



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA BIFUNCIONAL G6PD::6PGL DEL
PARÁSITO *GIARDIA LAMBLIA***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. MORALES LUNA LAURA ELOISA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. SAÚL GÓMEZ MANZO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DR. DANIEL DAGOBERTO ORTEGA CUELLAR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ABRIL, 2021



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA
OFICIO CPCB/229/2021
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **18 de enero de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **MORALES LUNA LAURA ELOISA** con número de cuenta **308267217** con la tesis titulada "**Caracterización Bioquímica de la enzima bifuncional G6PD:6PGL del parásito *Giardia lamblia***", realizada bajo la dirección del **DR. SAÚL GÓMEZ MANZO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. SERGIO ENRÍQUEZ FLORES
Vocal: DRA. PAULA LICONA LIMÓN
Vocal: DRA. GLORIA HERNÁNDEZ ALCÁNTARA
Vocal: DRA. VERÓNICA PÉREZ DE LA CRUZ
Secretario: DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 22 de marzo de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y al **Posgrado en Ciencias Biológicas** por haberme permitido ingresar a la maestría, por la formación académica que me permitió extender mis conocimientos y por permitirme desarrollar un proyecto tan apasionante.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada con **CVU: 964649** como parte del programa de becas nacionales de posgrado (maestría).

Al **Instituto Nacional de Pediatría**, Laboratorio de Bioquímica Genética por brindarme el espacio y el material necesario para realizar el presente proyecto de tesis. A los recursos fiscales de investigación que dieron soporte al proyecto con número 038/2019, “Análisis de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa–6-fosfogluconolactonasa de dos protozoarios de importancia médica: *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*”.

Agradezco a mi comité tutorial: Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros y Dr. Daniel Ortega Cuellar por su asesoría académica y por las observaciones realizadas en los experimentos así como en el escrito de tesis.

A mi tutor Dr. Saúl Gómez Manzo por otorgarme la oportunidad de estar bajo su dirección, por el conocimiento que me brindo así como por la paciencia y dedicación en la realización del presente proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco infinitamente a Dios porque sin él en mi vida no hubiese tenido la fuerza para haber llegado hasta aquí.

A mis padres Carlos y Escolástica por el amor incondicional, el apoyo y las palabras de aliento en los momentos más complicados. Ustedes son el motor que me permite seguir día a día.

A mis abuelitos; Lucy, Lola y Vicente, esos seres tan amorosos que toda la vida se han preocupado por mí, gracias por creer en mí y por todo su apoyo. Lucy gracias por seguir con nosotros y por permitirme tenerte en mi vida. Mi Chente gracias por acompañarme en esta etapa, por no permitir que me rindiera, espero que desde donde se encuentren tú y mi lolita, me observen y estén orgullosos de cada uno de mis pasos.

A mis hermanos Carolina, Carlos, Roberto y Jean, gracias por ser mis compañeros de vida, por todas las vivencias, por el ánimo y ¿Por qué no?, también por el bullying, sin ustedes no sería lo mismo, los amo.

A mi familia:

Mis tíos: Carmen, Martín, Salvador, Victor y Alejandra, gracias por seguir presentes en cada etapa de mi vida, por todo el apoyo y cariño que recibo de ustedes. Tía Tere gracias porque a la distancia me apoyas y en cada camino emprendido confías en que lo lograre.

A mis primos, segundos hermanos; Jesús, Mireya, Guillermo, Lupita y Edgar gracias por su cariño y sus porras, son los mejores.

A mi tutor el Dr. Saúl Gómez por aceptarme en su grupo de trabajo, sé que el camino no ha sido fácil, gracias por toda la paciencia y todas las enseñanzas tanto académicas como personales, por su cariño y sus consejos.

Al Dr. Jaime Marcial por su asesoría, por cada observación y por toda esa experiencia científica que me brindo en nuestro paso por el laboratorio. Gracias por permitirme que lo conociera y por haber permitido que fuera su estudiante.

A la Mtra. Abigail González, muchas gracias por creer en mí y por no dejar que me hundiera cuando menos pensé lograrlo, sin usted no me hubiera sido posible continuar y terminar la maestría. Gracias por todas sus enseñanzas y por toda su paciencia.

A mis Amigos:

Mi segunda familia, los Glucosos Giardiosos: Edson Ramírez, Víctor Martínez, Erick Alcaraz, Yadira Cortez, Leyda Cortez, Paulina Ortiz, Fabiola Fernández, amigos, muchas gracias por permitirme conocerlos y por hacer que cada día en el laboratorio fuera único e inolvidable, por todas las vivencias, por la retroalimentación en cada seminario y por todo el cariño. Fue un inmenso placer compartir esta parte del camino a su lado, y espero que nuestra amistad continúe a pesar del tiempo y las adversidades. Extraño sus locuras.

A mis amigos de toda la vida; Azucena Bazáldua, Daniela González, Dianita Santiago, gracias por permanecer a pesar de los años y la distancia, por escucharme y apoyarme en los momentos más difíciles.

A todos aquellos que de alguna u otra forma han contribuido a hacerme la persona que soy hoy.

Índice

Abreviaturas

Índice de figuras

Índice de tablas

Resumen	1
Abstract	2
1.- Introducción	3
1.1. Giardiasis	3
1.2. Taxonomía y ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>	7
1.2.1. Trofozoíto:	8
1.2.2. Quiste:	9
1.3. Metabolismo de <i>Giardia lamblia</i>	10
1.4. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) de <i>Giardia lamblia</i>	13
1.5. Fosfogluconolactonasa (6PGL)	15
1.6. Fusión de genes <i>g6pd</i> y <i>6pgl</i> en el parásito <i>Giardia lamblia</i>	16
2. Antecedentes	18
2.1. Estudios en proteínas bifuncionales	18
3. Justificación	20
4. Hipótesis	20
5. Pregunta de Investigación	21
6. Objetivo General	21
6.1. Objetivos Específicos	21
7. Metodología	22
7.1. Esquema general de trabajo	22
7.2. Diseño de oligonucleótidos y amplificación de los dominios individuales <i>g6pd</i> , <i>6pgl</i> del gen fusionado <i>g6pd::6pgl</i> y del gen <i>6pgdh</i> de <i>Giardia lamblia</i>	23
7.3. Clonación al vector de sobreexpresión pET3a-HisTEVP de los dominios individuales <i>g6pd</i> y <i>6pgl</i> del gen fusionado <i>g6pd::6pgl</i> y del gen <i>6pgdh</i> de <i>Giardia lamblia</i>	25
7.4. Sobreexpresión y purificación de la proteína fusionada G6PD::6PGL de <i>G. lamblia</i>	27
7.5. Purificación del dominio individual G6PD de la proteína fusionada G6PD::6PGL de <i>Giardia lamblia</i>	28

7.6. Purificación del dominio individual 6PGL de la proteína fusionada G6PD::6PGL de <i>Giardia lamblia</i>	29
7.7. Purificación de la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) de <i>Giardia lamblia</i>	29
7.7.1. Determinación de la actividad catalítica del dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL.....	30
7.7.2. Caracterización cinética del dominio G6PD de la enzima fusionada G6PD::6PGL y del dominio individual de la región G6PD	30
7.7.3. Caracterización cinética de la región individual y del dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL de <i>Giardia lamblia</i>	31
7.8. Determinación del producto final de la reacción de la enzima fusionada G6PD::6PGL de <i>Giardia lamblia</i>	32
7.8.1. Determinación del producto final de la reacción por método enzimático	32
7.8.2. Determinación del producto final de la reacción enzimática por espectrofotometría de masas MALDI-TOF.....	33
8. Resultados	34
8.1. Amplificación de los dominios génicos <i>g6pd</i> , <i>6pgl</i> del gen fusionado <i>g6pd::6pgl</i>	34
8.2. Amplificación del gen 6-fosfogluconato deshidrogenasa (<i>6pgdh</i>) de <i>Giardia lamblia</i> ..	34
8.3. Purificación de la proteína fusionada G6PD::6PGL y los dominios individuales G6PD, 6PGL.....	40
8.3.1. Purificación de la enzima fusionada G6PD::6PGL de <i>Giardia lamblia</i>	40
8.3.2. Purificación de la región individual G6PD de la enzima fusionada G6PD::6PGL de <i>Giardia lamblia</i>	41
8.3.3. Purificación de la región individual 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL de <i>Giardia lamblia</i>	45
8.4. Análisis de producto de la reacción enzimática de la enzima fusionada G6PD::6PGL de <i>Giardia lamblia</i>	50
8.4.1. Determinación del producto final de la reacción por método enzimático	50
8.4.2. Determinación del producto final de la reacción enzimática por espectrofotometría de masas MALDI-TOF.....	53
9. Discusión.....	57
10. Conclusiones/ Resumen de resultados y algunas observaciones.....	60
Perspectivas del estudio.....	61
11. Referencias Bibliográficas.....	62

Abreviaturas

DNA- Ácido desoxirribonucleico

RNA- Ácido ribonucleico

ATP- Adenosín trifosfato

pH- Coeficiente que indica el grado de acidez o basicidad de una solución acuosa.

CO₂- Dióxido de carbono

H₂O- Agua

O₂- Oxígeno molecular

G6P- Glucosa-6-fosfato

NADP⁺-Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

G6PD-Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

6PGL-6-Fosfogluconolactonasa

6PGDH-6-Fosfogluconato deshidrogenasa

G6PD::6PGL- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa/6-Fosfogluconolactonasa

ADH- Alcohol deshidrogenasa

ALDH- Aldehído deshidrogenasa

BLAST- Basic local alignment search tool

D.O. - Densidad óptica

IPTG- Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

Top10F'- *E. coli* cepa Top10

K₂HPO₄- Fosfato de potasio dibásico

NaCl- Cloruro de sodio

MgCl- Cloruro de magnesio

L.B.- Luria bertani

μM - micromolar

MHz- Megahercio

MALDI-TOF- Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time-of-flight

RMN- Resonancia magnética nuclear

SDS-PAGE- Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

AKTA-FPLC- Sistema AKTA de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad

K_m - Constante de afinidad

V_{max} - Velocidad máxima

K_{cat} - Número de recambio

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de distribución de genotipos de <i>Giardia lamblia</i>	5
Figura 2. Estadios de vida de <i>Giardia lamblia</i>	8
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>	10
Figura 4. Esquema general de la fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato.....	12
Figura 5. Modelo tridimensional de la enzima fusionada G6PD::6PGL del protista <i>Giardia lamblia</i>	14
Figura 6.- Fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato presente en organismo con fusión de las enzimas G6PD::6PGL.	17
Figura 7. Amplificación del gen fusionado <i>g6pd::6pgl</i> y el gen <i>6pgdh</i> de <i>G. lamblia</i> , y de los dominios individuales <i>g6pd</i> , <i>6pgl</i> provenientes del gen fusionado <i>g6pd::6pgl</i>	35
Figura 8. Digestión de las construcciones pJET1.2/blunt- <i>g6pd::6pgl</i> , pJET1.2/blunt- <i>g6pd</i> , pJET1.2/blunt- <i>6pgl</i> y pJET1.2/blunt- <i>6pgdh</i> con las enzimas <i>NdeI</i> y <i>BamHI</i>	37
Figura 9. Electroferogramas Sanger obtenidos de la secuenciación de las construcciones pET3a-HisTEVP- <i>g6pd</i> , pET3a-HisTEVP- <i>6pgl</i> y pJET/1.2/blunt- <i>6pgdh</i>	39
Figura 10. Gel SDS-PAGE al 12% de la enzima fusionada G6PD::6PGL purificada.....	40
Figura 11. Purificación del dominio individual G6PD de la proteína fusionada G6PD::6PGL de <i>Giardia lamblia</i> . Gel SDS-PAGE al 12% del dominio individual G6PD purificada.	42
Figura 12. Curvas de saturación de la región individual G6PD para los sustratos.	44
Figura 13. Purificación del dominio individual 6PGL de la proteína fusionada G6PD::6PGL de <i>Giardia lamblia</i>	46
Figura 14. Purificación de la enzima 6PGDH de <i>G. lamblia</i>	47
Figura 15. Curva de saturación del dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL.	49
Figura 16. Determinación del producto final de la reacción por método enzimático.	51
Figura 17. Evaluación del producto final de la reacción enzimática catalizada por la enzima G6PD recombinante de la bacteria gran negativa <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> y acoplada con la enzima fusionada G6PD::6PGL.....	52
Figura 18. Modelo de acoplamiento de sustratos y productos.	53
Figura 19. Determinación del producto final de la reacción enzimática por espectrofotometría de masas MALDI-TOF.....	55
Figura 20. Posible mecanismo enzimático de la enzima fusionada G6PD::6PGL de <i>Giardia lamblia</i>	59

Índice de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes <i>g6pd</i> , <i>6pgl</i> , <i>6pgdh</i> de <i>Giardia lamblia</i>	24
Tabla 2. Cepas y plásmidos empleados en el desarrollo experimental de este trabajo....	26
Tabla 3. Tabla de Purificación de la enzima fusionada G6PD::6PGL de <i>Giardia lamblia</i>	41
Tabla 4. Tabla de purificación del dominio individual G6PD de la enzima fusionada G6PD::6PGL de <i>Giardia lamblia</i>	42
Tabla 5. Comparación de los parámetros cinéticos de la enzima fusionada G6PD::6PGL y el dominio individual de G6PD.....	45
Tabla 6. Comparación de los parámetros cinéticos de la enzima fusionada G6PD::6PGL y de los dominios individuales G6PD y 6PGL.....	49
Tabla 7. Espectros esperados y obtenidos mediante MALDI-TOF para la reacción de la enzima G6PD::6PGL de <i>Giardia lamblia</i>	54

Resumen

La giardiasis es una enfermedad intestinal infecciosa, causada por el protista *Giardia lamblia*, que presenta altos índices de incidencia, reportándose hasta 2017 un total de 300 millones de personas infectadas a nivel mundial. *G. lamblia* es un eucarionte de divergencia temprana, y que ha sido considerado como parte de la base evolutiva de los eucariontes y tiene un metabolismo con características tanto de organismos eucariontes como de procariontes. Dentro de las rutas metabólicas que presenta, se destaca la vía de las pentosas fosfato (PPP), porque a través de ésta se generan moléculas como la Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) que es capaz de proporcionarle defensa contra el sistema inmune de sus hospederos y de esta manera garantizar su sobrevivencia, además mediante esta vía se generan intermediarios para la síntesis de DNA y ácidos grasos. En la vía de las pentosas fosfato están implicadas diversas enzimas, la primera de las cuales es la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y tiene un papel muy importante a nivel celular ya que genera el NADPH. Una característica de la G6PD de *G. lamblia* es la de presentar fusión con la segunda enzima de esta vía, la 6-fosfogluconolactonasa (6PGL), sugiriendo que su fusión genera una enzima bifuncional que favorece la eficiencia de la vía de las pentosas fosfato. Debido a que actualmente no existen reportes donde se haya caracterizado la bifuncionalidad de esta enzima, en el presente trabajo se demostró la doble función de la proteína fusionada. Los hallazgos del presente trabajo demostraron que la enzima fusionada G6PD::6PGL tiene actividad en el dominio 6PGL. Además, se determinaron los parámetros cinéticos de la enzima fusionada G6PD::6PGL, los cuales fueron comparados con respecto a los dominios individuales de G6PD y de 6PGL. Se evidenció que la catálisis es más eficiente en la enzima fusionada G6PD::6PGL, que en la enzima aislada individualmente, sugiriendo que esta enzima es una enzima bifuncional. Además, se estableció, mediante ensayos enzimáticos y de espectrometría de masas MALDI-TOF, que el producto de la reacción de la enzima fusionada G6PD::6PGL presenta los compuestos; 6-fosfoglucono- δ -lactona y 6-fosfogluconato, productos de los dominios G6PD y 6PGL, respectivamente. Estos resultados sugieren que en la enzima fusionada G6PD::6PGL primero el dominio G6PD realiza la catálisis y libera el producto 6-fosfoglucono- δ -lactona al medio, y posteriormente el segundo dominio 6PGL capta su sustrato del medio y realiza la catálisis para dar como producto final al 6-fosfogluconato.

