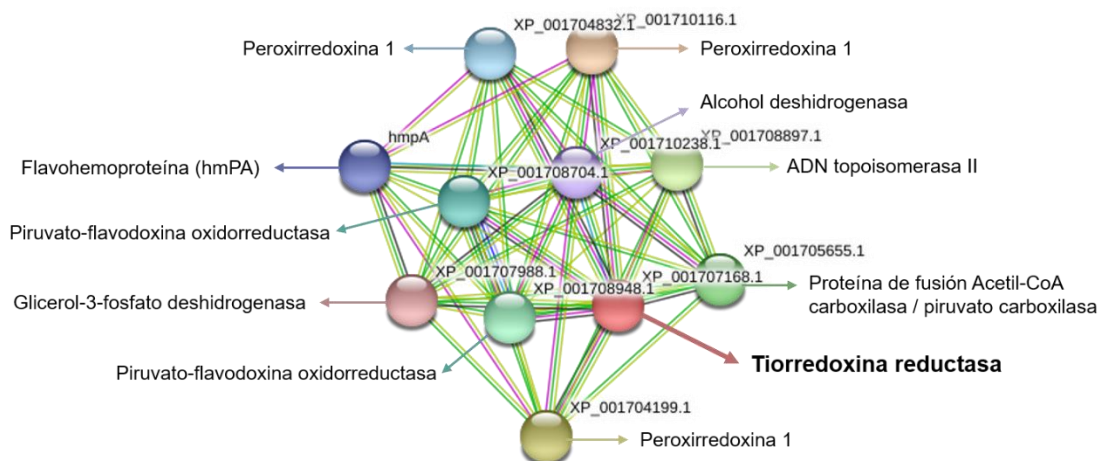


Figura 17. Interactoma de la TrxR de *G. lamblia* en String 2.0

Trx

Se identificó la proteína hipotética Trx de *G. lamblia* (GL50803_9355) conformada por 134 aminoácidos, y compuesta por tres dominios: alquilhidroperóxido reductasa (AhpC), redoxin y tiorredoxina (Fig. 18 I.). A partir de esta proteína se realizó el BLAST para encontrar las secuencias proteicas homólogas en *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Entamoeba histolytica*, *Naegleria gruberi*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Trichomonas vaginalis* (Fig. 18 II.).

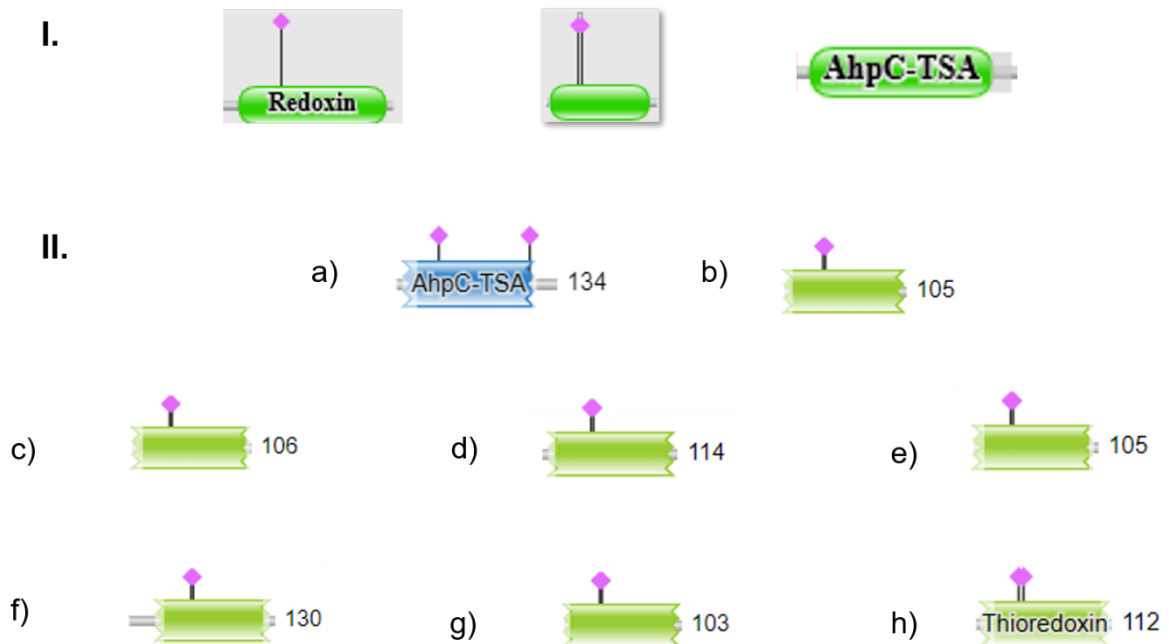


Figura 18. I. Dominios de la Trx. Está compuesto por tres dominios: redoxin, tiorredoxina y alquilhidroperóxido reductasa (AhpC), **II.** Dominios de las proteínas Trx: a) *G. lamblia*, b) *H. sapiens*, c) *D. melanogaster*, d) *A. thaliana*, e) *E. histolytica*, f) *N. gruberi*, g) *S. cerevisiae*, h) *T. vaginalis*

Se realizó un alineamiento pareado considerando la secuencia de *G. lamblia* como proteína a comparar con respecto a las secuencias de los demás organismos. En la tabla 3 se muestra el porcentaje de similitud e identidad de las secuencias y los alineamientos pareados con base al de *Giardia* en la figura siguiente (Fig. 19).

Organismo	% Identidad	% Similitud
<i>H. sapiens</i>	18.0	28.8
<i>D. melanogaster</i>	15.9	26.8
<i>A. thaliana</i>	18.8	29.1
<i>E. histolytica</i>	18.9	31.8
<i>N. gruberi</i>	16.6	29.1
<i>S. cerevisiae</i>	19.6	34.8
<i>T. vaginalis</i>	20.5	32.1

Tabla 3. Porcentaje de identidad y similitud de la Trx con respecto a *G. lamblia*. La identidad es el porcentaje de coincidencias de los mismos aa entre las dos secuencias alineadas, mientras que la similitud es el porcentaje de aa que tienen características fisicoquímicas similares.