Abstract

Giardiasis is an infectious intestinal disease, caused by the protista *Giardia lamblia*, which has high incidence rates, with a total of 300 million infected people reported worldwide until 2017. *G. lamblia* is an early divergent eukaryote, which has been considered as part of the evolutionary basis of eukaryotes and has a metabolism with characteristics of both eukaryotic and prokaryotic organisms. Among the metabolic pathways it presents, the pentose phosphate pathway (PPP) stands out, because through it molecules such as reduced Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) are generated, which is capable of providing defense against the immune system of its hosts and thus guarantee their survival, furthermore through this pathway intermediates are generated for the synthesis of DNA and fatty acids. Various enzymes are involved in the pentose phosphate pathway, the first of which is glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and it has a very important role at the cellular level as it generates NADPH. A characteristic of *G. lamblia* G6PD is that it presents fusion with the second enzyme in this pathway, 6-phosphogluconolactonase (6PGL), suggesting that its fusion generates a bifunctional enzyme that favors the efficiency of the pentose phosphate pathway. Since there are currently no reports where the bifunctionality of this enzyme has been characterized, in the present work the dual function of the fused protein was demonstrated. The findings of the present work demonstrated that the fused enzyme G6PD::6PGL has activity in the 6PGL domain. In addition, the kinetic parameters of the fused enzyme G6PD::6PGL were determined, which were compared with respect to the individual domains of G6PD and 6PGL. It was evidenced that catalysis is more efficient in the fused enzyme G6PD::6PGL, than in the enzyme isolated individually, suggesting that this enzyme is a bifunctional enzyme. Furthermore, it was established, by means of enzymatic assays and MALDI-TOF mass spectrometry, that the reaction product of the fused enzyme G6PD::6PGL presents the compounds; 6-phosphoglucono- δ -lactone and 6-phosphogluconate, products of the G6PD and 6PGL domains, respectively. These results suggest that the fused enzyme G6PD::6PGL first the G6PD domain performs catalysis and releases the 6-phosphoglucono- δ -lactone product to the medium, and later the second domain 6PGL captures its substrate from the medium and performs catalysis to give as the final product to 6-phosphogluconate.

1.- Introducción

1.1. Giardiasis

La giardiasis es una enfermedad gastrointestinal causada por el parásito *Giardia lamblia*, se estima que alrededor del 5 al 10% de la población mundial, es decir aproximadamente 300 millones de personas son afectadas por este microorganismo siendo una de las parasitosis de mayor frecuencia a nivel mundial (Chacón, 2010; Cernikova *et al.*, 2018; Escobedo *et al.*, 2017; Vázquez *et al.*, 2009). Esta enfermedad es de distribución cosmopolita, aunque el mayor grado de incidencia se encuentra en países en vías de desarrollo debido a que su distribución se encuentra asociada con malos hábitos de higiene, la ausencia de medidas sanitarias básicas como: alcantarillado, disposición de aguas contaminadas así como el hacinamiento de la población (Cedillo *et al.*, 1996; Vázquez *et al.*, 2009).

La giardiasis presenta alto porcentaje de morbilidad en la población infantil, así como en la población inmunocomprometida y en habitantes de países en vías de desarrollo donde la enfermedad se ha asociado con la pobreza y bajos estándares sanitarios (Escobedo *et al.*, 2017; Cedillo *et al.*, 1996). Sin embargo, se han reportado casos en los países industrializados donde la giardiasis ha sido referida como una enfermedad en resurgimiento, debido a que cada vez es mayor el número de brotes de enfermedades diarreicas en guarderías y también debido a brotes asociados al agua contaminada (Thomson *et al.*, 2000). Se estima que en países en vías de desarrollo aproximadamente el 15% de los niños de entre 0-24 meses de edad ha contraído la enfermedad, por lo que se ha asociado con retraso en el desarrollo de los infantes; además se ha observado que algunos niños pueden presentar pobre función cognitiva y en las formas más severas de la infección, se puede desarrollar el síndrome de malabsorción y anemia impactando el desarrollo físico e intelectual de los niños que la padecen (Chacón, 2010; Escobedo *et al.*, 2017; Berkman *et al.*, 2002; McCormick *et al.*, 2014).

En México se han realizado diversos estudios epidemiológicos para conocer la incidencia de la giardiasis. Por ejemplo un estudio realizado a menores de 5 años entre los años 2002 y 2005, registró a la giardiasis como el segundo lugar de prevalencia nacional con 13.8% después de la amebiasis. Su incidencia es mayor en menores de dos años, prevalencias altas se han relacionado con el bajo desarrollo económico que se presenta en las comunidades del país. Hasta el 2010 se habían reportado alrededor de 37 distintos estudios sobre la prevalencia de giardiasis en 14 Estados de la República Mexicana, se encontró una incidencia variable del 2% hasta 39% en la población (Quhui *et al.*, 2010). Además, se ha establecido que la severidad de la infección se encuentra relacionada con el genotipo de *G. lamblia* al que este asociado la infección. Torres-Lindarte *et al.* (2011) analizaron los genotipos de *G. lamblia* presentes en el continente americano (Figura 1), y destaca que de los 11 genotipos de *Giardia* existentes, se encuentra la presencia de los genotipos A y B a lo largo del continente; donde encontraron que el genotipo A es el más frecuente y el genotipo B es de importancia clínica (infeccioso). Es de mencionarse que anteriormente se ha reportado que de los genotipos descritos los A y B son los que afectan directamente a los seres humanos aunque se han registrado casos de infección por genotipos de caninos y felinos. Es importante destacar que la mayoría de los trabajos de genotipificación de este estudio (31.5%) fueron realizados en México, país donde solo se encontraron los genotipos A. Sin embargo, se encontró que los genotipos A y B están ampliamente distribuidos entre personas de países de Norte, Centro y Sur América.

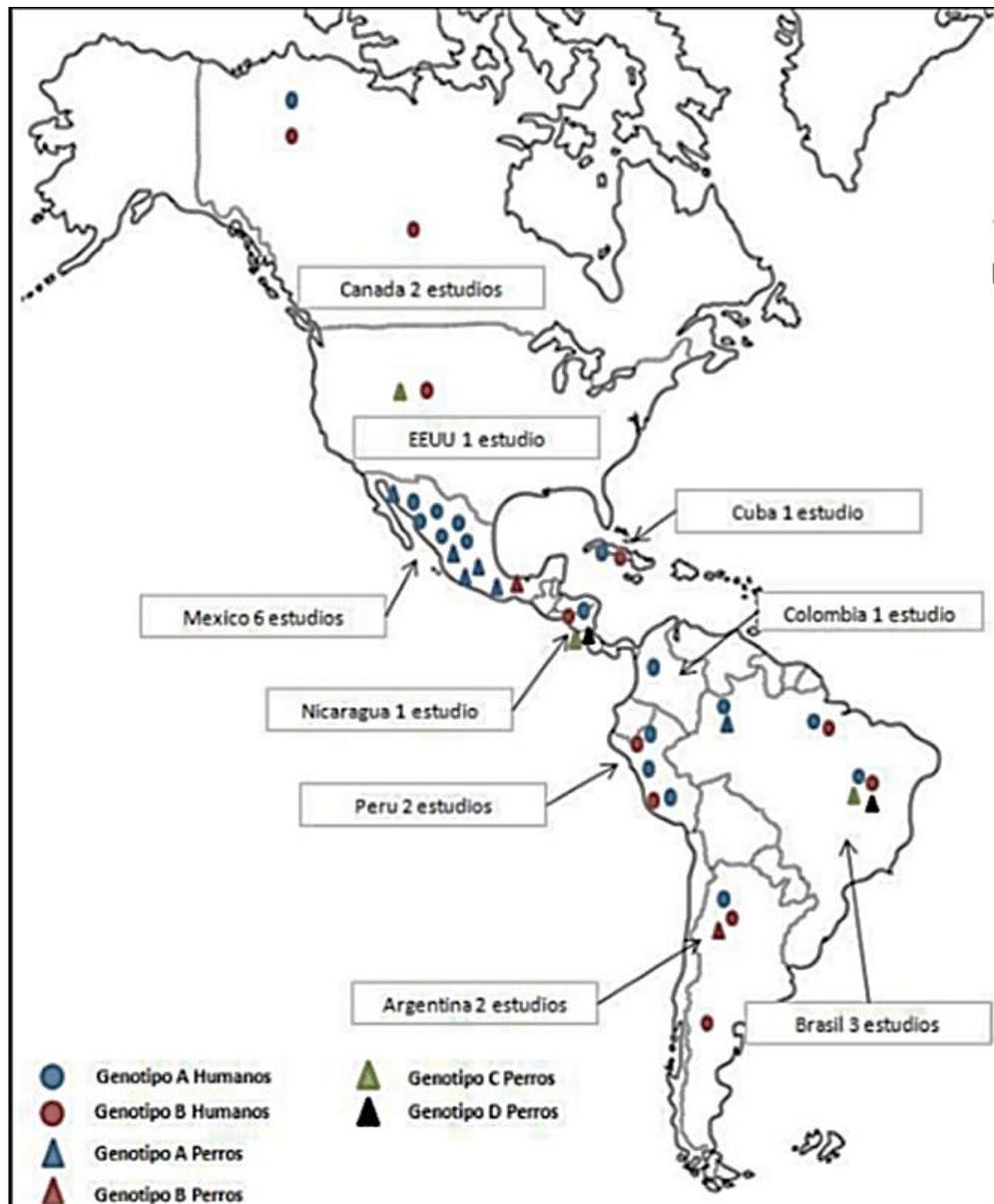


Figura 1. Mapa de distribución de genotipos de *Giardia lamblia*. Se muestran los genotipos encontrados en estudios realizados a lo largo del continente americano donde se muestran cepas presentes en humanos y en caninos, las cuales pueden ser zoonóticas (Torres *et al.*, 2011).

Por otro lado, la vía mediante la cual se adquiere a este organismo es a través de la ingesta de quistes de *G. lamblia*, los cuales pueden estar presentes en agua y alimentos contaminados, por ejemplo frutos y vegetales no desinfectados antes de su consumo (Rivera, 2002). El tiempo entre la ingesta de los quistes y el inicio de las manifestaciones clínicas es de aproximadamente 2 semanas, aunque en algunos casos es posible que los síntomas se presenten hasta los 45 días, la duración más extensa de la etapa asintomática puede prolongarse por varios meses, durante este tiempo los individuos infectados pueden ser propagadores de quistes (Chacón, 2010; Soriano, 2002).

La sintomatología y el grado de duración de la parasitosis es variada, ya que depende de factores individuales tales como el estado inmunitario del hospedero, el grado de virulencia de la cepa, así como la dosis de quistes ingeridos. Las personas infectadas pueden presentar síntomas como diarrea aguda, síndrome de colon irritable, síndrome de mala absorción; el cual, puede traer diversas enfermedades asociadas tales como anemia, además algunas personas pueden presentar cuadro asintomático y desconocer el grado de la enfermedad (Escobedo *et al.*, 2017; Chacón, 2010; Soriano, 2002).

Los tratamientos farmacológicos de la giardiasis más comunes consisten en la administración de nitroimidazoles como el metronidazol, el tinidazol, secnidazol y el ornidazol que en sus formas reducidas provocan la modificación en la estructura helicoidal del DNA del parásito con ruptura de sus hebras y pérdida de sus funciones (Liu *et al.*, 1996). Se le ha atribuido a los 5-nitroimidazoles actividad contra organismos microaerófilos y anaerobios lo que se ha sugerido debido a que estos organismos tienen la capacidad de transferir electrones al grupo nitro y, por tanto, activar el fármaco metronidazol a su estado activo. Se ha sugerido que el metronidazol induce la muerte celular programada en *G. lamblia* que también incluye fragmentación de ADN. Además, análisis proteómicos con parásitos tratados con nitroimidazol mostraron que el metronidazol forma aductos covalentes con un subconjunto de proteínas, entre ellas tiorredoxina reductasa y proteínas conocidas o que probablemente dependan sobre la reducción mediada por tiorredoxina, dando como resultado la eliminación deficiente de peróxido de hidrógeno por peroxidasa (Leitsch *et al.*, 2012) Debido a su baja especificidad estos medicamentos pueden tener efectos adversos muy serios o ser

contraindicados bajo ciertas situaciones clínicas como fibrosis quística, enfermedad celíaca e hipogammaglobulinemia, donde no pueden ser administrados. Además, es común el reporte de reinfecciones debido a malas condiciones higiénicas, niveles inadecuados de los tratamientos (tiempo de tratamiento y dosis) e incluso debido a un estado inmune comprometido del paciente o resistencia a los medicamentos por parte del parásito (Nash *et al.*, 2001). Es importante mencionar que se han aislado cepas de *G. lamblia* resistentes a los fármacos de prescripción en pacientes con giardiasis refractaria e incluso se ha logrado promover su resistencia a los medicamentos en cultivos *in vitro* (Carter *et al.*, 2017). Por estas razones es importante el estudio de nuevas dianas terapéuticas que cuenten con mayor especificidad, por lo que se pueden aprovechar las características propias de este microorganismo con la finalidad de generar conocimiento para desarrollar tratamientos altamente selectivos y eficientes, además de evitar la permanencia de la enfermedad en los pacientes, así como prevenir posibles reinfecciones. Por ello se ha sugerido el estudio de enzimas presentes en el metabolismo de este parásito, ya que se ha demostrado que muchas de ellas son notablemente diferentes a las de sus hospederos entre ellos los humanos (Morrison *et al.*, 2007).

1.2. Taxonomía y ciclo de vida de *Giardia lamblia*

El protista *G. lamblia* es un parásito, que se encuentra clasificado dentro de la clase zoomastigophora los cuales presentan flagelos como medio de locomoción, pertenece al orden diplomonadida que incluye organismos de vida libre y especies parasitarias, además se encuentra ubicado en la familia hexamitidae que caracteriza a los protozoos por presentar axostilo, dos núcleos y simetría bilateral (Morrison *et al.*, 2007; Vázquez *et al.*, 2009).

Estudios filogenéticos y moleculares ubican a *G. lamblia*, en la base de los eucariontes, su genoma es compacto en estructura y contenido, presenta pocos intrones lo cual lo relaciona estrechamente con los procariontes, tienen una maquinaria simplificada para la transcripción, procesamiento de su RNA y para la replicación del DNA, así como para la mayoría de sus vías metabólicas (Morrison *et al.*, 2007).

Durante su ciclo de vida presenta dos estadios (Figura 2), el trofozoíto que es la fase vegetativa la cual coloniza el intestino del hospedero, y el quiste o fase infectiva del organismo. Es un organismo microaerófilico que se reproduce por fisión binaria, su hábitat es el epitelio del intestino delgado del hospedero, la transformación de trofozoíto a quiste sucede en el tubo digestivo siendo eliminados del hospedero en forma de quiste a través de las evacuaciones (Cruz *et al.*, 2001).

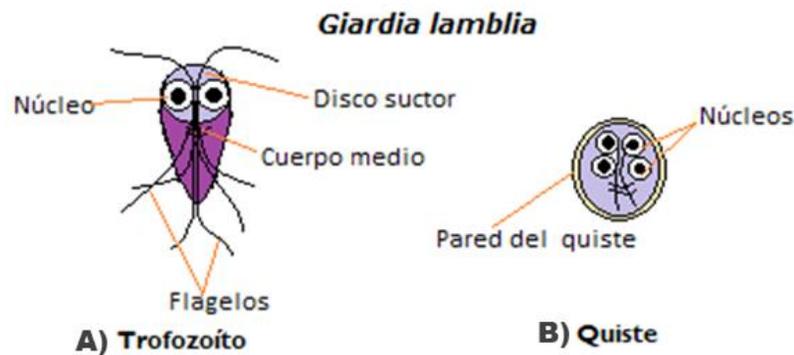


Figura 2. Estadios de vida de *Giardia lamblia*. (A) Trofozoíto o fase vegetativa. (B). Quiste o fase infectiva del parásito (Vázquez *et al.*, 2009).

1.2.1. Trofozoíto:

Posee simetría bilateral, con forma pereniforme con un tamaño de 12 a 15 μm de longitud por 6 a 8 μm de ancho, convexo dorsalmente, presenta dos axostilos centrales. Su región ventral es cóncava y posee un disco de succión o adhesivo de gran tamaño el cual le ayuda a adherirse al epitelio intestinal del hospedero, así como a tomar los nutrientes necesarios del medio (Soriano, 2002). El disco succionador se encuentra en posición ventral formado por microtúbulos en espiral que están constituidos por proteínas como tubulina y giardina. Presenta dos núcleos ovales con 5 cromosomas en cada uno, los cuales tienen un número estimado de 1.2×10^7 pares de bases de DNA, con cantidad de G/C de 46% (Adam, 2001).

Se ha sugerido que el daño tisular presente en pacientes y en modelos experimentales durante la infección por *G. lamblia*, podría deberse al contacto directo que ejerce el parásito en la mucosa intestinal cuando se adhiere al epitelio intestinal. El contacto se realiza inicialmente mediante el disco suctor (estructura única en este parásito, que muestra un papel importante en la patología de la giardiasis), esta adhesión de los trofozoítos a la mucosa intestinal es comparada con la fuerza mecánica ejercida por una ventosa, la cual es capaz de dejar una huella sobre las vellosidades modificando el borde de cepillo (Céu Sousa *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2004).

1.2.2. Quiste:

Presenta morfología elipsoidal con un tamaño de 8-12 μm de longitud por 5-8 μm de ancho. Posee un citoplasma granular, fino, el cual se encuentra separado de una pared quística de 0.3 μm de espesor adosada a la membrana plasmática. En su citoplasma presenta ocho axonemas, de los cuales seis se encuentran localizados en el área central y dos en la periferia (Soriano, 2002). Además, presenta vacuolas, ribosomas y fragmentos del disco ventral. El quiste es circundado por una pared quística hialina que le confiere capacidad de resistencia al medio ambiente (Rivera *et al.*, 2002).

El estímulo que induce la exquistación es el cambio drástico de pH dentro del sistema digestivo del hospedero, el cual cambia de un pH ácido a un pH neutro, además de los cambios de temperatura al que es expuesto el quiste en el hospedero. Una vez que el quiste llega al intestino y se encuentra nuevamente en un ambiente con pH neutro se da propiamente la liberación del parásito del quiste (Bingham *et al.*, 1979).

Giardia lamblia posee un ciclo monoxénico; es decir solo presenta un hospedero a lo largo de su ciclo de vida (Figura 3). El ciclo de vida inicia cuando los hospederos los cuales pueden ser humanos o animales ya parasitados, eliminan los quistes por medio de sus heces, los cuales contaminan el suelo y el agua. El hospedero inmunológicamente susceptible adquiere la infección al ingerir los quistes. Algunos estudios revelan la existencia de zoonosis entre los genotipos que parasitan animales domésticos hacia los humanos (Rivera, 2002; Vázquez *et al.*, 2009; Cernikova *et al.*, 2018).

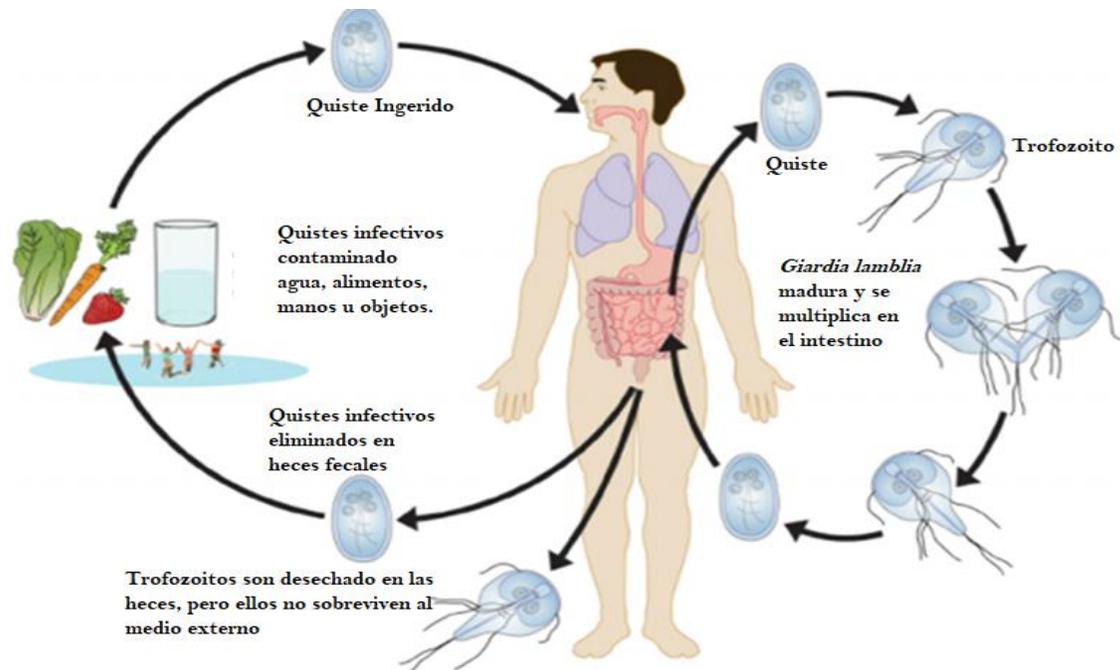


Figura 3. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*. El ciclo comienza cuando el hospedero consume los quistes presentes en agua o alimentos contaminados, del quiste emergen dos trofozoítos posteriormente se adhieren en la micro vellosidades del intestino delgado, por ultimo al desprenderse del epitelio intestinal comienza el proceso de enquistamiento y los quistes son eliminados en las heces fecales del hospedero (Esch *et al.*, 2013).

1.3. Metabolismo de *Giardia lamblia*

En cuanto al metabolismo de *G. lamblia* este posee características tanto aerobias como anaerobias, puede vivir en presencia de bajas concentraciones de oxígeno por lo que se considera como un organismo microaerofílico. Su metabolismo energético está basado principalmente en la glucólisis que conduce a la producción de moléculas de ATP, NADH, acetato, etanol, alanina y dióxido de carbono (CO₂). El metabolismo de los trofozoítos es afectado por cambios en la concentración de oxígeno, en condiciones estrictamente anaeróbicas, la alanina es el principal producto del metabolismo de los carbohidratos, con la adición de mínimas cantidades de oxígeno se estimula la producción de etanol y se inhibe la producción de alanina (Adam, 2001).

El genoma de *G. lamblia* representa una forma simplificada de muchos procesos celulares, comparativamente a otros eucariontes, es decir, hay presencia de menor número de subunidades básicas, incorporación de enzimas de un solo dominio de tipo bacteriano y un menor número de procesos metabólicos; así como menor cantidad de enzimas con respecto a lo reportado en otros parásitos. Se ha sugerido que los componentes faltantes dentro de las diversas rutas metabólicas pueden ser no esenciales o son funcionalmente redundantes además se ha sugerido que quizá el huésped le proporcione productos metabólicos esenciales que complementen una vía metabólica “incompleta” (Morrison *et al.*, 2007). La glucólisis presente en *G. lamblia* genera adenosin trifosfato (ATP), esto es debido a una fosforilación a nivel de sustrato. Adicionalmente *G. lamblia* no genera ATP por medio de la fosforilación oxidativa debido a la inexistencia de mitocondrias en este organismo, en su lugar se ha demostrado la presencia de reductos mitocondriales denominados mitosomas, sin embargo hasta la fecha no se ha demostrado que dichos mitosomas produzcan ATP. Además, la glucosa no se oxida completamente a CO₂ y H₂O como en el metabolismo aeróbico, pero se cataboliza de forma incompleta a acetato, etanol, alanina y CO₂. El equilibrio de la formación del producto final es sensible a la tensión de oxígeno (O₂) y a la concentración de glucosa en el medio (Adam, 2001).

La glucólisis y la vía de las pentosas fosfato son las principales vías metabólicas en las que *G. lamblia* cataboliza la glucosa y por las cuales se proporciona a la célula moléculas de ATP y potencial reductor en forma de nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato reducido (NADPH), respectivamente. La vía de las pentosas fosfato desempeña un papel crucial en el parásito al generar NADPH, que se utiliza como un donador de electrones en los procesos biosintéticos, además desempeña un papel en la defensa contra el ataque oxidativo del huésped infectado y proporciona también ribosa 5-fosfato como precursor de los ácidos nucleicos y varios metabolitos intermediarios tales como fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato (Duffieux *et al.* 2000).

De manera general la vía de las pentosas fosfato se puede dividir en dos fases: oxidativa y no oxidativa. En la fase oxidativa (Figura 4) por cada molécula de glucosa se generan dos moléculas de NADPH, una de ribulosa-5-fosfato y otra de CO₂, con la intervención de tres reacciones irreversibles: la oxidación de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfoglucono-δ-lactona

catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), la hidrólisis de la lactona a 6-fosfogluconato catalizada por la enzima 6-fosfogluconolactonasa (6PGL) y la descarboxilación oxidativa cuya reacción es llevada a cabo por la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH); en esta última reacción, se obtiene ribulosa-5-fosfato y una segunda molécula de NADPH. En cuanto a la fase no oxidativa, se transforman tres azúcares fosfatados de cinco carbonos a dos azúcares fosfatados de seis carbonos y un azúcar fosfatado de 3 carbonos (Naylor *et al.*, 2001; Ayene *et al.*, 2002; Stover *et al.*, 2011). Es de resaltar que en *G. lamblia*, la primera y la segunda reacción de esta vía es catalizada por una enzima que se presume está fusionada, reduciendo así el número de pasos presentes en la fase oxidativa (Stover *et al.* 2011).

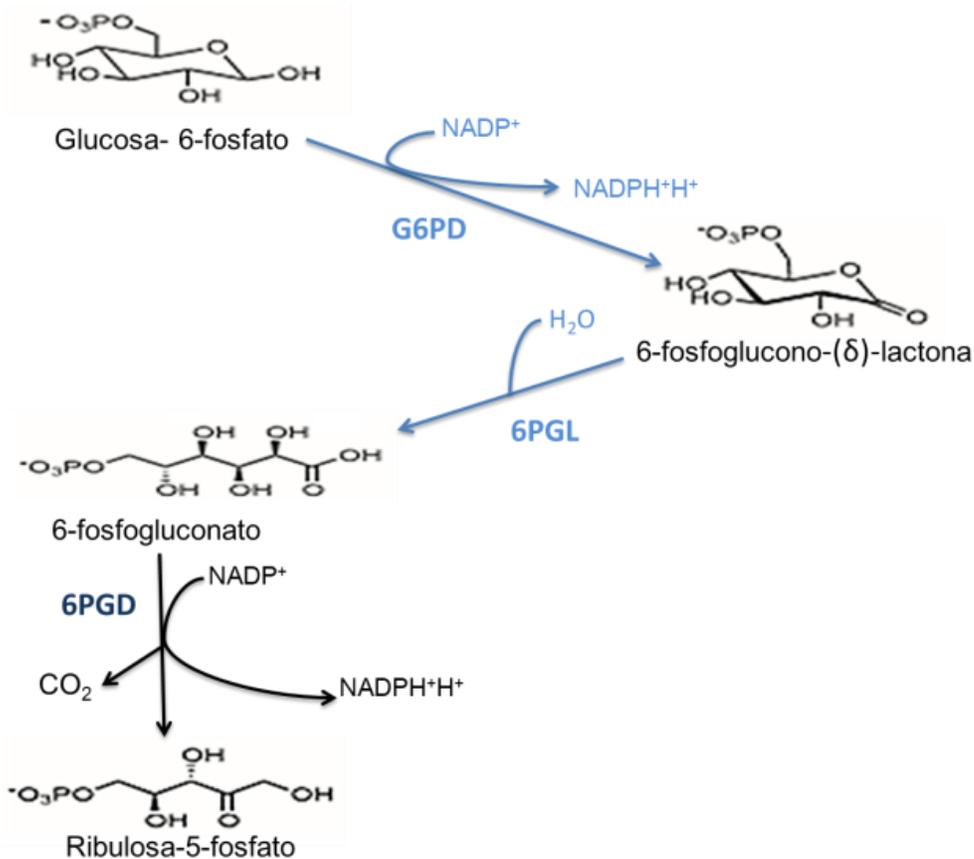


Figura 4. Esquema general de la fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato. La glucosa es oxidada por tres reacciones irreversibles para producir una ribulosa y otros productos como NADPH, H_2O y CO_2 (Stover *et al.*, 2011).

1.4. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) de *Giardia lamblia*

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es una enzima constitutiva presente en todos los organismos, desde arqueas, protozoos, plantas y animales. Cataliza la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato permitiendo la entrada de glucosa-6-fosfato (G6P) en la ruta, mediante esta reacción se produce la oxidación de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfoglucono- δ -lactona, obteniendo una molécula de NADPH. La forma biológica de la G6PD de humano consiste en dos subunidades idénticas que pueden estar como dímeros y/o tetrameros, la proporción de los oligómeros depende del pH. Su sitio catalítico está conformado por un sitio de unión a NADP⁺ y un sitio de unión a G6P. Además, en algunas enzimas la G6PD se ha reportado un sitio adicional de reconocimiento para la coenzima NADP⁺ que al unirse le confiere estabilidad estructural a la enzima nativa (Kirkman *et al.*, 1962, Fonseca *et al.*, 2005).

La primera estructura cristalográfica obtenida de la proteína G6PD fue a partir de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. Esta enzima es un monómero que consta de 485 aminoácidos y presenta dos dominios: el de unión a la coenzima (residuos 1-177), que presenta el plegamiento de unión del dinucleótido β - α - β , en el extremo N-terminal y el dominio β + α en el extremo C-terminal (178-485) formado por una larga hoja antiparalela (β G- β O) (Rowland *et al.*, 1994; Bastidas *et al.*, 2015). El análisis de su secuencia aminoácil indica que contiene tres fragmentos conservados los cuales se asocian con la unión correcta del sustrato G6P y la coenzima catalítica NADP⁺ durante la reacción enzimática.

En 2018 Morales-Luna *et al.*, caracterizaron la enzima G6PD de *G. lamblia*, y determinaron que tiene una masa molecular relativa de 83 kDa, en dicho trabajo mediante espectrometría de masas llegaron a la conclusión que intrínsecamente dentro de la secuencia génica de la G6PD se presenta una secuencia que codifica a otra enzima, la 6PGL, dando así una enzima fusionada G6PD::6PGL. En dicho trabajo además realizaron el análisis de la secuencia y se logró determinar la presencia de los tres sitios conservados en las enzimas G6PD, el sitio GxxGDLA el cual se ha descrito como sitio de unión a coenzima NADP⁺, el sitio EKPxG en la posición 154-158 que contiene a la prolina 156 encargada del posicionamiento correcto de los sustratos G6P y de la coenzima NADP⁺, por último el sitio RIDHYLGKE donde se ubica la lisina 189 que junto con la lisina 149, 205 y

la histidina 185 son responsables de la unión del sustrato y de la catálisis, además es importante mencionar que se determinaron 8 aminoácidos triptófano, los cuales sirvieron para realizar análisis de fluorescencia intrínseca..

También reportaron un modelo tridimensional de la estructura terciaria de la enzima G6PD::6PGL la cual se obtuvo a partir del servidor Phyre2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0) posteriormente fue refinado utilizando el software YASARA para minimización de energía y luego se validó utilizando MolProbity, dicho modelo fue empleado para modelar la posible posición de cada uno de las regiones (G6PD, 6PGL) (Figura 5A) presentes en la proteína fusionada así como para determinar la posición de los sitios activos del dominio G6PD (Figura 5B) (Morales-Luna *et al.*, 2018). Además es de mencionar que aun presentando las características propias de las enzimas G6PD, la enzima de *G. lamblia* tiene un porcentaje de identidad menor al 30% con la enzima G6PD humana.

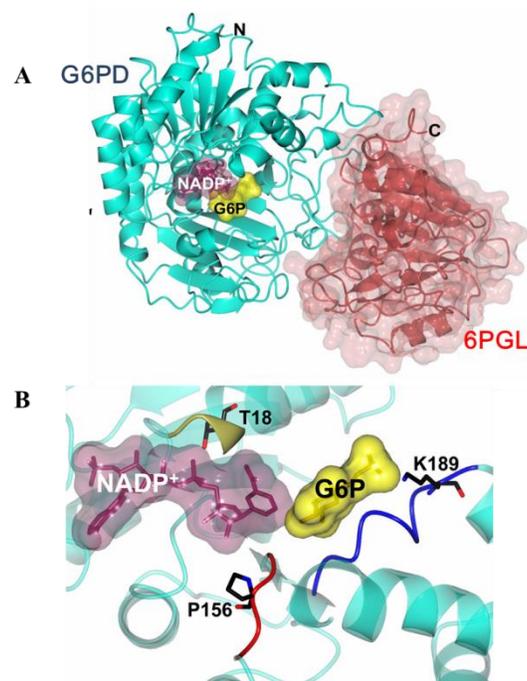


Figura 5. Modelo tridimensional de la enzima fusionada G6PD::6PGL del protista *Giardia lamblia*. A) La región marcada en cian (izquierda) representa la región del dominio G6PD ubicada en el extremo amino de la proteína, por otra parte la región roja (derecha) corresponde a la región de la enzima 6PGL B) Sitio activo de la región G6PD donde se posicionan los aminoácidos lisina 189, Treonina 18 y prolina 156 necesarios para el posicionamiento y catálisis de los sustratos (Morales-Luna *et al.*, 2018).

Además, Morales-Luna *et al.* (2018) reportaron los principales parámetros cinéticos correspondientes al dominio G6PD en la enzima fusionada (G6PD::6PGL) de *G. lamblia*, indicando una constante de afinidad (K_m), para los sustratos fisiológicos de 18.1 μM para G6P y de 13.9 μM para NADP^+ ; así como una velocidad máxima (V_{max}) de 11.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Además se determinó que la enzima activa está constituida por un dímero y que su pH óptimo de catálisis es 8.75 (Morales-Luna, *et al.*, 2018), sugiriendo que la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia* es diferente a la de otros organismos como el de *Trypanosoma cruzi* (Igoillo *et al.*, 2006), debido a que posee una menor actividad. Adicionalmente, Morales-Luna *et al.* (2020) reportaron la presencia de un dominio NADP^+ estructural en el dominio G6PD, el cual posiblemente le da una mayor estabilidad a la proteína.