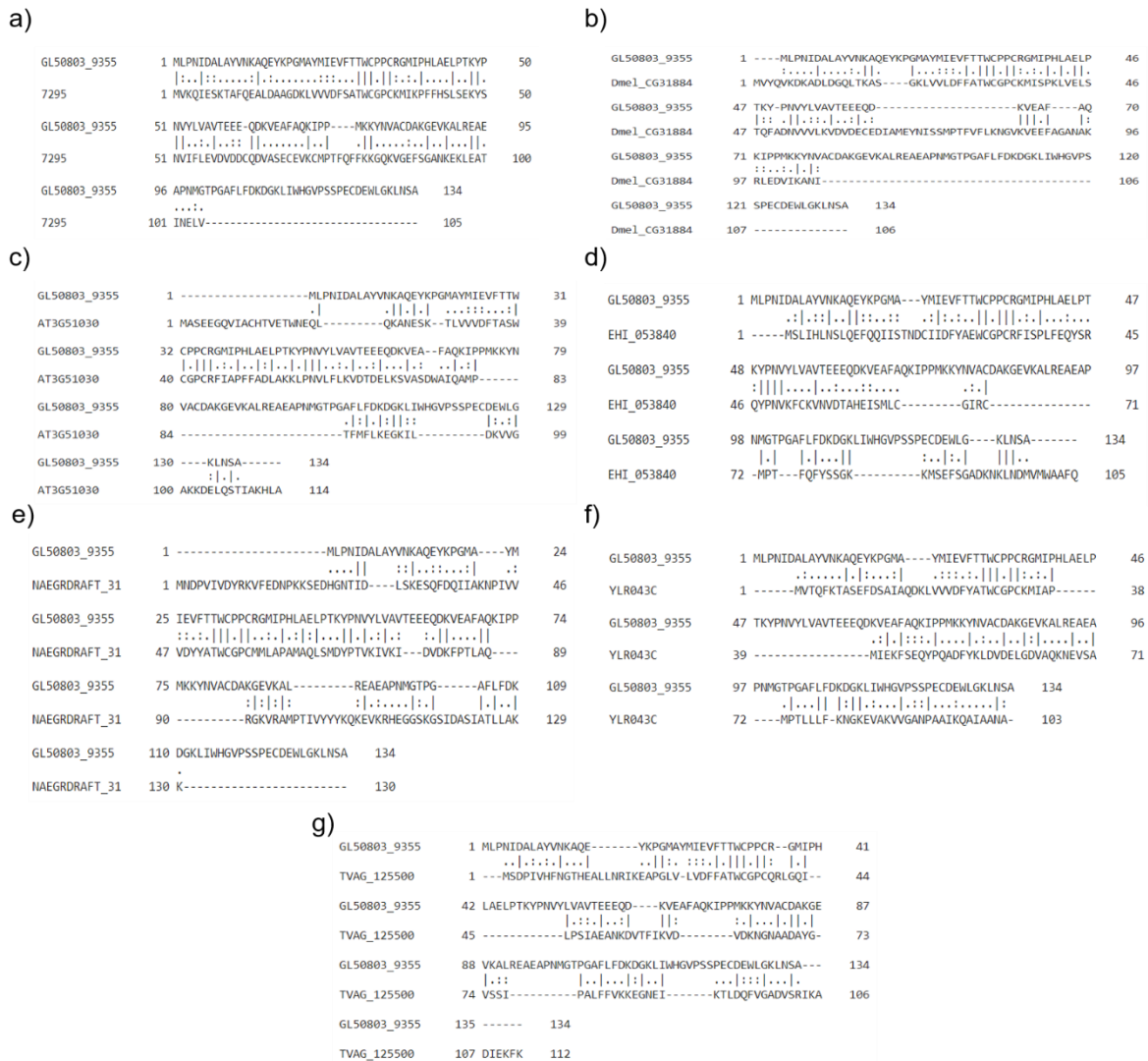


Figura 19. Alineamiento pareado de las proteínas Trx: a) *G. lamblia* contra *H. sapiens*, b) *G. lamblia* contra *D. melanogaster*, c) *G. lamblia* contra *A. thaliana*, d) *G. lamblia* contra *E. histolytica*, e) *G. lamblia* contra *S. cerevisiae*, f) *G. lamblia* contra *T. vaginalis*.

cerevisiae, f) *G. lamblia* contra *N. gruberi*, g) *G. lamblia* contra *T. vaginalis*. El símbolo “I” significa que en esa posición tiene un aminoácido conservado, “:” indica la conservación entre grupos de propiedades muy similares y finalmente “.” se refiere a la conservación entre grupos de propiedades débilmente similares.

Posteriormente se hizo un alineamiento múltiple (Fig. 20).



Figura 20. Alineamiento múltiple de las proteínas Trx en MUSCLE. Cada color representa una propiedad del aminoácido; rojo: aminoácidos con cadena lateral hidrófoba, azul: ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), rosa: básicos, y verde: aminoácidos que en su cadena lateral tienen un grupo hidroxilo, sulfhidrilo o amino. El símbolo “*” indica que en esa posición presentan un aminoácido conservado, “:” indica la conservación entre grupos de propiedades muy similares y por último “.” se refiere a la conservación entre grupos de propiedades débilmente similares.

Se obtuvo la predicción de la localización celular *in silico*, de la Trx de *G. lamblia*, la cual tiene una probabilidad del 60.9% de encontrarse en el citoplasma y del 21.7% en el núcleo. Luego se realizó la predicción de las estructuras terciarias de la Trx para *G. lamblia*, y sus ortólogos (Fig. 21).