Los trabajos realizados hasta ahora, únicamente se han enfocado en la caracterización del dominio que corresponde a la proteína G6PD, sin embargo a la fecha no se ha podido establecer con claridad si el dominio 6PGL es activo en la enzima fusionada G6PD::6PGL, además sí se encuentra como un solo polipéptido a lo largo del ciclo de vida de *G. lamblia*, confirmando su bifuncionalidad, o si esta pudiera sufrir proteólisis durante alguno de los estadios de desarrollo de *G. lamblia*, en cuyo escenario se podría pensar en la presencia de las enzimas G6PD y 6PGL como enzimas individuales.

1.5. Fosfogluconolactonasa (6PGL)

La enzima 6-fosfogluconolactonasa (6PGL) cataliza la segunda reacción de la vía de las pentosas fosfato, hidrolizando a la 6-fosfoglucono- δ -lactona a 6-fosfogluconato (Stover *et al.*, 2011). Se ha reportado que la 6-fosfogluconolactona existe en dos formas, δ y γ , la forma δ es el producto directo de la oxidación de la glucosa-6-fosfato, posteriormente se convierte en la forma γ por reordenamiento intramolecular. La enzima 6PGL en *Homo sapiens* es un monómero en condiciones fisiológicas y está compuesto de 258 residuos de aminoácidos con una masa molecular de ~ 30 kDa (Yuking *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta el momento no existen reportes de la enzima 6PGL de *Giardia lamblia*.

1.6. Fusión de genes *g6pd* y *6pgl* en el parásito *Giardia lamblia*

Previamente Stover *et al.* (2011), mediante análisis bioinformático de las secuencias de aminoácidos de la proteína G6PD de *G. lamblia*, propuso una posible fusión de los genes que codifican para las enzimas G6PD y 6PGL en organismos parásitos pertenecientes a los grupos ampicomplexa y excavata. En estos organismos la fusión de G6PD y 6PGL posiblemente se originó mediante transferencia horizontal en un ancestro bacteriano común y que se dio en eventos evolutivos diferentes. Así también, proponen que la fusión podría aportar beneficios a los organismos que la poseen, ya que se plantea que al realizarse dos reacciones por una enzima (Figura 6), posiblemente la vía sea más eficiente en cuanto a la velocidad para producir moléculas de NADPH. Esto debido al ambiente oxidante al cual se ven sometidos los parásitos por parte del sistema inmune de sus hospederos; la situación anterior terminaría favoreciendo al parásito lo cual le ayudaría a permanecer en su hospedero. Debido a las incógnitas mencionadas, sería importante caracterizar la enzima fusionada G6PD::6PGL y analizar cuál es el evento que se está llevando a cabo para poder tener una idea más clara del proceso metabólico.

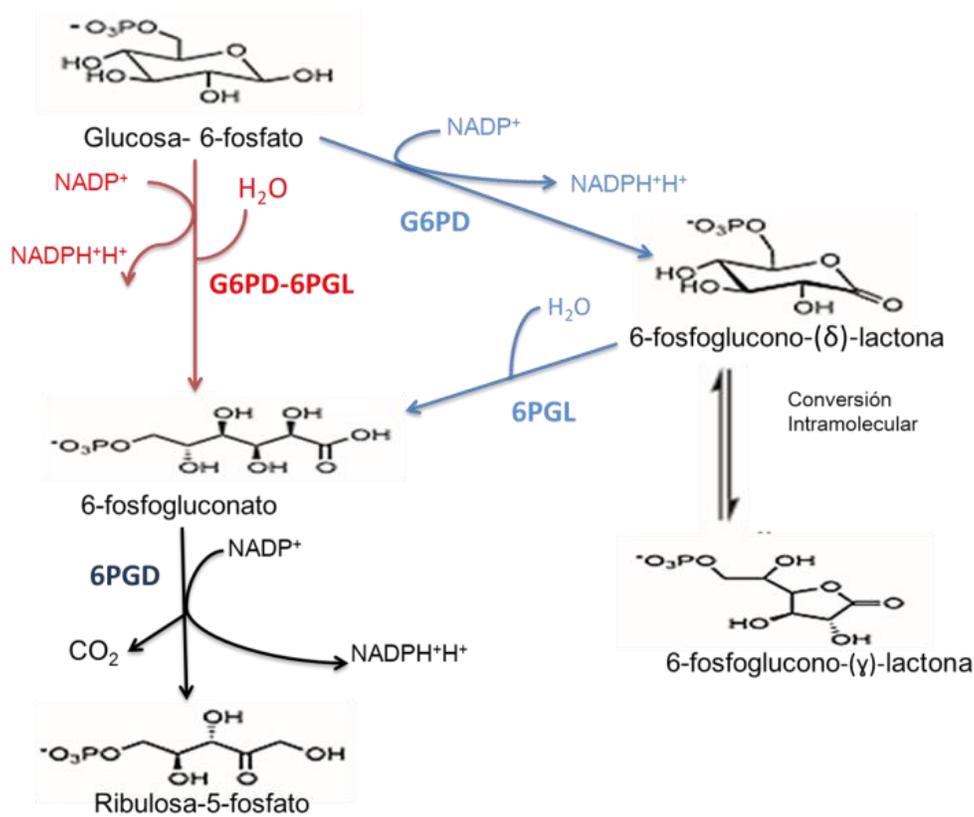


Figura 6.- Fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato presente en organismo con fusión de las enzimas G6PD::6PGL. El paso de la vía marcado en rojo (izquierda) indica la ruta seguida en las enzimas fusionadas donde el producto de la reacción con el sustrato G6P es 6-fosfogluconato. En azul (derecha) se muestra la ruta que se presenta en todos los organismos (Stover *et al.*, 2011).

Diversos estudios que han caracterizado enzimas fusionadas G6PD::6PGL se han llevado a cabo en organismos como *Trypanosoma brucei* y *Plasmodium falciparum*. *P. falciparum* que es un organismo perteneciente al phylum Apicomplexa, se ha caracterizado catalíticamente a los dos dominios de G6PD y 6PGL, incluso se han realizado ensayos de inhibición con compuestos. Jortzik *et al.* (2011) reportó una actividad catalítica disminuida en las enzimas G6PD y 6PGL al clonaras individualmente, lo que podría evidenciar la posibilidad de que la proteína sea una proteína fusionada y bifuncional (Jorzskin *et al.*, 2011; Duffieux *et al.*, 2000; Clarke *et al.*, 2001).

2. Antecedentes

2.1. Estudios en proteínas bifuncionales

Para realizar el análisis de la bifuncionalidad de proteínas se han empleado diferentes técnicas que permiten discernir los componentes presentes dentro del producto de la reacción de las enzimas fusionadas. Una de las herramientas utilizadas es la resonancia magnética nuclear de protón y carbono (RMN¹H, RMN¹³C), mediante la cual es posible analizar los núcleos de algunos elementos como ¹H, ¹³C, que son componentes de las moléculas orgánicas. En este sentido, Gómez Manzo *et al.* (2015) analizó el producto final de una enzima participante en la fermentación oxidativa del etanol en *Gluconacetobacter diazotrophicus*, donde se reportó que la bacteria es capaz de convertir el etanol directamente a ácido acético por la enzima alcohol deshidrogenasa membranal (ADHm), sin la participación de una segunda enzima, la aldehído deshidrogenasa membranal (ALDHm), sin producirse el acetaldehído como intermediario. Con estos resultados, se concluyó que la ADHm de *G. diazotrophicus* es una enzima bifuncional, demostrando que esta característica permite mayor eficiencia de la enzima teniendo función para catalizar tanto al sustrato etanol y acetaldehído, y disminuir un paso en la fermentación oxidativa del etanol en *G. diazotrophicus*.

Otra herramienta que se ha empleado para la identificación de los compuestos presentes en la mezcla final de la reacción enzimática es la espectrometría de masas, la cual se basa en el estudio de la fragmentación que presentan los compuestos al ser ionizados, mediante este proceso la sustancia pierde algunos electrones y se fragmenta dando diferentes iones, radicales y moléculas neutras las cuales serán características de cada compuesto, mismos que son separados en función de su relación masa/carga (m/z) y detectados posteriormente para determinar la composición de una mezcla problema. Tian *et al.* (2006) realizaron el estudio de una proteína de fusión, en el que optimizó la obtención de un flavonoide que confiriera a las plantas resistencia enfermedades causadas por el mal clima y a su vez que favoreciera el nodulación. En dicho estudio, fusionaron la enzima de la vía de las chalconas con una isoflavona creando la enzima fusionada isoflavona sintasa/chalcona isomerasa. En su estudio por espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear demostraron la

bifuncionalidad de la enzima de fusión mediante el análisis del producto final de la reacción enzimática de la isoflavona sintasa/chalcona isomerasa.

Basado en lo anterior, en el presente proyecto se emplearon dos métodos para caracterizar la enzima fusionada G6PD::6PGL como son: la espectrometría de masas tiempo de vuelo y la actividad enzimática; las cuales nos podrán ayudar discernir la existencia de bifuncionalidad en la enzima G6PD::6PGL del protista *G. lamblia*.

3. Justificación

Actualmente los tratamientos farmacológicos existentes para el tratamiento de la Giardiasis han sido poco selectivos causando reacciones adversas en el humano, aunado a la resistencia a dichos fármacos por parte de *G. lamblia*. Lo anterior hace relevante encontrar nuevos blancos terapéuticos que permitan tratar la Giardiasis de manera altamente selectiva y eficiente. Dentro de las dianas propuestas se encuentran enzimas relevantes en el metabolismo de *G. lamblia*. Nuestro grupo de trabajo se ha dado a la tarea de evaluar a la enzima fusionada G6PD::6PGL del parásito, como un candidato a blanco farmacológico ya que participa en la vía de las pentosas fosfato mediante la cual, el parásito combate el estrés oxidativo del medio. Además de que esta enzima es la encargada de regular esta vía metabólica, y debido a que presenta la fusión con la enzima 6PGL planteamos que podría ser una enzima relevante en el metabolismo de *G. lamblia*. Por lo que, el conocer las características físico-químicas de la enzima G6PD::6PGL nos permitirá discernir tanto la importancia de la enzima en el metabolismo del parásito *G. lamblia* así como establecer si hay diferencias entre esta enzima y las enzimas G6PD y 6PGL de *Homo sapiens*, lo cual resulta de importancia al estar en busca de nuevas dianas farmacéuticas que ayuden a desarrollar compuestos con potencial farmacológico anti-*G. lamblia* y que a su vez sean inocuos en el humano.

4. Hipótesis

La enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa::6-fosfogluconolactonasa (G6PD::6PGL) de *Giardia lamblia* al ser una enzima fusionada presentará mejores parámetros cinéticos en su estado fusionado con respecto a las enzimas individuales, así como la molécula presente en la reacción enzimática de la proteína fusionada será el 6-fosfogluconato con lo que se determinará a la enzima fusionada como una enzima bifuncional.

5. Pregunta de Investigación

¿La enzima fusionada glucosa-6-fosfato deshidrogenasa::6-fosfogluconolactonasa (G6PD::6PGL) de *Giardia lamblia* es una enzima bifuncional?

6. Objetivo General

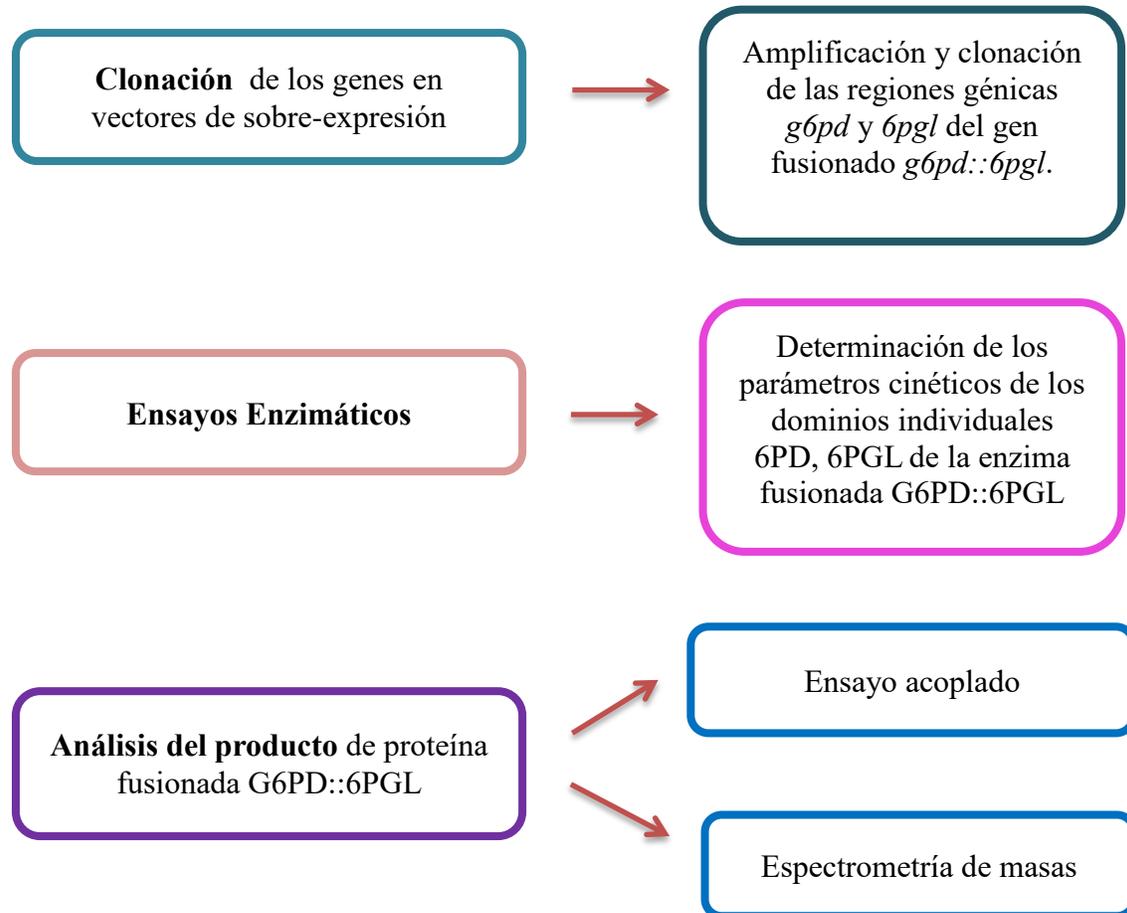
Determinar la bifuncionalidad de la enzima fusionada glucosa-6-fosfato deshidrogenasa::6-fosfogluconolactonasa (G6PD::6PGL) del parásito *Giardia lamblia*.

6.1. Objetivos Específicos

1. Clonar en un vector de sobreexpresión las regiones génicas *g6pd* y *6pgl* del gen fusionado *g6pd::6pgl* del parásito *G. lamblia*.
2. Sobreexpresar y purificar los dominios individuales G6PD y 6PGL de la proteína fusionada G6PD::6PGL del parásito *G. lamblia*.
3. Determinar los parámetros cinéticos del dominio individual G6PD de la enzima fusionada G6PD::6PGL del parásito *G. lamblia*.
4. Determinar los parámetros cinéticos del dominio individual 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL del parásito *G. lamblia*.
5. Analizar el producto de la reacción enzimática de la proteína fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia*, mediante métodos enzimáticos (ensayo acoplado) y espectrometría de masas.

7. Metodología

7.1. Esquema general de trabajo



7.2. Diseño de oligonucleótidos y amplificación de los dominios individuales *g6pd*, *6pgl* del gen fusionado *g6pd::6pgl* y del gen *6pgdh* de *Giardia lamblia*

A partir de la secuencia génica de *G. lamblia* depositada la base de datos Gen Bank con número de acceso GL50803_8682 se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar las regiones individuales de los genes *g6pd* y *6pgl* presentes en la secuencia del gen fusionado *g6pd::6pgl*. Para la amplificación del gen 6-fosfogluconato deshidrogenasa (*6pgdh*) se utilizó la secuencia depositada en la misma base de datos y con la clave de acceso GL50803_14759. Es importante mencionar que a cada oligonucleótido sentido se le adicionó una secuencia que reconoce la enzima de restricción *NdeI* y a los oligonucleótidos reversos se le adicionó una secuencia que reconoce la enzima de restricción *BamHI*, esto con la finalidad de clonar los fragmentos resultantes de cada amplificación a vectores de expresión (Tabla 1).

La amplificación de las regiones individuales *g6pd*, *6pgl* del gen fusionado *g6pd::6pgl* y del gen *6pgdh* se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final. La amplificación de las regiones *g6pd* y *6pgl* se llevó a cabo utilizando como templado el plásmido pET3a-HisTEVP/*g6pd::6pgl* el cual contenía el gen fusionado *g6pd::6pgl* de *G. lamblia* (Morales.Luna *et al.*, 2018). Para el gen *6pgdh* se utilizó DNA genómico extraído de trofozoítos de *G. lamblia*.

La mezcla de reacción consistió en 200 ng de oligonucleótidos, 200 ng de DNA templado, 10 mM de dNTP, 1X PCR buffer y 1 U de DNA polimerasa Phusion® High Fidelity DNA Polimerasa (Thermo Scientific, Hudson, NH, USA). Las condiciones de reacción de PCR fueron las siguientes: 1 minuto a 98 °C para la desnaturalización; 30 ciclos de amplificación (30 segundos a 98 °C, 20 segundos a T_m de los oligonucleótidos sentido y antisentido, 60 segundos a 72 °C de extensión) y 5 minutos a 72 °C para la extensión final. La correcta amplificación de los fragmentos fue corroborada en un gel de agarosa al 1%, visualizado con GelRed® (Thermo Scientific, Hudson, NH, USA) en luz ultravioleta.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar las regiones individuales *g6pd*, *6pgl*, y el gen *6pgdh* de *Giardia lamblia*.

Nombre Secuencia	Secuencia	N° Pb	Tm °C
<i>g6pd</i> sentido	5'-GCGTCATATGTTCAAGCCTTCCTGC-3'	25	69.38
<i>g6pd</i> antisentido	5'-CTGGGGATCCTTAATTGAACACTGG-3'	25	68.02
<i>6pgl</i> sentido	5'-GCGCCATATGAATAATAGCTTTGACATA-3'	28	69.24
<i>6pgl</i> antisentido	5'-GCGGGATCCTTAGTATATGATGGGCTT-3'	27	65.54
<i>6pgdh</i> sentido	5'-TCTACATATGGACATTGGCATCGTG-3'	25	66.66
<i>6pgdh</i> antisentido	5'-CCTAGGATCCTTATTCTCAGTCCAGAC-3'	28	69.19

Los productos de PCR correspondientes a los fragmentos esperados se purificaron utilizando el kit GenJET Gel Extraction (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los productos purificados fueron ligados en el vector pJET1.2/blunt utilizando el kit de clonación CloneJET-PCR (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Las construcciones resultantes fueron nombradas: pJET1.2/blunt-*g6pd*, pJET1.2/blunt-*6pgl* y pJET1.2/blunt-*6pgdh* (Tabla 2).

Posteriormente los vectores se utilizaron para transformar las células competentes *Escherichia coli* Top10F'. Las colonias transformantes fueron crecidas en 15 mL de medio Luria Bertani (LB) con 100 µg/mL de ampicilina como antibiótico de selección, durante 12 horas a 37 °C. Las células previamente incubadas, se centrifugaron a 12,000 rpm y el botón celular se utilizó para extraer el DNA plasmídico con el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Sientific. Waltham, MA, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor.

7.3. Clonación al vector de sobreexpresión pET3a-HisTEVP de los dominios individuales *g6pd* y *6pgl* del gen fusionado *g6pd::6pgl* y del gen *6pgdh* de *Giardia lamblia*

Con la finalidad de subclonar los dominios individuales *g6pd*, *6pgl* del gen fusionado *g6pd::6pgl* y el gen *6pgdh* al vector de sobreexpresión pET3a-HisTEVP, los plásmidos purificados pJET1.2/blunt-*g6pd*, pJET1.2/blunt-*6pgl* y pJET1.2/blunt-*6pgdh* fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Nde*I (Termo Cientific. Waltham, MA, USA) durante 30 minutos a 37 °C. Cada producto de digestión se corrió en un gel de agarosa al 1%, y las bandas correspondientes a los tamaños relativos esperados de las regiones *g6pd*, *6pgl* y el gen *6pgdh* se purificaron utilizando el kit GenJET Gel Extraction (Termo Cientific. Waltham, MA, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor. Después el vector pET3a-HisTEVP (Novagen, Madison, WI, USA) fue digerido con las enzimas *Bam*HI y *Nde*I (1U) durante 30 minutos a 37 °C.

Los dominios individuales de los genes *g6pd* y *6pgl* del gen fusionado *g6pd::6pgl*, el gen *6pgdh* y el vector pET3a-HisTEVP previamente digerido fueron ligados con la enzima T4 DNA ligasa (Termo Cientific. Waltham, MA, USA) durante 3 horas a 25 °C. Las construcciones resultantes fueron nombradas pET3a-HisTEVP/*g6pd*, pET3a-HisTEVP/*6pgl*, y pET3a-HisTEVP/*6pgdh* respectivamente (Tabla 2). Con la finalidad de determinar la correcta inserción de los genes clonados en el vector pET3a-HisTEVP, así como de la fidelidad de los mismos, las construcciones finales se secuenciaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT-UNAM). La secuencia de nucleótidos obtenida se comparó con las secuencias de nucleótidos de cada gen depositadas en la base de datos del GenBank utilizando el programa Blast en el servidor NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Posteriormente verificada la secuencia de los dominios individuales *g6pd*, *6pgl* del gen fusionado *g6pd::6pgl* y el gen *6pgdh*, cada uno de los plásmidos se transformó en células *E. coli* BL21(DE3) Δ *zwf::kan^r* las cuales contienen deletado su gen *zwf* que codifica para la proteína Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Tabla 2. Cepas y plásmidos empleados en el desarrollo experimental de este trabajo.

Cepas Bacterianas	
Cepa	Características
Top10F'	Células <i>Escherichia coli</i> competentes.
BL21(DE3) $\Delta_{zwf::kan^r}$	Células <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) $\Delta_{zwf::kan^r}$ deficientes del gen <i>zwf</i> endógeno.
Plásmidos	
Plásmido	Características
pJET1.2/blunt- <i>g6pd</i>	pJET1.2/Blunt contiene el dominio individual <i>g6pd</i> del gen fusionado <i>g6pd::6pgl</i> de <i>Giardia lamblia</i> con resistencia a ampicilina.
pJET1.2/blunt- <i>6pgl</i>	pJET1.2/Blunt contiene el dominio individual <i>6pgl</i> del gen fusionado <i>g6pd::6pgl</i> de <i>Giardia lamblia</i> con resistencia a ampicilina.
pJET1.2/blunt- <i>6pgdh</i>	pJET1.2/Blunt contiene el gen <i>6pgdh</i> de <i>Giardia lamblia</i> con resistencia a ampicilina.
pET3a-HisTEVP/ <i>g6pd::6pgl</i>	pET3a-HisTEVP contiene el gen fusionado <i>g6pd::6pgl</i> de <i>Giardia lamblia</i> con resistencia a ampicilina.
pET3a-HisTEVP/ <i>g6pd</i>	pET3a-HisTEVP contiene el dominio individual <i>g6pd</i> del gen fusionado <i>g6pd::6pgl</i> de <i>Giardia lamblia</i> con resistencia a ampicilina.
pET3a-HisTEVP/ <i>6pgl</i>	pET3a-HisTEVP contiene el dominio individual <i>6pgl</i> del gen fusionado <i>g6pd::6pgl</i> de <i>Giardia lamblia</i> con resistencia a ampicilina
pET3a-HisTEVP/ <i>6pgdh</i>	pET3a-HisTEVP contiene el gen <i>6pgdh</i> de <i>Giardia lamblia</i> con resistencia a ampicilina

7.4. Sobreexpresión y purificación de la proteína fusionada G6PD::6PGL de *G.*

lamblia

Con el objetivo de obtener puras a la enzima fusionada G6PD::6PGL, y los dominios individuales de G6PD y 6PGL de la proteína fusionada y realizar el análisis de actividad enzimática de las proteínas, fue necesario sobre-expresarlas en un sistema heterólogo bacteriano BL21(DE3) $\Delta_{zwf}::kan^r$ para posteriormente purificarlas.

Las cepas de *E. coli* BL21(DE3) $\Delta_{zwf}::kan^r$ con las construcciones pET3a-HisTEVP/*g6pd::6pgl*, pET3a-HisTEVP/*g6pd*, pET3a-HisTEVP/*6pgl*, se crecieron en 25 mL de medio LB con 100 μ g/mL de ampicilina, durante 12 horas a 37 °C, posteriormente cada cultivo se inoculó en 2 L de medio LB con 100 μ g/mL de ampicilina y 50 μ g/mL de kanamicina, los cultivos se dejaron en incubación a 37 °C hasta alcanzar densidad óptica (D.O. $_{600nm}$) de 1.0, posteriormente fueron inducidos con 0.3 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), y se dejaron en agitación por 12 horas a 25 °C. Las células se concentraron por centrifugación a 4000 x g durante 20 minutos. El botón celular se lavó con solución amortiguadora de fosfatos (K₂HPO₄ 50 mM, glicerol 10%, NaCl 150 mM, pH 7.35) y fue lisado por sonicación utilizando solución amortiguadora de lisis (K₂HPO₄ 50 mM, glicerol 10%, NaCl 150 mM, PMSF 0.5 mM, β -mercaptoethanol 0.1%, pH 7.35) como fue previamente reportado por Morales-Luna *et al.* (2018, 2020). El lisado fue centrifugado a 13000 x g durante 30 minutos y se obtuvo el sobrenadante (extracto crudo), el cual fue utilizado en los procesos de purificación.

La purificación de la proteína fusionada G6PD::6PGL se realizó utilizando el método de cromatografía de afinidad a metales inmovilizados, que en este caso fue el de níquel (Profinity™ IMAC). La resina fue previamente equilibrada con solución amortiguadora de equilibrio (K₂HPO₄ 50 mM, NaCl 350 mM, glicerol 10%, pH 7.35). En una columna se cargó la resina y fue lavada con 5 volúmenes de columna con solución amortiguadora de equilibrio más 40 mM de imidazol. Una vez equilibrada, se mezcló con el sobrenadante del lisado celular dejándose a 4 °C y en agitación durante 40 minutos. Se realizaron 3 lavados con amortiguador de equilibrio. Posteriormente y para eluir la proteína, la resina Profinity IMAC se mezcló con 250 mM de imidazol en solución de equilibrio. Para la proteína fusionada G6PD::6PGL, se monitoreó midiendo la actividad de G6PD para cada una de las

fracciones siguiendo la reducción espectrofotométrica a 340 nm del NADP^+ presente en la mezcla de reacción estándar (amortiguador Tris-HCl 0.1 M, MgCl_2 0.03 M, glucosa-6-fosfato 1 mM y NADP^+ 1 mM, pH 8,0). Las fracciones que mostraron actividad enzimática para el dominio G6PD fueron concentradas utilizando un centrifugador con membrana de paso de corte de 30 kDa Amicon YM-30 (Millipore, Burlington, MA, U.S.A.), posteriormente el producto concentrado fue dializado con 15 mL de amortiguador de equilibrio (K_2HPO_4 50mM, pH 7.35).

7.5. Purificación del dominio individual G6PD de la proteína fusionada G6PD::6PGL de *Giardia lamblia*

Para la purificación de la región de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) de la enzima fusionada G6PD::6PGL se empleó el método de purificación propuesto por Gómez-Manzo *et al.* (2014) donde incluye dos pasos de purificación por columnas de intercambio aniónico y afinidad a nucleótido. El extracto crudo fue cargado a la columna de intercambio aniónico Q-Sepharose 4B (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) acoplada al sistema AKTA de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC). Tanto la columna como el equipo fueron equilibrados con solución amortiguadora de equilibrio (K_2HPO_4 50 mM, pH 7.35), posteriormente la muestra fue aplicada a la columna y fue lavada con la misma solución de equilibrio a un flujo de 2 mL/minuto. Finalmente, la proteína fue eluída con un gradiente lineal de 0–350 mM NaCl en un periodo de 30 minutos. Las fracciones se colectaron en volúmenes de 2 mL y posteriormente a cada una de las fracciones se les midió la actividad enzimática de G6PD siguiendo la reducción de NADP^+ a 340 nm como previamente fue descrito por Morales-Luna *et al.* (2018). Las fracciones donde se determinó la actividad enzimática de G6PD, se concentraron utilizando el concentrador de filtración Centricon-30 (Millipore, USA), la fracción concentrada fue aplicada a la columna de afinidad 2',5'-ADP Sepharose 4B (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) la cual fue previamente equilibrada con amortiguador de equilibrio (K_2HPO_4 50 mM, pH 7.35). El flujo de elusión de todos los pasos en la columna fue de 15 mL por hora. Después de pasar la muestra, la columna fue lavada con 50 mL de amortiguador de equilibrio (K_2HPO_4 50 mM, pH 7.35), y finalmente la proteína fue eluída con la misma solución de equilibrio conteniendo 100 μM NADP^+ . Las fracciones se colectaron en volúmenes de 5 mL y la presencia de la enzima en las fracciones se determinó por actividad enzimática midiendo la

reducción de NADP^+ a 340 nm. Las fracciones con actividad enzimática fueron concentradas utilizando centricones con las características mencionadas, posteriormente el producto concentrado fue dializado con 15 mL de amortiguador de equilibrio (K_2HPO_4 50mM, pH 7.35).

7.6. Purificación del dominio individual 6PGL de la proteína fusionada G6PD::6PGL de *Giardia lamblia*

Para la purificación del dominio individual 6-fosfogluconolactonasa (6PGL) de la enzima fusionada G6PD::6PGL se utilizó el método de purificación IMAC. El extracto crudo de la cepa BL21(DE3) $\Delta zwf::kan^r$ conteniendo el plásmido de expresión pET3a-HisTEVP/6p g l se incubó durante 45 minutos a 25 °C junto con la resina IMAC previamente equilibrada con amortiguador de equilibrio (K_2HPO_4 50 mM, NaCl 350 mM, glicerol 10%, pH 7.35). Posteriormente, la resina fue lavada con 50 mL de la solución de equilibrio para remover las proteínas que no se unieron a la resina. Las proteínas unidas se eluyeron con 250 mM de imidazol en solución de equilibrio y se colectaron en tubos de ensayo en fracciones de 3 mL. Las 10 primeras fracciones eluidas fueron colectadas usando un centricon con membrana de corte de 30 kDa Amicon YM-30 (Miliopore, Burlington, MA, U.S.A.), por último el producto concentrado se dializó con 15 mL de amortiguador de equilibrio.

7.7. Purificación de la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) de *Giardia lamblia*

Debido a que la actividad catalítica de la enzima 6PGL no es detectable directamente de manera espectrofotométrica, fue necesario utilizar un ensayo acoplado con la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) de *G. lamblia*; para lo cual se purificó la enzima 6PGDH de *G. lamblia* se purificó empleando el método de IMAC. El extracto crudo conteniendo a la enzima 6PGDH se pasó por la columna de afinidad de níquel ProfinityTM IMAC (Biorad, Hercules, CA, USA) previamente equilibrada con 10 volúmenes de solución amortiguadora de equilibrio (K_2HPO_4 50 mM, NaCl 250 mM, glicerol 10%, pH 7.35). La proteína unida a la resina se eluyó utilizando amortiguador de equilibrio con 250 mM de imidazol. El volumen eluido se fraccionó en volúmenes de 2 mL. A las fracciones eluidas se les determinó actividad enzimática siguiendo la reducción de NADP^+ presente en la mezcla de reacción (0.1 mM Tris-HCl, pH 8.0, 3 mM MgCl_2 , 500 μM G6P, and 500 μM

NADP⁺). Las fracciones con actividad enzimática fueron cargadas en un gel SDS-PAGE al 12%, el cual fue revelado con azul de Coomassie coloidal brillante (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, USA) aquellas fracciones con actividad y presencia de la banda de interés fueron concentradas utilizando un centricon.