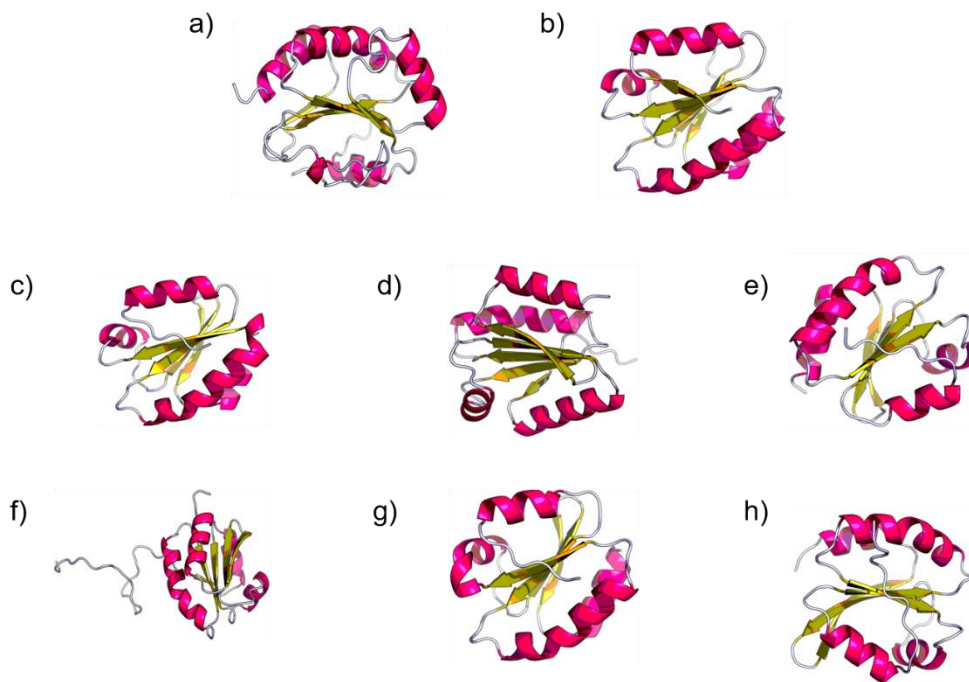


Figura 21. Predicción de estructuras terciarias de la Trx de: a) *G. lamblia*, b) *H. sapiens*, c) *D. melanogaster*, d) *A. thaliana*, e) *E. histolytica*, f) *N. gruberi*, g) *S. cerevisiae* h) *T. vaginalis*.

A las secuencias de *G. lamblia* contra *S. cerevisiae* y *G. lamblia* contra *T. vaginalis* se les hizo el empalme de sus estructuras proteicas (Fig. 22).

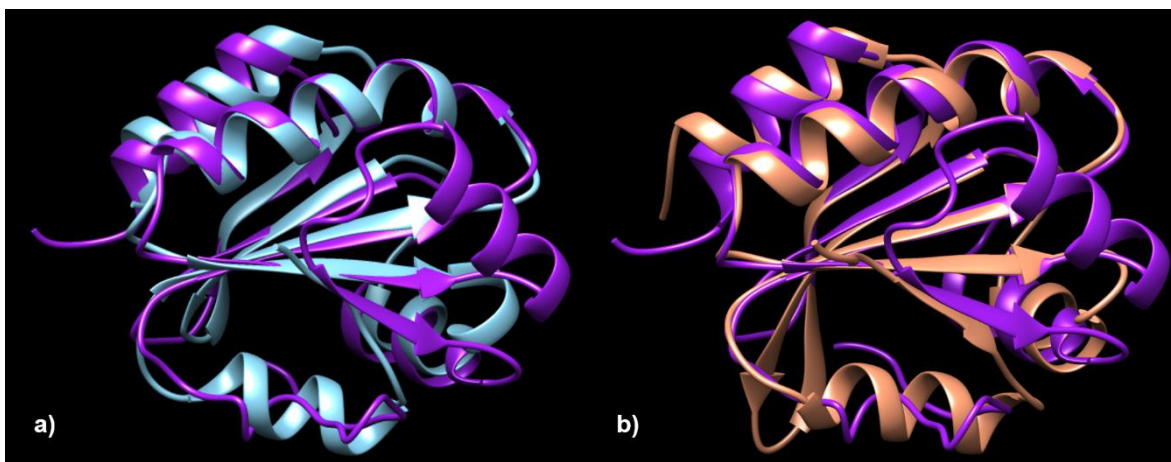


Figura 22. Superposición en USCF Chimera de las Trx: a) *G. lamblia* (morado) y *S. cerevisiae* (azul), b) *G. lamblia* (morado) y *T. vaginalis* (beige).

Finalmente se generó el interactoma de la Trx de *G. lamblia* (Fig. 23), resultando que la Trx tiene la capacidad de interactuar con las proteínas Peroxirredoxina 1, NADH oxidasa, Glucosamina-6-fosfato isomerasa (1 y 2).

De igual manera se obtuvo el interactoma de las tres proteínas de la vía PRX: TrxR, Prx y Trx (Fig. 24)

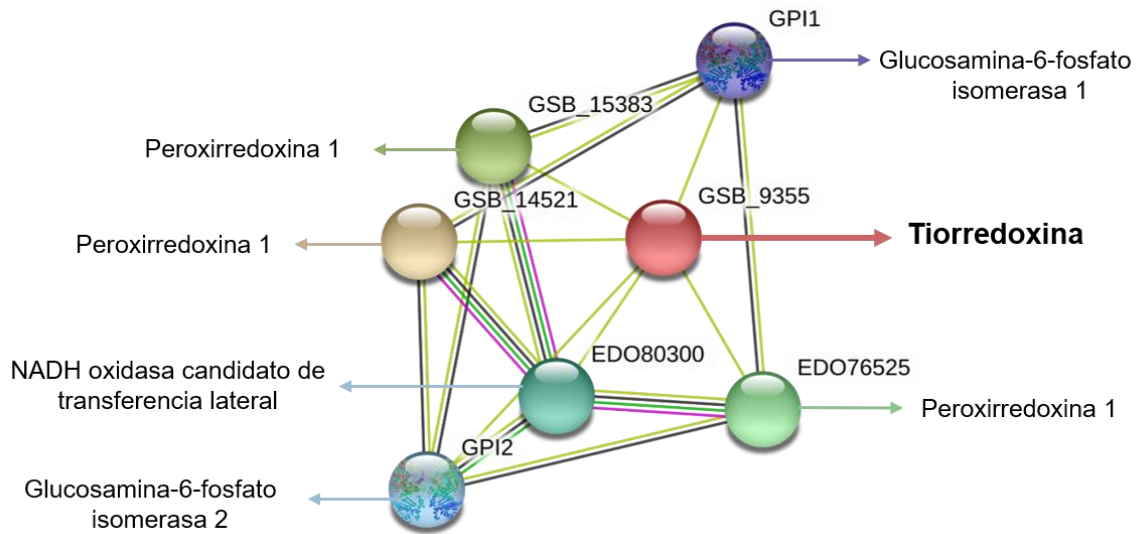


Figura 23. Interactoma de la Trx de *G. lamblia* en String 2.0

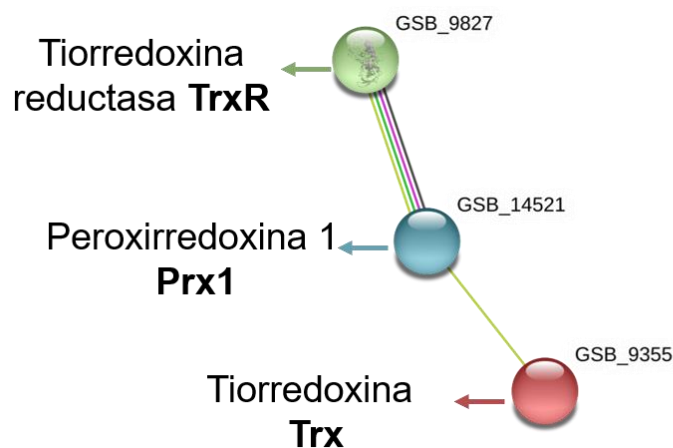


Figura 24. Interactoma de las proteínas de la vía Prx de *G. lamblia*.