7.7.1. Determinación de la actividad catalítica del dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL

Con la finalidad de determinar la actividad catalítica del dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia* se procedió a medir el producto de la reacción de la enzima por medio de un ensayo acoplado utilizando la proteína 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *G. lamblia* (6PGDH). Primero, el sustrato 6-fosfoglucono- δ -lactona fue obtenido por medio de la reacción enzimática de la enzima G6PD recombinante de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Ramírez-Nava *et al.*, 2019) y el producto fue titulado bajo condiciones estándares. Posteriormente, la enzima G6PD recombinante de *G. diazotrophicus* fue separada de la reacción empleando un Centricon-30 (Millipore, USA) y se centrifugó a 4000 rpm por 7 minutos. El producto final de la reacción fue utilizado para acoplar la reacción con la enzima 6PGDH previamente purificada. En la reacción se colocaron 900 μ L del producto de la reacción enzimática de la proteína G6PD recombinante de *G. diazotrophicus*, 1 μ g de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia*, 100 μ M de NADP⁺ y la reacción fue iniciada con la adición de 1 μ g total de la enzima 6PGDH pura. La actividad de la enzima se detectó a través de la producción de NADPH a 340 nm en el espectrofotómetro Varian Cary 100 UV-VIS (Agilent, Santa Clara, USA). La velocidad inicial obtenida para cada concentración se usó para calcular la tasa de formación de producto NADPH (μ mol \cdot min \cdot mg) usando el coeficiente de extinción del NADP reducido ($6220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

7.7.2. Caracterización cinética del dominio G6PD de la enzima fusionada G6PD::6PGL y del dominio individual de la región G6PD

Se determinaron los parámetros cinéticos de los dominios glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y 6-fosfogluconolactonasa (6PGL) de la enzima fusionada G6PD::6PGL y se compararon con los parámetros cinéticos obtenidos en las proteínas individuales G6PD y 6PGL de *G. lamblia*. Las velocidades iniciales para el dominio G6PD de la enzima

fusionada y de la proteína individual fueron determinadas espectrofotométricamente a 25 °C monitoreando la reducción de NADP⁺ a 340 nm, como fue previamente reportado por (Gómez-Manzo *et al.*, 2014; 2015; 2016; 2017). Las velocidades iniciales se obtuvieron variando un sustrato glucosa-6-fosfato (G6P) o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺) de 2.5 a 200 μM; mientras que el segundo sustrato se fijó a una concentración de saturación (250 uM de NADP⁺ ó G6P). Se utilizó una concentración final de 1 μg y 4 μg de proteína purificada de la enzima fusionada G6PD::6PGL y de la proteína individual G6PD, respectivamente. La velocidad inicial obtenida para cada concentración se usó para calcular la tasa de formación de producto NADPH (μmol·min·mg) usando el coeficiente de extinción del NADP reducido (6220 M⁻¹·cm⁻¹). Los parámetros cinéticos K_m, k_{cat}, y V_{max} se obtuvieron ajustando los datos a la ecuación de Michaelis–Menten mediante cálculos de regresión no lineal utilizando con el software ORIGIN Lab 8®. Donde una unidad (U) de actividad G6PD es definida como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μmol de nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato reducido (NADPH) por minuto por mg de proteína.

7.7.3. Caracterización cinética de la región individual y del dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *Giardia lamblia*

Para evaluar la actividad catalítica del dominio de la 6-fosfogluconolactonasa (6PGL) presente en la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia* se determinaron los parámetros cinéticos. La actividad enzimática se midió en un volumen final de 1 mL de reacción en amortiguador de T (Tris-HCl 0.1 M, MgCl 0.1 M, 1 mM NADP⁺, pH 8). Debido a que la actividad de la enzima 6PGL no es detectable, se utilizó el método acoplado empleando la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) de *G. lamblia* como enzima reportera monitoreando la reducción de NADP⁺ a 340 nm. Se utilizó una concentración final de 20 μg de proteína pura 6PGD por cada reacción estándar. El sustrato 6-fosfoglucono-δ-lactona fue obtenido por medio de la reacción enzimática de la enzima G6PD recombinante de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Ramírez-Nava *et al.*, 2019) y el producto fue titulado bajo condiciones estándares. Posteriormente, se realizó una curva de saturación con el sustrato 6-fosfoglucono-δ-lactona de 2.5 a 300 μM. La reacción fue iniciada con la adición de 10 μg de la enzima fusionada G6PD::6PGL. La velocidad inicial obtenida para cada concentración se usó para calcular la tasa de formación de producto

NADPH ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}$) usando el coeficiente de extinción de la molécula NADP reducido a 340 nm ($6220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Los parámetros cinéticos K_m , k_{cat} , y V_{max} se obtuvieron ajustando los datos a la ecuación de Michaelis–Menten como ya se mencionó.

7.8. Determinación del producto final de la reacción de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *Giardia lamblia*.

Para poder determinar la bifuncionalidad de la enzima G6PD::6PGL de *Giardia lamblia* se determinaron los productos finales presentes en el reacción de la enzima fusionada, ya que con esto es posible determinar la actividad de cada una de las regiones de la proteína.

7.8.1. Determinación del producto final de la reacción por método enzimático

Para determinar el producto final de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia* se procedió a medir el producto final de la reacción por medio de un ensayo acoplado con la enzima 6PGDH (6-fosfogluconato deshidrogenasa de *G. lamblia*) previamente purificada (Morales-Luna et al., 2021). Primero, la enzima fusionada G6PD::6PGL purificada se colocó con G6P (100 μM) y NADP^+ (100 μM) en 1 mL de mezcla de reacción (Tris-HCl 0.1 M, MgCl_2 3 mM, pH 8), la catálisis de la enzima G6PD fue seguida mediante la reacción de reducción del NADP^+ a 340 nm con el espectrofotómetro Varian Cary 100 UV-VIS (Agilent, Santa Clara, USA). Para asegurar que todo el sustrato G6P en la reacción haya sido catalizado a producto se adicionó nuevamente NADP^+ hasta que no se detectó cambios en la absorptividad a 340 nm; lo cual indicó que la mayoría del sustrato G6P fue convertido a producto. Posteriormente la enzima G6PD::6PGL fue separada de la reacción; empleando un Centricon-30 (Millipore, USA) y el producto final de la reacción fue utilizado para acoplar la reacción con la enzima 6PGDH purificada. En la reacción se colocaron 900 μL del producto de la reacción enzimática de la proteína fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia*, 100 μM de NADP^+ y la reacción fue iniciada con la adición de 1 μg total de la enzima 6PGDH pura. La actividad de la enzima se detectó a través de la producción de NADPH a 340 nm en el espectrofotómetro Varian Cary 100 UV-VIS (Agilent, Santa Clara, USA), y se calculó la actividad específica.

7.8.2. Determinación del producto final de la reacción enzimática por espectrofotometría de masas MALDI-TOF

La técnica de espectrofotometría de masas nos permitió determinar la identidad de los productos finales de la reacción de la enzima G6PD::6PGL por sus masas iónicas. Para obtener el producto final de la reacción de la enzima G6PD::6PGL, se colocó 1 µg de la enzima fusionada G6PD::6PGL en presencia de sus sustratos saturantes G6P (50 µM) y NADP⁺ (150 µM) en un volumen final de 1 mL en amortiguador de 25 mM de fosfatos a pH 7.35. La actividad fue monitoreada siguiendo la reducción del NADP⁺ a 340 nm. Posteriormente, la proteína fue separada utilizando un centrífugo con membrana de paso de 30 kDa Amicon YM-30 (Milipore, Burlington, MA, U.S.A.). El producto de la reacción se analizó en el equipo Bruker Microflex MALDI-TOF usando la matrix DHB (2,5-Dihydroxybenzoic acid). Posteriormente los espectros obtenidos fueron analizados con el software mMass, y se utilizaron las bases de datos “The Human Metaboloma data base (www.hmdb.ca) y MassBank of North America (MoNA) (mona.fiehnlab.ucdavis.edu)”², para comparar los espectros obtenidos en MALDI-TOF con los espectros ya reportados y con ello determinar los posibles productos finales de la reacción de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia*.

8. Resultados

8.1. Amplificación de los dominios génicos *g6pd*, *6pgl* del gen fusionado *g6pd::6pgl*

Una de las estrategias empleadas para corroborar si la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia* es bifuncional, fue comparando los parámetros cinéticos de la enzima fusionada G6PD::6PGL y de sus dominios individuales de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y 6-fosfogluconolactonasa (6PGL). Para obtener los dominios de las proteínas individuales G6PD y 6PGL, cada una de las regiones del gen fusionado *g6pd::6pgl*, que corresponden a las secuencias *g6pd* y *6pgl* de forma individual, fueron clonadas a un vector de sobreexpresión, para posteriormente sobre-expresar las proteínas en un sistema de sobreexpresión bacteriana.

La amplificación de las regiones *g6pd* y *6pgl* provenientes del gen fusionado *g6pd::6pgl* se realizó mediante PCR punto final. La Figura 7 muestra el gel de agarosa al 1% de los productos de la amplificación de las regiones individuales *g6pd* y *6pgl* provenientes del gen fusionado *g6pd::6pgl* de *G. lamblia*. El producto de PCR correspondiente al gen fusionado *g6pd::6pgl* de *G. lamblia* se obtuvo con un tamaño molecular relativo de 2,229 pares de bases (pb) (Figura 7, carril 1); mientras que el producto de PCR de la región correspondiente al gen individual *g6pd* se observa un tamaño relativo de 1,512 pb donde la banda amplificada coincide con el tamaño esperado (Figura 7, carril 2). Finalmente en la Figura 7 (carril 3) se muestra el producto de PCR perteneciente a la región del gen individual *6pgl* con un tamaño relativo de 618 pb.

8.2. Amplificación del gen 6-fosfogluconato deshidrogenasa (*6pgdh*) de *Giardia lamblia*

Otro de los objetivos fue evaluar la actividad enzimática del dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL y del dominio individual 6PGL, por lo que se clonó y expresó la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *G. lamblia* para realizar un ensayo acoplado. Esto debido a que la catálisis de la 6PGL no es detectable por métodos espectrofotométricos ni colorimétricos. Basado en lo anterior, se amplificó el gen *6pgdh* de *G. lamblia* (clave de acceso GL50803_14759) y se clonó en un vector de sobreexpresión con la finalidad de obtener a la enzima recombinante mediante un sistema de sobreexpresión bacteriano. En la Figura 7, carril 4 se muestra el producto final de la

amplificación del gen *6pgdh* donde se observó una única banda amplificada con un tamaño aproximado a 1500 pb, y que corresponde al tamaño del fragmento esperado.

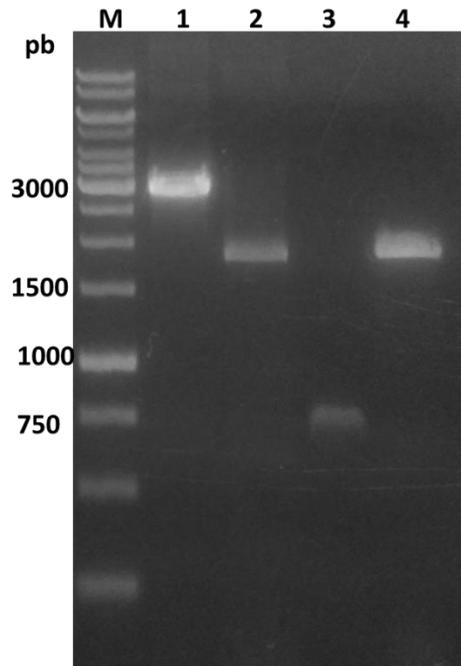


Figura 7. Amplificación del gen fusionado *g6pd::6pgl* y el gen *6pgdh* de *G. lamblia*, y de los dominios individuales *g6pd*, *6pgl* provenientes del gen fusionado *g6pd::6pgl*. Se muestran los productos de la amplificación mediante PCR punto final. (M) Marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb Plus DNA (Termo Scientific®). Carril 1, producto de PCR del gen fusionado *g6pd::6pgl*. Carril 2, producto de PCR de la región individual *g6pd* del gen fusionado *g6pd::6pgl*. Carril 3, producto de PCR de la región individual *6pgl* del gen fusionado *g6pd::6pgl*. Carril 4, producto de PCR del gen *6pgdh* de *G. lamblia*.

Los productos de PCR se clonaron a un vector de clonación pJET1.2/Blunt y se transformaron en células competentes *E.coli* Top10F'. Posteriormente se purificó el DNA plasmídico de las colonias transformantes, con la finalidad de corroborar que las clonas transformantes seleccionadas tuvieran la construcción con el gen del tamaño esperado. Los plásmidos pJET1.2/blunt-*g6pd*, pJET1.2/blunt-*6pgl* y pJET1.2/blunt-*6pgdh* fueron digeridos con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*, y el producto de la digestión se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La Figura 8 muestra el gel de agarosa con el producto de la digestión de los plásmidos pJET1.2/blunt-*g6pd*, pJET1.2/blunt-*6pgl* y pJET1.2/blunt-*6pgdh* y la digestión del plásmido pJET1.2/blunt-*g6pd::6pgl* el cual fue utilizado como referencia del tamaño del gen fusionado.

Como se observa en la Figura 8 (carril 1) la digestión libera dos bandas: una de 3000 pb la cual corresponde al vector pJET1.2/blunt y otra banda con un peso cercano al tamaño 2229 pb, la cual corresponde al gen fusionado *g6pd::6pgl* liberado del plásmido; mientras que en el carril 2, la digestión del plásmido pJET1.2/blunt-*g6pd*, libera dos bandas como producto de la digestión las cuales corresponden al vector pJET1.2/blunt (3000 pb) y al gen *g6pd* de 1512 pb. Mientras que el plásmido pJET1.2/blunt-*6pgl* liberó dos bandas: la primera de 3000 pb la cual corresponde al vector pJET1.2/blunt y otra banda con un tamaño 618 pb, la cual corresponde al gen *6pgl*. Finalmente, el carril 4 muestra el producto de la digestión enzimática del plásmido que contenía al gen *6pgdh*, donde se observa un fragmento liberado con tamaño aparente de 1500 pb lo que corresponde con el tamaño esperado para el gen *6pgdh*.

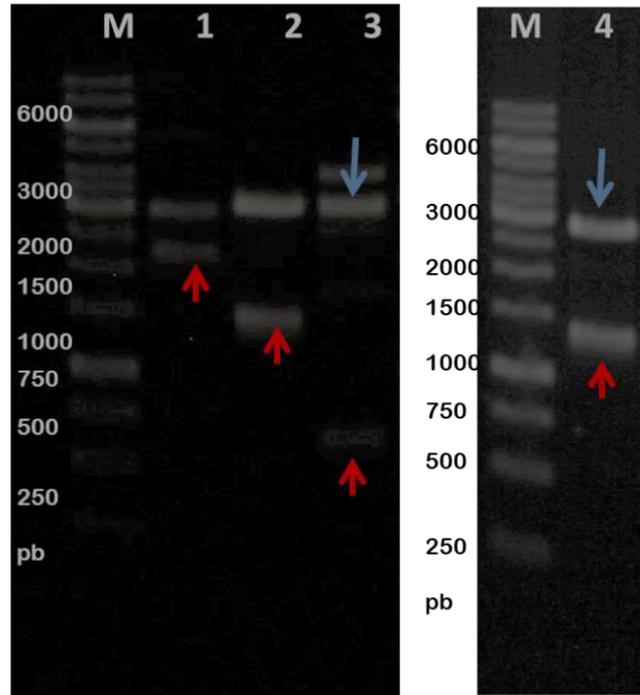


Figura 8. Digestión de las construcciones pJET1.2/blunt-*g6pd*::*6pgl*, pJET1.2/blunt-*g6pd*, pJET1.2/blunt-*6pgl* y pJET1.2/blunt-*6pgdh* con las enzimas *NdeI* y *BamHI*. M: Marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb Plus DNA (Thermo Scientific). Carril 1, construcción pJET1.2/blunt-*g6pd*::*6pgl*. Carril 2, construcción pJET1.2/blunt-*g6pd*. Carril 3, construcción pJET1.2/blunt-*6pgl*. Carril 4, construcción con el gen *6pgdh* de *Giardia lamblia*. Las flechas rojas indican el fragmento liberado en cada digestión, las flechas azules indican el plásmido liberado en cada digestión.

Una vez que se corroboró que las construcciones liberaron los fragmentos de tamaño esperado, los fragmentos liberados correspondientes a las regiones individuales *g6pd*, *6pgl* y al gen *6pgdh* se purificaron del gel de agarosa al 1%, y se subclonaron al vector de sobreexpresión pET3a-HisTEVP, y se generaron las construcciones pET3a-HisTEVP-*g6pd*, pET3a-HisTEVP-*6pgl* y pET3a-HisTEVP-*6pgdh*. Posteriormente para verificar la secuencia correcta de los genes clonados en el vector pET-HisTEVP, las construcciones se secuenciaron en el IBT-UNAM las secuencias obtenidas se analizaron con el programa EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). La Figura 9A muestra el electroferograma del plásmido pET3a-HisTEVP-*g6pd*, donde se observa el codón de inicio de la traducción del gen (subrayado en color rojo) y parte de la secuencia del gen la cual corresponde al 100% con la secuencia del gen fusionado *g6pd*::*6pgl* en su

región génica *g6pd*. En la Figura 9B se observa el electroferograma de la secuencia del plásmido pET3a-HisTEVP-*6pgl*; donde se observa el codón de inicio (subrayado en color rojo) y de paro de la traducción de la región *6pgl* (subrayado en color azul) del gen fusionado *g6pd::6pgl* con 100% de similitud. El gen *6pgdh* se evaluó por secuenciación en el IBT-UNAM, a partir de la construcción pJET1.2/blunt-*6pgdh*, el resultado obtenido se muestra en la Figura 9C, el electroferograma muestra el codón de inicio, el codón de paro, y se observó un 100% de similitud con gen *6pgdh* de *G. lamblia* (clave de acceso GL50803_14759).