Objetivo 2. Evaluación de la expresión de las proteínas Prx, TrxR y Trx en extractos de trofozoítos de *Giardia lamblia*.

Western Blot

Para conocer el perfil proteico de los extractos de *G. lamblia* y células HeLa, se realizaron geles de poliacrilamida al 13.5% utilizando 20 µg/µl por condición (Fig. 25).

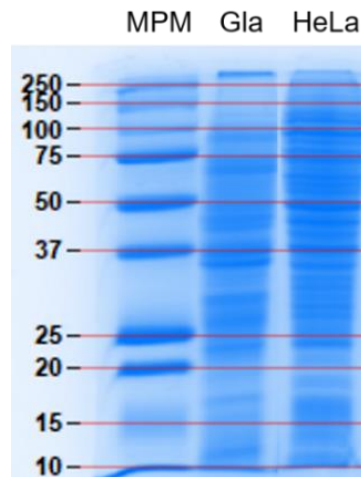


Figura 25. Perfil proteico de extractos de *G. lamblia* y células HeLa. En la imagen se aprecian las bandas de proteínas integras de *G. lamblia* y células HeLa teñidas con azul de coomassie

Mediante Western blot se detectaron las tres proteínas de la vía PRX: Prx1, TrxR y Trx en extractos de trofozoítos de *G. lamblia*, utilizando un cocktail de anticuerpos específicos (Abcam ab184868) contra las tres proteínas de la vía antes mencionadas, identificando cada una de ellas en su peso molecular esperado (Fig. 26). Como control positivo, se utilizaron extractos de células HeLa y como control de carga se detectó actina, cuyo peso molecular esperado es de 42 kDa.

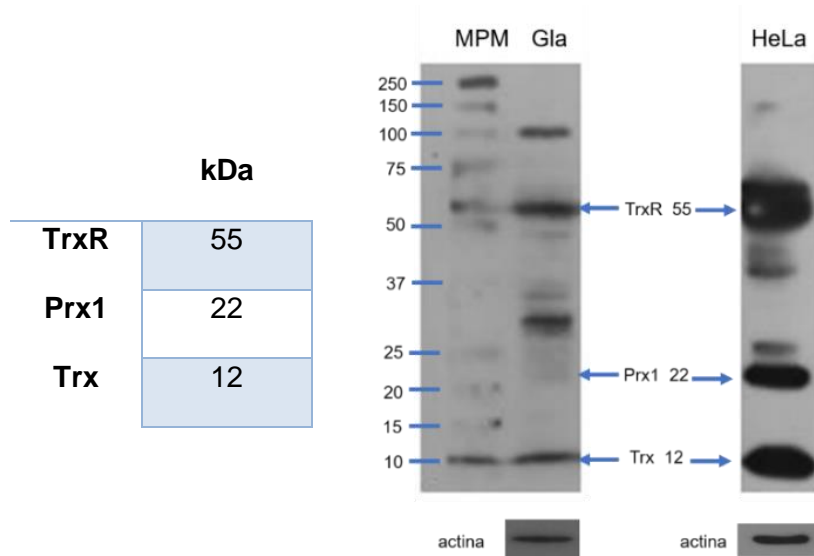


Figura 26. Western blot de las proteínas de la vía PRX en trofozoítos de *G. lamblia* y células HeLa. La tabla muestra el peso en KDa de las proteínas identificadas en ambas especies, señaladas en la imagen.

Finalmente se hizo un análisis densitométrico, se obtuvo la media de la intensidad de pixeles de tres réplicas independientes de las proteínas de la vía Prx de ambas especies, dichos datos se representaron en una gráfica de barras (Fig. 27). Se aplicó la prueba t de Student en cada una de las proteínas (TrxR, Prx y Trx), indicando una diferencia significativa de las tres proteínas entre HeLa y *G. lamblia*.

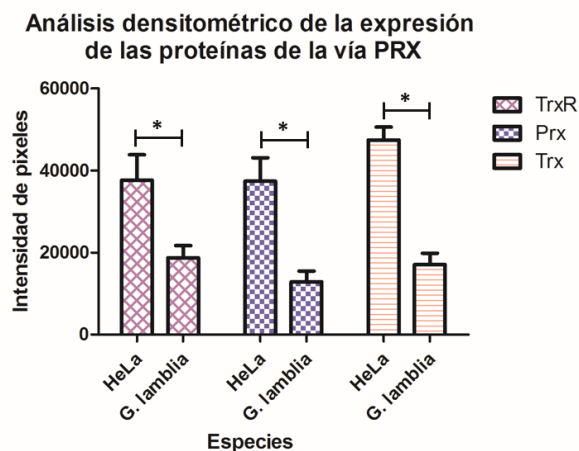


Figura 27. Análisis densitométrico de la expresión de las proteínas de la vía PRX en trofozoítos de *G. lamblia* y células HeLa. La significancia estadística se obtuvo aplicando la prueba t de Student en cada una de las proteínas: TrxR (0.009 < 0.05), Prx (0.002 < 0.05) Trx (0.001 < 0.05).

DISCUSIÓN

El peroxisoma es un organelo muy importante para las células eucariotas ya que contiene enzimas que son esenciales para vías metabólicas involucradas en el metabolismo de aminoácidos y de lípidos, así como la regulación del peróxido de hidrógeno (66).

Históricamente se ha descrito que *Giardia lamblia* no posee peroxisomas (4,67); sin embargo, investigaciones recientes sugieren la presencia del organelo debido al hallazgo de proteínas relacionadas con los peroxisomas (3).

Mastronicola y colaboradores (2011) identificaron diferentes isoformas de la peroxirredoxina en *G. lamblia*. Por otra parte, nuestro grupo de trabajo recientemente identificó dos proteínas peroxisomales: la acil CoA sintetasa de cadena larga-4 (ASCL-4) involucrada en el metabolismo del peroxisoma y la Peroxina-4 (PEX-4), la cual es fundamental para la biogénesis del organelo. Ambas proteínas fueron identificadas en vesículas denominadas “peroxisoma-like”, reportadas en el mismo estudio (61). Si bien, dichos resultados representan el primer acercamiento a la presencia de peroxisomas en el parásito, estudios acerca de la actividad del organelo en *Giardia*, aún no se han descrito.

Con base en la premisa anterior, una de las perspectivas de nuestro grupo de trabajo era investigar el rol de alguna vía de señalización relacionada con los peroxisomas en *Giardia*. El sistema PRX, constituido por las proteínas Peroxirredoxina 1 (Prx1), Tiorredoxina reductasa (TrxR) y Tiorredoxina (Trx), participa en la regulación de las reacciones redox en la mayoría de las células eucariontes; son esenciales para la homeostasis celular, debido a que regulan la transducción de señales que controlan procesos como proliferación, diferenciación o la muerte celular (57,58). Por lo anterior, nuestro trabajo se centró en la búsqueda de las proteínas del sistema PRX en *G. lamblia*.

La Prx es una proteína altamente conservada tanto en células eucariotas como procariotas, participa en la reducción de los hidroperóxidos con tiorredoxina u otros intermediarios que contienen tiol como donadores de electrones (68). Identificamos a la Prx1 de *Giardia lamblia* (Gla) y la comparamos con sus ortólogos en: *Homo sapiens* (Hsa), *Drosophila melanogaster* (Dme), *Arabidopsis thaliana* (Ath), *Entamoeba histolytica* (Ehi), *Naegleria gruberi* (Ngr) y *Saccharomyces cerevisiae* (Sce). La Prx1 de *G. lamblia* (GL50803_14521) está constituida por 201 aa y tres dominios: C-terminal de la peroxirredoxina 1-Cys, redoxin y el dominio compuesto por dos moléculas: la alquilhidroperóxido reductasa y el antioxidante específico de tiol (Fig. 6). Al realizar el interactoma se encontró que la Prx1 tiene la capacidad de interactuar con proteínas de la superfamilia redox tiorredoxina, como las proteínas disulfuro isomerasa (PDI1, PDI2, PDI3, PDI4 y PDI5) las cuales son oxidorreductasas que participan en la isomerización y en la formación de enlaces disulfuro de proteínas secretoras, de igual manera con la tiorredoxina reductasa que se encarga de la reducción de diversas proteínas citoplasmáticas (69). También posiblemente interaccione con la piruvato-flavodoxina oxidorreductasa que cataliza la oxidación de piruvato a acetil-CoA, CO₂ y provee electrones para flavodoxina (70). Asimismo, con la ADN topoisomerasa II y la proteína de unión a ATP asociadas con la diferenciación celular (Fig. 12). La Prx de *G. lamblia* tiene un porcentaje de identidad y similitud mayor con el humano en comparación con las Prxs de las demás especies de este estudio (Tabla 1); el empalme estructural de ambas proteínas lo confirma (Fig. 10).

Por otro lado, la TrxR actúa como catalizador en la reducción dependiente de NADPH de la tiorredoxina (65). Identificamos a la TrxR en *G. lamblia*, *E. histolytica*, *S. cerevisiae* y *T. vaginalis*. En los alineamientos pareados se identificó que tanto *E.*

histolytica, como *S. cerevisiae* tienen una similitud e identidad muy cercana con respecto a la TrxR de *G. lamblia*. Por ello, se realizó la superposición de las proteínas de estas dos especies con la TrxR de *G. lamblia*; en la imagen se puede apreciar la semejanza de las estructuras terciarias (Fig. 15). La TrxR de *G. lamblia* (GL50803_9827) está conformada por 314 aa y tres dominios de piridina nucleótido-disulfuro oxidorreductasa.

Tras realizar el interactoma se encontró que la TrxR puede interactuar con proteínas relacionadas con el metabolismo energético de la fermentación de carbohidratos y metabolismo de lípidos; como la enzima alcohol deshidrogenasa, la cual se sabe que en *G. lamblia* tiene la función de regenerar NAD^+ a partir de NADH en condiciones anaeróbicas, para mantener un flujo continuo en la glucólisis (71). Un estudio demostró que la proteína alcohol deshidrogenasa se une tanto a la TrxR como a la Prx1 de *G. lamblia* (72). También posiblemente interaccione con la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa que participa en la glucólisis, reacciones de óxido-reducción y metabolismo de los ácidos grasos (73). Se sabe que la TrxR de *G. lamblia* ejerce actividad de disulfuro reductasa, pero aún no está claro si funciona como una verdadera TrxR (74). Sin embargo, se especula que la reducción de Prx1 por TrxR se puede lograr solamente a través de interacciones transitorias (72). De igual manera, se demostró que ejerce una fuerte actividad oxidasa NADPH, fuente de estrés oxidativo en las células del hospedero (74).

Las Trx son pequeñas proteínas redox que generalmente se encuentran en la mayoría de los organismos de vida libre. En los eucariontes no fotosintéticos hay pocas proteínas Trx con una o dos isoformas en el citosol y una en mitocondrias, las cuales son reducidas por una TrxR dependiente de NADPH (75). Dichas proteínas forman parte de los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo debido a que participan en la

reducción de los sulfóxidos de metionina a través de la metionina sulfóxido reductasa (MSR). Esta enzima utiliza a la Trx como donadora de electrones. También una de sus funciones es la desintoxicación de ROS a través de la Prx (76). Con respecto al análisis de la Trx en *G. lamblia*, identificamos una proteína hipotética (GL50803_9355) compuesta de tres dominios: alquilhidroperóxido reductasa (AhpC), redoxin y tiorredoxina; al compararla con la de otras especies, notamos que tiene una mayor similitud con los ortólogos de *S. cerevisiae* y *T. vaginalis* (Fig. 22).

Se ha reportado la presencia de los dominios Trx en las proteínas glutarredoxinas en *S. cerevisiae*, están involucrados en la desintoxicación de ROS y la viabilidad celular cuando actúan con los dominios Grx (Glutarredoxina). Sin embargo, recientemente, se identificó que los dominios Trx de las proteínas Grx3 y Grx4 actúan de manera independiente a los dominios Grx, teniendo un papel determinante en la polarización del citoesqueleto de actina, lo cual determina la resistencia celular en condiciones de estrés oxidativo (77). Lo anterior resulta muy interesante ya que se desconoce la presencia de estas proteínas en *Giardia*, lo cual podría sugerir una actividad similar en el parásito.