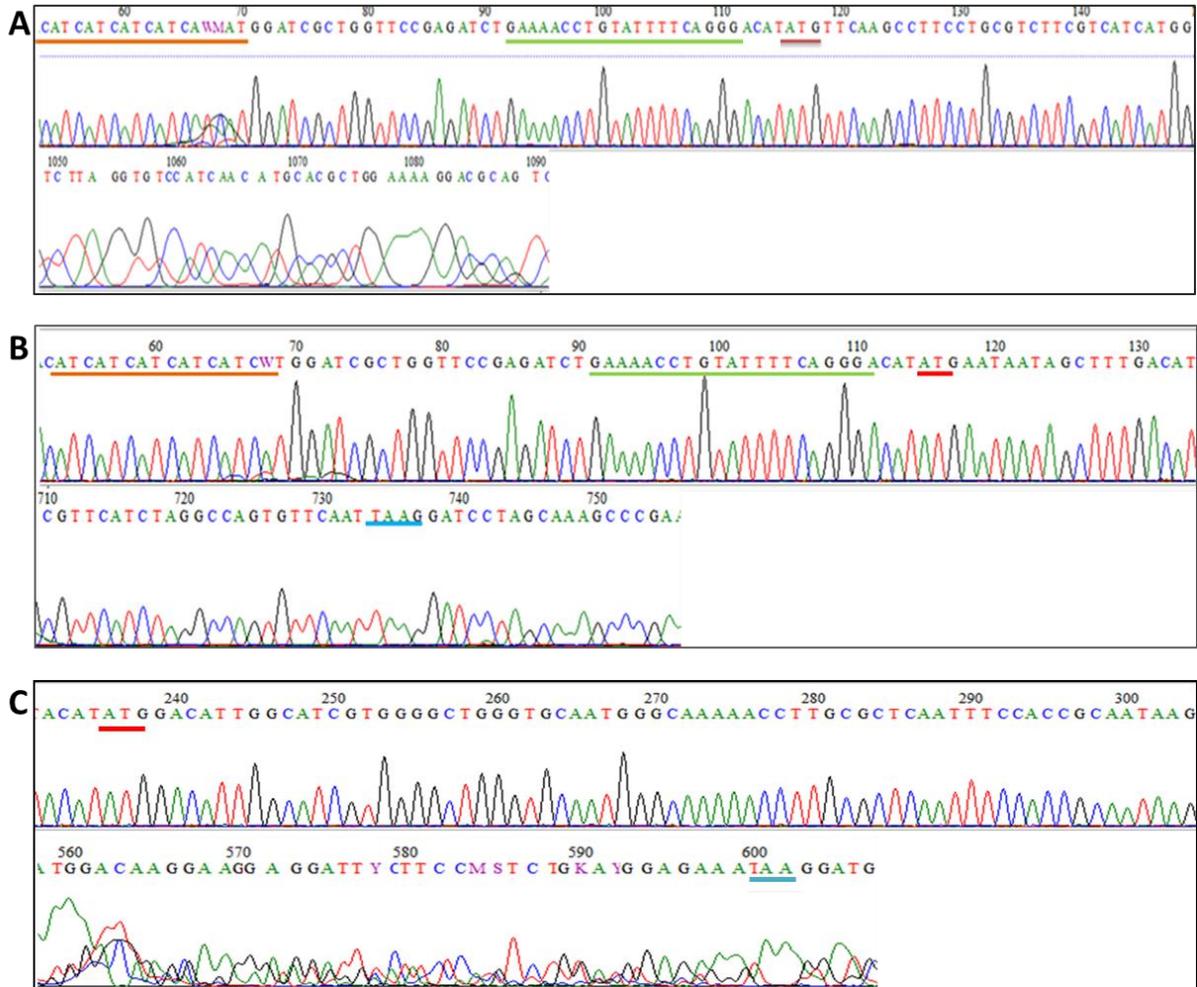


Figura 9. Electroferogramas Sanger obtenidos de la secuenciación de las construcciones pET3a-HisTEVP-*g6pd*, pET3a-HisTEVP-*6pgl* y pJET/1.2/blunt-*6pgdh*. **(A)** región individual *g6pd* del gen fusionado *g6pd::6pgl* de *G. lamblia*. **(B)** región individual *6pgl* del gen fusionado *g6pd::6pgl* de *G. lamblia*. **(C)** gen *6pgdh* de *G. lamblia*. En subrayado color naranja se muestra la secuencia correspondiente al plásmido pET3a-HisTEVP que codifica para la etiqueta de 6-histidinas. En subrayado color verde se muestra la secuencia de reconocimiento de la proteasa del virus de tabaco presente en el vector pET3a-HisTEVP. En subrayado en color rojo se indica la secuencia del codón de inicio de la traducción de cada uno de los genes, y por último subrayado en color azul se muestra el codón de paro de la traducción de cada uno de los genes.

8.3. Purificación de la proteína fusionada G6PD::6PGL y los dominios individuales G6PD, 6PGL

8.3.1. Purificación de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *Giardia lamblia*

La enzima fusionada G6PD::6PGL se purificó para evaluar sus parámetros cinéticos de los dos dominios (G6PD y 6PGL) presentes en la proteína y evaluar el producto final de la reacción enzimática. La enzima fue purificada por el método de IMAC y su integridad y el grado de pureza se evaluaron por medio de geles SDS-PAGE al 12%. Como se muestra en la Figura 10, se observa una sola banda con una masa molecular relativa de 83 kDa, que corresponde al peso molecular esperado para la enzima fusionada (Figura 10, carriles 2 y 3). En la tabla 3, se muestra la tabla de la purificación, con una cantidad total de proteína de 2.8 mg, con una actividad específica de $11.5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, y un rendimiento de purificación de 11%.

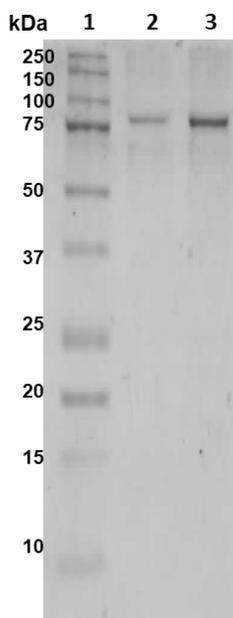


Figura 10. Gel SDS-PAGE al 12% de la enzima fusionada G6PD::6PGL purificada. Carril 1: Marcador de masa molecular Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Biorad, Hercules, CA, USA). Carril 2, 10 μg de enzima G6PD::6PGL pura. Carril 3, 20 μg de enzima G6PD::6PGL pura. El gel fue teñido con azul de Coomassie coloidal.

Tabla 3. Tabla de Purificación de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *Giardia lamblia*.

Pasos de purificación	Proteína total (mg)	Actividad específica $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	Actividad total (IU)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	432.6	0.68	297.38	100
Profinity IMAC	2.8	11.51	32.22	11

8.3.2. Purificación de la región individual G6PD de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *Giardia lamblia*

Para determinar los parámetros cinéticos del dominio individual de la G6PD de la enzima fusionada G6PD::6PGL, se purificó a la proteína mediante cromatografía de intercambio aniónico y por afinidad a NADP⁺. Como se observa en la Figura 11, el gel SDS-PAGE al 12% mostró una banda predominante con una masa molecular relativa de 56 kDa con un grado de pureza de aproximadamente 85%. La tabla 4 se muestra los pasos de purificación, donde se obtuvieron 0.8 mg totales de G6PD purificada y un rendimiento de 0.9%. Además se determinó la actividad específica, la cual fue de 0.121 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Estos resultados nos indican que la purificación del dominio individual G6PD de la enzima fusionada G6PD::6PGL presentó un rendimiento 10 veces menor con respecto a la enzima fusionada G6PD::6PGL el cual fue del 11% (Morales-Luna *et al.*, 2018). Además se observó que la actividad específica determinada para el dominio G6PD individual fue 95 veces menor con respecto a la del dominio G6PD calculado en la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia* (11.51 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) (Morales-Luna *et al.*, 2018). El bajo rendimiento así como la baja actividad específica de la región individual de G6PD, proveniente de la enzima fusionada G6PD::6PGL, nos sugiere que probablemente cuando esta se encuentra de manera individual no adquiere su plegamiento correcto para que sea catalíticamente eficiente como se observa en la enzima fusionada G6PD::6PGL.

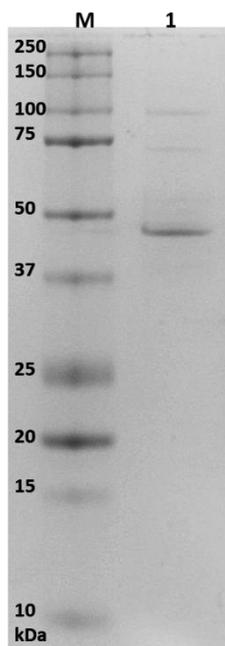


Figura 11. Purificación del dominio individual G6PD de la proteína fusionada G6PD::6PGL de *Giardia lamblia*. Gel SDS-PAGE al 12% del dominio individual G6PD purificado. Carril M, Marcador de masa molecular Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Biorad, Hercules, CA, USA). Carril 1, 10 μg del dominio individual de G6PD pura. El gel fue teñido con azul de Coomassie coloidal. El gel es representativo de tres experimentos individuales.

Tabla 4. Tabla de purificación del dominio individual G6PD de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *Giardia lamblia*.

Pasos de purificación	Proteína total (mg)	Actividad específica $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	Actividad total (IU)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	1638.0	0.00071	1.170	100.0
Q Sepharosa	386.4	0.00072	0.279	23.9
2'5 ADP	0.87	0.1217	0.010	0.9

8.3.2.1. Caracterización cinética del dominio individual G6PD de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *Giardia lamblia*

Se determinó la eficiencia catalítica del dominio individual G6PD de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia* y se comparó con los parámetros cinéticos obtenidos para el dominio G6PD en la enzima fusionada G6PD::6PGL. La Figura 12 muestra la curva de saturación obtenida para los sustratos G6P y NADP⁺ (Figura 12A, y 12B, respectivamente), en las que se observa que la enzima presenta un comportamiento de tipo Michaelis–Menten para ambos sustratos. Una vez obtenido las curvas de saturación con las velocidades iniciales se calcularon los parámetros cinéticos para la región de la G6PD y se compararon con los previamente reportados para la enzima fusionada G6PD::6PGL. Además es importante mencionar que para lograr las curvas de saturación de ambos sustratos fue necesario emplear 3 veces mayor concentración de proteína (3 µg totales) con respecto a lo usado en las curvas de saturación para la enzima G6PD::6PGL fusionada.

Los parámetros cinéticos de estado estacionario se obtuvieron a partir de las gráficas de saturación ajustando las velocidades iniciales a la ecuación de Michaelis–Menten (Tabla 5). Los valores de K_m para la enzima fusionada fueron para el sustrato G6P = 18.1 µM y para el sustrato NADP⁺ = 13.9 µM (Figura 12 A y B); mientras que para para el dominio individual G6PD se determinó el valor de K_m para el G6P= 94.25 µM y para el NADP⁺ = 26.76 µM (Figura 12 C y D). Estos valores determinados fueron 5 veces mayor para la afinidad al sustrato G6P; mientras que la afinidad para el sustrato NADP⁺ se incrementó 2 veces con respecto a la afinidad obtenida para los sustratos fisiológicos para la enzima fusionada G6PD::6PGL. Estos resultados nos sugieren que hay una pérdida de afinidad para ambos sustratos cuando está presente solo la región individual G6PD; por lo que probablemente la región individual G6PD al no contar con la región 6PGL en su estructura nativa sufra cambios estructurales que no le permitan unir adecuadamente sus sustratos fisiológicos G6P y NADP⁺ lo cual se ve reflejado en pérdida en la afinidad. Respecto al valor de k_{cat} se obtuvo un valor de 0.057 s⁻¹ el cual comparado con la k_{cat} reportada de la enzima fusionada G6PD::6PGL (31.84 s⁻¹), es posible observar que hay una disminución de 550 veces en la catálisis de la enzima individual (región G6PD) con respecto a la fusionada G6PD::6PGL, lo cual nos podría estar indicando la importancia de la fusión con la región 6PGL para realizar la catálisis más eficiente.

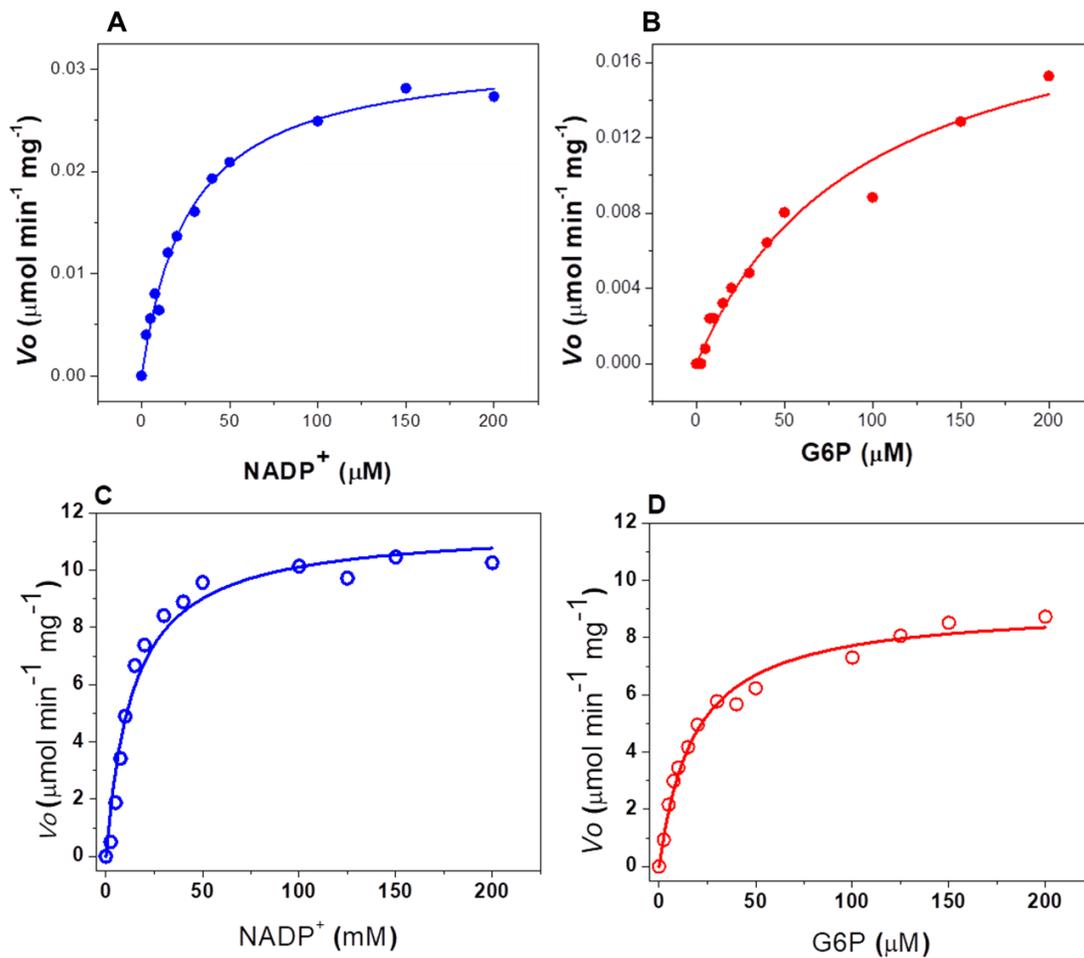


Figura 12. Curvas de saturación de la región individual G6PD para los sustratos. (A) G6P y (B) NADP^+ del dominio individual G6PD, (C) G6P y (D) NADP^+ de la enzima fusionado G6PD::6PGL. Los datos de velocidades iniciales fueron obtenidos variando la concentración de un sustrato indicado en el eje de abscisas mientras que el segundo sustrato fue fijado a una concentración de saturación. El ensayo fue realizado por triplicado de muestras independientes con variabilidad de ± 0.5 .

Tabla 5. Comparación de los parámetros cinéticos de la enzima fusionada G6PD::6PGL y el dominio individual G6PD.

Parámetros cinéticos	G6PD::6PGL	G6PD
K_m G6P (μM)	18.1	94.25
K_m NADP ⁺ (μM)	13.9	26.76
V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ mg}^{-1}$)	11.51	0.0318
K_{cat} (s^{-1})	31.84	0.057

8.3.3. Purificación de la región individual 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *Giardia lamblia*

Para determinar los parámetros cinéticos del dominio individual 6PGL, se purificó a la enzima mediante el método IMAC. Como se observa en el gel SDS-PAGE al 12% (Figura 13, carril 2) no se logró purificar al dominio individual de la 6PGL debido a que se observan una gran cantidad de bandas. Además, de que la actividad enzimática para este dominio individual no pudo ser detectada como sí ocurrió con el dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia*.