Por otra parte, las Trx de *T. vaginalis*, parásito amitocondriado y anaeróbico, de igual forma que *Giardia*, es capaz de sobrevivir ante la presencia de oxígeno y resiste al estrés oxidativo principalmente mediante el uso de la maquinaria compuesta por la tiorredoxina reductasa, que funciona junto con la tiorredoxina, y la peroxidasa de tiorredoxina para desintoxicarse de oxidantes potencialmente dañinos. El sistema tiorredoxina es uno de los principales mecanismos de defensa antioxidante de *T. vaginalis*, y funciona gracias a la adaptación de su maquinaria transcripcional (78,79).

En el interactoma de la Trx de *G. lamblia* (Fig. 23) se puede observar que la Trx de este protozooario posiblemente puede interactuar con su Prx1, por lo tanto, podría

especularse que esta proteína trabaja en conjunto con la Prx1 cuando *G. lamblia* se encuentra en el duodeno y es atacada por el sistema inmunológico del hospedero. La glucosamina 6-fosfato isomerasa al igual que la Prx1 probablemente interactúa con la Trx, esta enzima cataliza la isomerización reversible y la aminación de D-fructosa-6-fosfato a glucosamina-6-fosfato en presencia de amonio, esta última enzima se induce cuando los trofozoítos se enquistan en presencia de bilis, por lo que se considera una de las principales responsables en la síntesis de la pared del quiste (80,81).

El sistema Trx en *T. vaginalis* es un medio esencial para la desintoxicación de ROS, sin embargo, no se sabe si el sistema está involucrado en la supervivencia del parásito en el hospedero. En cambio, se sabe que *S. cerevisiae* requiere TrxR para sobrevivir, de igual forma que en otros eucariontes como *Drosophila melanogaster*. En *Giardia*, aún queda por vislumbrar el papel que pueden tener las proteínas de esta vía en la supervivencia del parásito, pero resulta de gran interés estudiarlo, debido a que representaría un blanco terapéutico para controlar la infección.

Englobando lo anterior, el interactoma muestra la posible interacción de estas tres proteínas en *G. lamblia* (Fig. 24), se podría especular que la TrxR, Prx1 y Trx participan en conjunto con otras proteínas esenciales como la cisteína (principal tiol antioxidante), glutatión y NADPH en las reacciones de óxido-reducción, en la defensa contra el estrés oxidativo, la desintoxicación del H₂O₂, ROS y NOS producidos por el hospedero. La Trx está relacionada indirectamente con el proceso de enquistamiento, probablemente al haber un ataque del sistema inmunológico del hospedero contra *G. lamblia* entre otros factores hostiles como el exceso de bilis, esta proteína induce la formación del quiste. Se sabe que el quiste es la forma infectiva y la estructura de resistencia del parásito, por lo que no queda descartada esta suposición.

Los resultados de bioinformática sustentan lo encontrado en los ensayos de Western blot (Fig. 26); el anticuerpo anti-PRX Pathway Cocktail (ab184868) mostró reconocimiento de las proteínas TrxR, Prx1 y Trx en los extractos de *G. lamblia*, las cuales corresponden al peso esperado de las proteínas, al igual que con lo expresado en las células HeLa (grupo control). Para validar nuestros datos, realizamos un análisis densitométrico, a los que se les aplicó la prueba estadística t de Student para muestras independientes, en la cual se obtuvieron diferencias significativas para las tres proteínas identificadas en *G. lamblia* respecto con las células control (Fig. 27).

Como observamos las proteínas de la vía Prx son esenciales para mantener el equilibrio redox y regular la transducción de señales, que controla la proliferación celular, la diferenciación, la muerte y otros procesos fisiológicos importantes en las células eucariontes (58,74,77). Además, la exploración de fármacos antitumorales dirigidos contra la TrxR representa una nueva oportunidad para el desarrollo de terapias para el tratamiento contra el cáncer (82). Si bien, el papel de las tres proteínas está muy bien caracterizado para las células humanas, en organismos como *T. vaginalis*, *E. histolytica* y por supuesto, *Giardia lamblia*, aún es un campo de estudio del que quedan muchas dudas.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Giardia lamblia tiene codificado en su genoma a las proteínas TrxR, Prx1 y Trx, que en este trabajo fueron identificadas mediante un análisis bioinformático y en extractos totales de trofozoítos mediante Western blot.

Las tres proteínas tienen alta similitud a nivel de secuencia y de estructuras terciarias con los ortólogos presentes en *Homo sapiens*, *Trichomonas vaginalis*,

Drosophila melanogaster, *Arabidopsis thaliana*, *Entamoeba histolytica*, *Naegleria gruberi* y *Saccharomyces cerevisiae*. Además, se demostró su expresión relativa en extractos totales de trofozoítos.

Resulta de nuestro interés caracterizar estas proteínas en el parásito y demostrar la función que tienen en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, bajo condiciones nativas del duodeno y de estrés. Asimismo, nos interesa demostrar el rol que tienen estas proteínas durante el proceso de enquistamiento, ya que, al ser la fase de resistencia, el parásito probablemente las expresa en mayor cantidad como mecanismo de defensa al ambiente.

REFERENCIAS

1. Cedillo R, Leal Y. Seroepidemiology of giardiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80(1):6–10.
2. CDC. Giardiasis [Internet]. 2017 [cited 2018 Oct 18]. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html>
3. Wolfe MS. Giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 1992;5(1):93–100.
4. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(3):447–75.
5. Buret AG, Amat CB, Manko A. *Giardia duodenalis*: New Research Developments in Pathophysiology, Pathogenesis, and Virulence Factors. *Curr Trop Med Reports.* 2015;2(3):110–8.
6. Müller J, Sterk M, Hemphill A. Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(2):280–7.
7. Monali RN, Lall N, Basak S. Proteomic analysis of the ventral disc of *Giardia lamblia*.

- J Clin Diagnostics Res. 2012;6(9):1492–4.
8. Silva R, Martins A, Menezes JF. Performance of microscopy and ELISA for diagnosing *Giardia duodenalis* infection in different pediatric groups. *Parasitol Int.* 2016;65(6):635–40.
 9. Quezada R, Ortega G. Giardiasis. *Ciencia.* 2017;68(1):34–7.
 10. Martinez E, Cerpa L, Liu M. Prevalence of Giardiasis in preschool children of kindergartens in Tiabaya - Arequipa, Peru, 2006. *Neotrop Helminthol.* 2011;5(2):257–64.
 11. Minvielle MC, Pezzani BC. Epidemiological survey of *Giardia* spp. and *Blastocystis hominis* in an Argentinian rural community. *Korean J Parasitol.* 2004;42(3):121–7.
 12. Secretaría de Salud. Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. [Internet]. Vol. 36. 2018 [cited 2018 Aug 30]. Available from: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/390772/sem36.pdf>
 13. Becerril M. Parasitología médica [Internet]. 4a. ed. McGraw Hill; 2014 [cited 2018 Dec 21]. 442 p. Available from: https://books.google.com.mx/books?id=GUCEBgAAQBAJ&dq=ciclo+biologico+giardia&source=gbs_navlinks_s
 14. CDC. CDC - Giardia. CDC. 2013.
 15. Ankarklev J, Jerlström J, Ringqvist E. Behind the smile: Cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(6):413–22.
 16. Romero R. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Médica Panamericana; 2007. 1723 p.
 17. Bernander R, Palm J, Svärd SG. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell Microbiol.* 2001;3(1):55–62.

18. Faubert G. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(1):35–54.
19. Eckmann L. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol.* 2003;25(5):259–70.
20. Eckmann L, Laurent F, Langford TD. Nitric Oxide Production by Human Intestinal Epithelial Cells and Competition for Arginine as Potential Determinants of Host Defense Against the Lumen-Dwelling Pathogen *Giardia lamblia*. *J Immunol.* 2000;164(3):1478–89.
21. Sarti P, Fiori PL, Forte E. *Trichomonas vaginalis* degrades nitric oxide and expresses a flavorubredoxin-like protein: A new pathogenic mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(5):618–23.
22. Gillon J, D. TA, Ferguson A. Features of small intestinal pathology (epithelial cell kinetics, intraepithelial lymphocytes, disaccharidases) in a primary *Giardia muris* infection. *Gut.* 1982;23(06):498–506.
23. Ebert EC. *Giardia* induces proliferation and interferon gamma production by intestinal lymphocytes. *Gut.* 1999;44(3):342–6.
24. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Immunología de Kuby*. 6a ed. Mc Graw Hill. México; 2007. 34–48 p.
25. Stäger S, Gottstein B, Sager H. Influence of Antibodies in Mother's Milk on Antigenic Variation of *Giardia lamblia* in the Murine Mother-Offspring Model of Infection. *Infect Immun.* 1998;66(4):1287–92.
26. Nash TE, Herrington DA, Losonsky GA. Experimental human infections with *giardia lamblia*. *J Infect Dis.* 1987;156(6):974–84.
27. Olmez S, Aslan M, Yavuz A. Diffuse nodular lymphoid hyperplasia of the small

- bowel associated with common variable immunodeficiency and giardiasis: A rare case report. *Wien Klin Wochenschr.* 2014;126(9–10):294–7.
28. Langford TD, Housley MP, Boes M. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect Immun.* 2002;70(1):11–8.
 29. Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: Redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun.* 1999;67(8):3703–13.
 30. Luján HD, Olivos A, De la Mora JI. Characterization of proteolytic activities of *Giardia lamblia* with the ability to cleave His-tagged N-terminal sequences. *Mol Biochem Parasitol.* 2019;228:16–26.
 31. Ringqvist E, Avesson L, Söderbom F. Transcriptional changes in *Giardia* during host-parasite interactions. *Int J Parasitol.* 2011;41(3–4):277–85.
 32. Nash TE. Surface Antigenic Variation in *Giardia Lamblia*. In: *Antigenic Variation.* 2003. p. 357–74.
 33. Prucca CG, Lujan HD. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cell Microbiol.* 2009;11(12):1706–15.
 34. Cabrera A, Solano E, Fonseca R. Expression and secretion of the *Giardia duodenalis* variant surface protein 9B10A by transfected trophozoites causes damage to epithelial cell monolayers mediated by protease activity. *Exp Parasitol.* 2017;179:49–64.
 35. Chin AC, Teoh DA, Scott KG. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun.* 2002;70(7):3673–80.
 36. Liu J, Ma'ayeh S, Peirasmaki D. Secreted *Giardia intestinalis* cysteine proteases disrupt intestinal epithelial cell junctional complexes and degrade chemokines.

- Virulence. 2018;9(1):879–94.
37. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012;24(5):981–90.
 38. Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer FG. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet México*. 2002;33(3):265–83.
 39. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*. 1984;219(1):1–14.
 40. Rahal A, Kumar A, Singh V. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1–19.
 41. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(7):579–91.
 42. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 1994;74(1):139–62.
 43. Chaudière J, Ferrari R. Intracellular antioxidants: From chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol*. 1999;37(9–10):949–62.
 44. Nakada K, Nozaki T. Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica*. *Front Immunol*. 2016;7(175):1–13.
 45. Kim KA, Kim JY, Lee YA. *Entamoeba histolytica* induces cell death of HT29 colonic epithelial cells via NOX1-derived ROS. *Korean J Parasitol*. 2013;51(1):61–8.
 46. Schlosser S, Leitsch D, Duchêne M. *Entamoeba histolytica*: identification of thioredoxin-targeted proteins and analysis of serine acetyltransferase-1 as a prototype example. *Biochem J*. 2013;451(2):277–88.
 47. Alvarez MN, Peluffo G, Piacenza L. Intraphagosomal peroxynitrite as a

- macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: Consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J Biol Chem*. 2011;286(8):6627–40.
48. Wilkinson SR, Meyer DJ, Kelly JM. Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. *Biochem J*. 2000;352(3):755–61.
 49. Ma'ayeh SY, Knörr L, Svärd SG. Transcriptional profiling of *Giardia intestinalis* in response to oxidative stress. *Int J Parasitol*. 2015;45(14):925–38.
 50. Lloyd D, Harris JC, Maroulis S. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: Oxygen and its reaction products collapse membrane potential and cause cytotoxicity. *Microbiology*. 2000;146(12):3109–18.
 51. Brown DM, Upcroft JA, Edwards MR. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Int J Parasitol*. 1998;28(1):149–64.
 52. Brown DM, Upcroft JA, Upcroft P. Free radical detoxification in *Giardia duodenalis*. *Mol Biochem Parasitol*. 1995;72(1–2):47–56.
 53. Brown DM, Upcroft JA, Upcroft P. A thioredoxin reductase-class of disulphide reductase in the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;83(2):211–20.
 54. Mastronicola D, Falabella M, Testa F. Functional Characterization of Peroxiredoxins from the Human Protozoan Parasite *Giardia intestinalis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(1):1–10.
 55. Sun CC, Dong WR, Shao T. Peroxiredoxin 1 (Prx1) is a dual-function enzyme by possessing Cys-independent catalase-like activity. *Biochem J*. 2017;474(8):1373–94.

56. Gabaldón T, Ginger ML, Michels PA. Peroxisomes in parasitic protists. *Mol Biochem Parasitol.* 2016;209(1–2):35–45.
57. Kang SW, Baines IC, Rhee SG. Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J Biol Chem.* 1998;273(11):6303–11.
58. Sue GR, Ho ZC, Kim K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(12):1543–52.
59. Trewin AJ, Levinger I, Parker L. Acute exercise alters skeletal muscle mitochondrial respiration and H₂O₂ emission in response to hyperinsulinemic-euglycemic clamp in middle-aged obese men. *PLoS One.* 2017;12(11):1–18.
60. Bhatt NM, Aon MA, Tocchetti CG. Restoring redox balance enhances contractility in heart trabeculae from type 2 diabetic rats exposed to high glucose. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2015;308(4):291–302.
61. Acosta K, Chávez B, Martínez A. *Giardia lamblia*: Identification of peroxisomal-like proteins. *Exp Parasitol.* 2018;191:36–43.
62. Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983;77(4):487–8.
63. Rosales D, Díaz J, Doña A. Medio de Keister modificado para el cultivo de *Giardia lamblia* in vitro. *Rev Médica la Extensión Port.* 2009;3(1):35–7.
64. Atlassian. Rapid automatic detection and alignment of repeats in protein sequences [Internet]. Vol. 41, *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 2000 [cited 2018 Dec 18]. p. 224–37. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/seqdb/confluence/display/JDSAT/Bioinformatics+Tools+FAQ#BioinformaticsToolsFAQ-Whatdoespercentageidentityreferto?>

65. Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J.* 2000;346(1):1–8.
66. Wang R, Kniazeva M, Han M. Peroxisome Protein Transportation Affects Metabolism of Branched-Chain Fatty Acids That Critically Impact Growth and Development of *C. elegans*. *PLoS One.* 2013;8(9):1–10.
67. Gabaldón T. Evolutionary considerations on the origin of peroxisomes from the endoplasmic reticulum, and their relationships with mitochondria. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(13):2379–82.
68. Choi HJ, Kang SW, Yang CH. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat Struct Biol.* 1998;5(5):400–6.
69. Neves RP, Waheed SO, Fernandes PA. Structural and mechanistic aspects of S-S bonds in the thioredoxin-like family of proteins. *Biol Chem.* 2018;400(5):575–87.
70. Nakayama T, Yonekura SI, Yonei S. *Escherichia coli* pyruvate:flavodoxin oxidoreductase, YdbK - regulation of expression and biological roles in protection against oxidative stress. *Genes Genet Syst.* 2013;88(3):175–88.
71. Dan M, Wang CC. Role of alcohol dehydrogenase E (ADHE) in the energy metabolism of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.* 2000;109(1):25–36.
72. Leitsch D, Rout S, Lundström B. *Giardia lamblia*: missing evidence for a canonical thioredoxin system. *Parasitol Open.* 2017;3(13):1–6.
73. Lalle M, Camerini S, Cecchetti S. The FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Giardia duodenalis*: An unconventional enzyme that interacts with the g14-3-3 and it is a target of the antitumoral compound NBDHEX. *Front Microbiol.* 2015;6(544):1–19.
74. Leitsch D, Müller J, Müller N. Evaluation of *Giardia lamblia* thioredoxin reductase as drug activating enzyme and as drug target. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.*

- 2016;6(3):148–53.
75. Vlamis A, Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin isoforms. *Methods Enzymol.* 2002;347:286–96.
 76. Michelet L, Zaffagnini M, Massot V. Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathionylation: New crosstalks to explore. *Photosynth Res.* 2006;89(2–3):225–45.
 77. Pujol N, De La Torre MA. Glutaredoxins Grx4 and Grx3 of *Saccharomyces cerevisiae* play a role in actin dynamics through their trx domains, which contributes to oxidative stress resistance. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(23):7826–35.
 78. Vanacova S, Liston DR, Tachezy J. Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Int J Parasitol.* 2003;33(3):235–55.
 79. Coombs GH, Westrop GD, Suchan P. The Amitochondriate Eukaryote *Trichomonas vaginalis* Contains a Divergent Thioredoxin-linked Peroxiredoxin Antioxidant System. *J Biol Chem.* 2004;279(7):5249–56.
 80. Eligio L, Crisóstomo MP, Flores A. *Giardia intestinalis*: Expression of ubiquitin, glucosamine-6-phosphate and cyst wall protein genes during the encystment process. *Exp Parasitol.* 2011;127(2):382–6.
 81. Steimle PA, Lindmark DG, Jarroll EL. Purification and characterization of encystment-induced glucosamine 6-phosphate isomerase in *Giardia*. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;84(1):149–53.
 82. Zhang J, Li X, Han X. Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38(9):794–808.

ANEXOS

Medio de cultivo de *G. lamblia* 500 ml

Biotriptasa	10 g
Bilis bovina	0.25 g
Extracto de levadura	5 g
Dextrosa	5 g
Cloruro de sodio	1 g
L-cisteína	1 g
L-ascórbico	0.05 g
Fosfato de potasio monobásico	0.3 g
Fosfato de potasio dibásico	0.5 g
Citrato férrico de amonio	0.0115 g
Ajustar a pH 6.9	

Cocktail de inhibidores de proteasas 50 µl

NEM	6.25 µL
TLCK	3.75 µL
Leupeptina	6.25 µL
PMSF	3.75 µL
Aprotinina	8.75 µL
IAA	3.75 µL
RIPA	17.5

Keister D,1983; Rosales B, 2009; Kit
Western blotting BIO-RAD

Gel separador de poliacrilamida al 13.5 % (para 2 geles)

Buffer separador pH 8	3.38 ml
Sol. Bis-acrilamida	4.46 ml
Agua bidestilada	5.67 ml
Persulfato de amonio al 10%	100 µl
TEMED	5 µl

Gel concentrador (para 2 geles)

Buffer separador pH 6.8	1.5 ml
Sol. Bis-acrilamida	1 ml
Agua bidestilada	3.5 ml
Persulfato de amonio al 10%	80 µl

TEMED

6 μ l

Buffer separador pH 6.8

100 ml

Tris-HCl (1.5 M)	18.22 g
SDS	0.4 g

Buffer concentrador pH 6.8

100 ml

Tris-HCl (0.5 M)	6.075 g
SDS	0.4 g

Stripping buffer

Glicina	1.5 g
SDS	0.1 g
Tween 20	1 ml

-Disolver en 80 ml de agua bidestilada

-Ajustar a pH 2.2

-Llevar a 100 ml

Keister D, 1983; Rosales B, 2009; Kit
Western blotting BIO-RAD