Con base en los resultados previamente obtenidos en el dominio individual de la región G6PD, consideramos que probablemente la región 6PGL no se pudo purificar debido que al estar en ausencia del dominio G6PD no logre adoptar su conformación nativa, lo cual se pudo observar en el gel SDS de la purificación de la enzima donde en el extracto crudo no es posible observar una banda que indique la sobreexpresión de la enzima en la masa molecular correspondiente a la proteína (figura 13, línea 5), por lo que inferimos que la enzima no se sobreexpreso. Es importante mencionar que previamente nuestro grupo de trabajo, realizó una dinámica molecular de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia* y observó que cuando se agregó el cofactor NADP⁺ a dicha dinámica, la enzima fusionada se estabilizó y en general las fluctuaciones o zonas desordenadas disminuyeron, este trabajo nos permitió sugerir que al estar en presencia del cofactor se genera mayor estabilidad, particularmente en el dominio 6PGL, aun sin importar que el sitio NADP⁺ estructural se encuentra presente en el dominio G6PD de la enzima fusionada (Morales-Luna *et al.*, 2020).

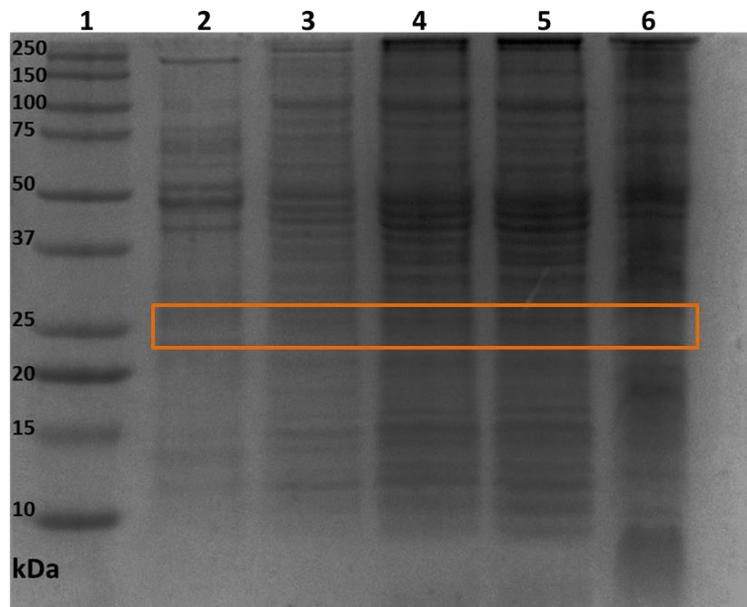


Figura 13. Purificación del dominio individual 6PGL de la proteína fusionada G6PD::6PGL de *Giardia lamblia*. Gel SDS-PAGE al 12 del dominio individual 6PGL purificada. Carril 1: Marcador de masa molecular Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Biorad, Hercules, CA, USA). Carril 2, 20 µg de la proteína de la región 6PGL pura. Carril 3, 20 µg de fracción lavado. Carril 4, 20 µg de fracción de purificación lo que paso por la columna. Carril 5, 20 µg de extracto crudo. Carril 6, 20 µg de membrana. En color naranja se muestra la banda correspondiente a la región 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL. El gel fue teñido con azul de Coomassie coloidal. El gel es representativo de tres experimentos individuales.

8.3.3.1. Purificación de la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) de *Giardia lamblia*

Para medir la actividad enzimática del dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL fue necesario realizar un ensayo acoplado utilizando a la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) como enzima reportera. Para lo cual se purificó la enzima 6PGDH y se utilizó en la determinación de los parámetros cinéticos del dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL. La 6PGDH se purificó mediante IMAC. La Figura 14A muestra el perfil de actividad obtenido de las fracciones eluídas de la resina Profinity IMAC; donde se empleó el producto de la reacción enzimática de la proteína fusionada G6PD::6PGL como sustrato y las fracciones que presentaron actividad (10-21), fueron analizadas en un gel SDS-PAGE al 12%. En la Figura 14B, se observa una banda cercana a

los 54 kDa en todas las fracciones la cual corresponde a la masa molecular relativa esperada para la enzima 6PGDH. Posteriormente se seleccionaron las fracciones 16-21, debido a que fueron las fracciones donde la enzima se encontraba con mayor grado de pureza.

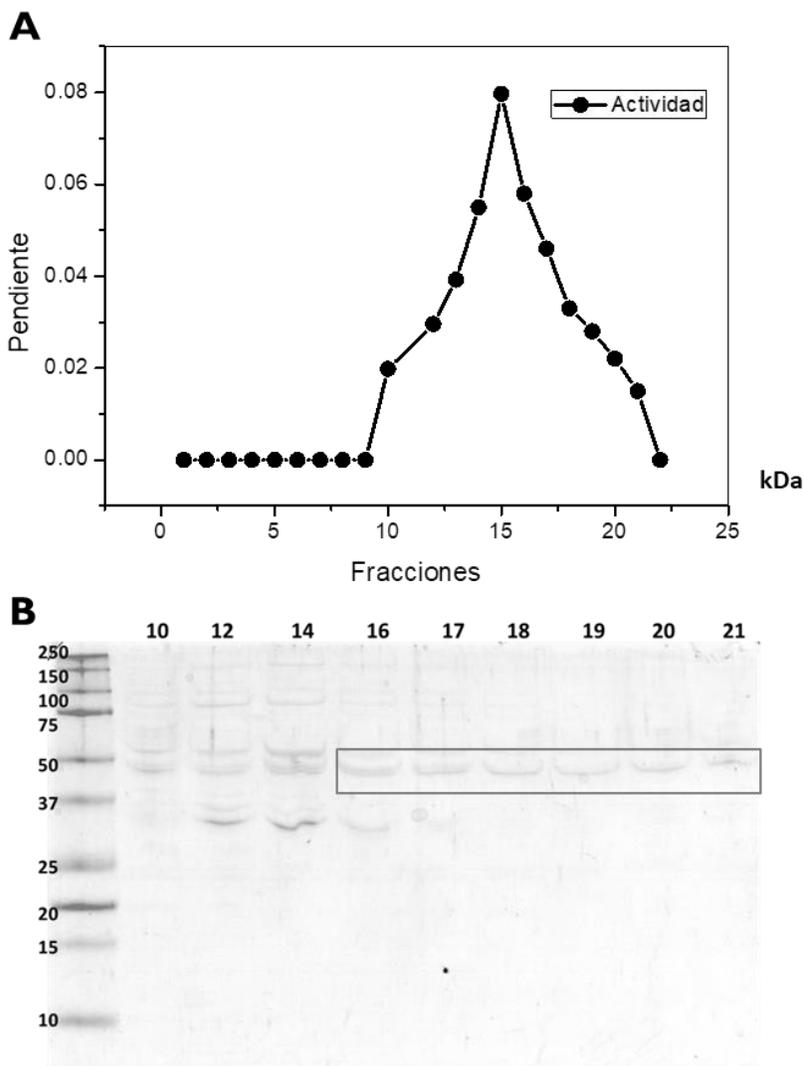


Figura 14. Purificación de la enzima 6PGDH de *G. lamblia*. **(A)** Actividad de 6PGDH de las fracciones eluídas de la columna 2'5 ADP. **(B)** Gel SDS-PAGE 12% donde se analizaron las fracciones que mostraron actividad enzimática de 6PGDH. En recuadro rojo se muestra la banda correspondiente a la enzima 6PGDH. La numeración superior en cada carril indica la fracción de actividad correspondiente. El gel es representativo de tres experimentos individuales.

8.3.3.2. Caracterización cinética del dominio 6PGL de la enzima fusionada

G6PD::6PGL de *Giardia lamblia*

Como se mencionó previamente, dado que no fue posible determinar la actividad enzimática de la región individual 6PGL de la proteína fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia*, y tampoco se obtuvieron los parámetros cinéticos para dicha región; se optó por utilizar un ensayo acoplado empleando a la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), como enzima reportera. Para el ensayo acoplado se utilizó como sustrato el producto de la reacción enzimática de la proteína G6PD de *Gluconacetobacter diazotrophicus* lo cual nos aseguró que en la reacción únicamente se encontrara el producto de la enzima, la 6-fosfoglucono- δ -lactona. Los parámetros cinéticos en el estado estacionario para el dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL se obtuvieron a partir de la gráfica de saturación ajustando las velocidades iniciales a la ecuación de Michaelis–Menten (Figura 15). Para el dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL se obtuvieron valores de K_m de 51.53 μM para el sustrato 6-fosfoglucono- δ -lactona, la V_{max} fue de 14.11 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ y la k_{cat} calculada fue de 31.8 s^{-1} (Tabla 6). Es importante notar que tanto en el dominio G6PD y 6PGL de la enzima fusionada se obtuvieron las mismas velocidades máximas y constantes catalíticas ($k_{\text{cat}} = 31.8 \text{ s}^{-1}$) lo cual nos podría indicar que ambas dominios trabajan en armonía estequiométrica cuando se encuentran fusionados como complejo G6PD::6PGL.

Debido a que la región 6PGL no se pudo purificar por su probable pérdida de estabilidad, no fue posible comparar los parámetros catalíticos como la K_m y la k_{cat} de la región individual 6PGL con respecto a los parámetros catalíticos obtenidos en el dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL. Estos resultados nuevamente están en concordancia con lo previamente reportado por Morales-Luna *et al.* (2020) donde observaron que la región G6PD confería estabilidad estructural a la región 6PGL mediante la unión de la molécula NADP^+ en el sitio NADP^+ estructural.

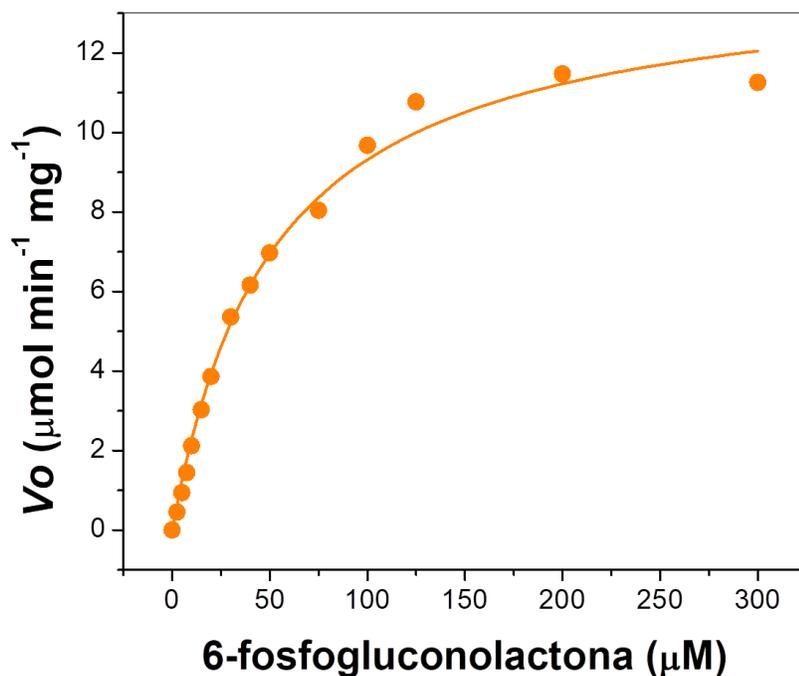


Figura 15. Curva de saturación del dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL. Los datos de velocidades iniciales fueron obtenidos variando la concentración del sustrato 6-fosfoglucono- δ -lactona indicado en el eje de abscisas. El ensayo fue realizado por triplicado de muestras independientes.

Tabla 6. Comparación de los parámetros cinéticos de la enzima fusionada G6PD::6PGL y de los dominios individuales G6PD y 6PGL.

Parámetros cinéticos	G6PD::6PGL		Dominios individuales	
	G6PD	6PGL	G6PD	6PGL
K_m G6P (μM)	18.1	–	94.25	Nd
K_m NADP ⁺ (μM)	13.9	–	26.76	Nd
K_m Lactonasa (μM)	–	51.53	–	Nd
K_{cat} (s^{-1})	31.8	31.8	0.057	Nd

Nd = no determinada

8.4 Análisis de producto de la reacción enzimática de la enzima fusionada

G6PD::6PGL de *Giardia lamblia*

Una enzima bifuncional es definida como una enzima con dos dominios enzimáticos distintos catalíticamente activos.

Con la finalidad de determinar el producto final de la reacción enzimática de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia*, se determinó el producto final de la reacción enzimática por dos métodos diferentes como son: 1) acoplamiento del producto final de la reacción con un método enzimático, y 2) espectrometría de masas MALDI-TOF.

8.4.1. Determinación del producto final de la reacción por método enzimático

En trabajos previamente publicados por nuestro grupo de trabajo no ha sido posible demostrar la actividad del dominio 6-fosfogluconolactonasa (6PGL) presente en la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia*. Por lo tanto, para determinar la actividad enzimática de la región 6PGL se midió la catálisis mediante un ensayo acoplado utilizando a la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) de *G. lamblia* como una enzima reportera.

Como se observa en la Figura 16, cuando el producto final de la catálisis de la enzima fusionada G6PD::6PGL, obtenido bajo condiciones saturantes de ambos sustratos fisiológicos (G6P y NADP⁺), fue incubada con la enzima purificada 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) de *G. lamblia*, se observa un incremento en la absorbancia a 340 nm, lo cual nos indica que la enzima 6PGDH está catalizando y en consecuencia produciendo moléculas de NADPH. Este resultado nos indica que en el producto final de la reacción catalizada por la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia* se encuentra el 6-fosfogluconato, el cual es el sustrato de la enzima 6PGDH.

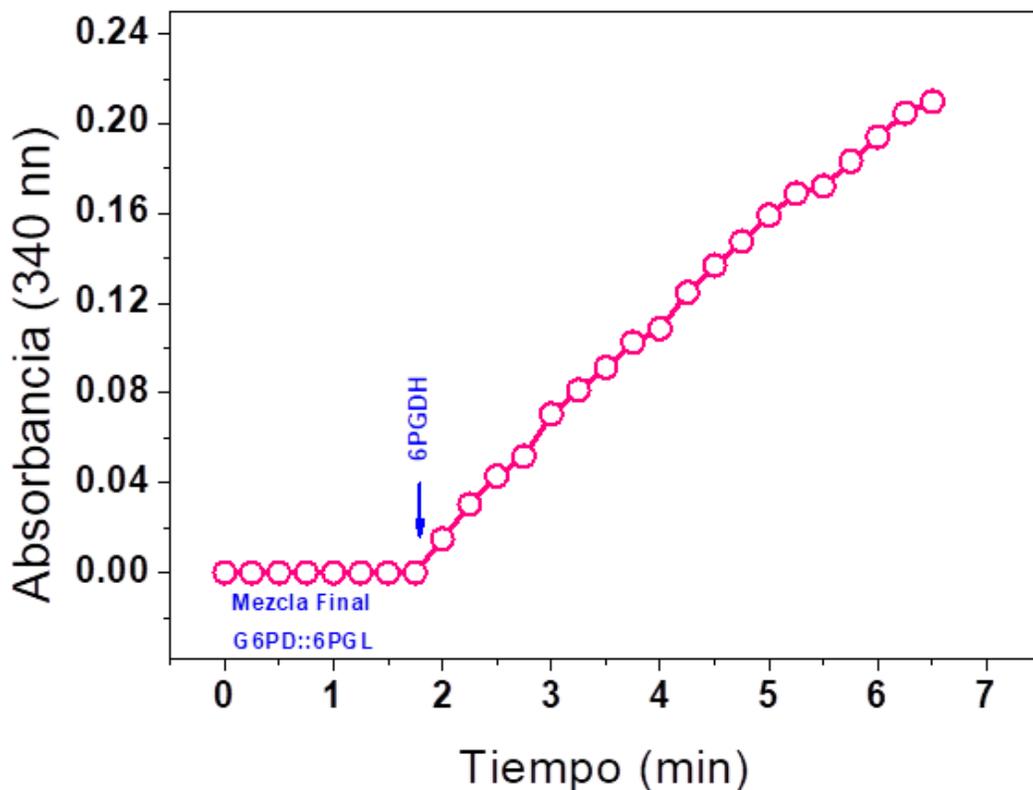


Figura 16. Determinación del producto final de la reacción por método enzimático. La línea roja indica la actividad de la enzima G6PDH de *G. lamblia*. La línea basal indica el producto final de la reacción enzimática de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia* junto con el sustrato NADP⁺. La flecha azul indica la adición de 0.4 mg/mL la enzima 6PGDH pura a la celda de reacción enzimática. El ensayo fue realizado por triplicado de muestras independientes.

Además, se determinó si el dominio 6PGL de la enzima fusionada es capaz de tomar su sustrato fisiológico 6-fosfoglucono- δ -lactona del medio de reacción y realizar su catálisis. Como se observa en la Figura 17, un incremento de absorbividad fue observado cuando la proteína fusionada G6PD::6PGL fue incubada con la mezcla de reacción final obtenida de la enzima G6PD recombinante de la bacteria gran negativa *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Ramírez-Nava *et al.*, 2019). Este resultado nos indica que la enzima fusionada es capaz de tomar el sustrato 6-fosfoglucono- δ -lactona del medio de reacción y producir 6-fosfogluconato (Figura 18).

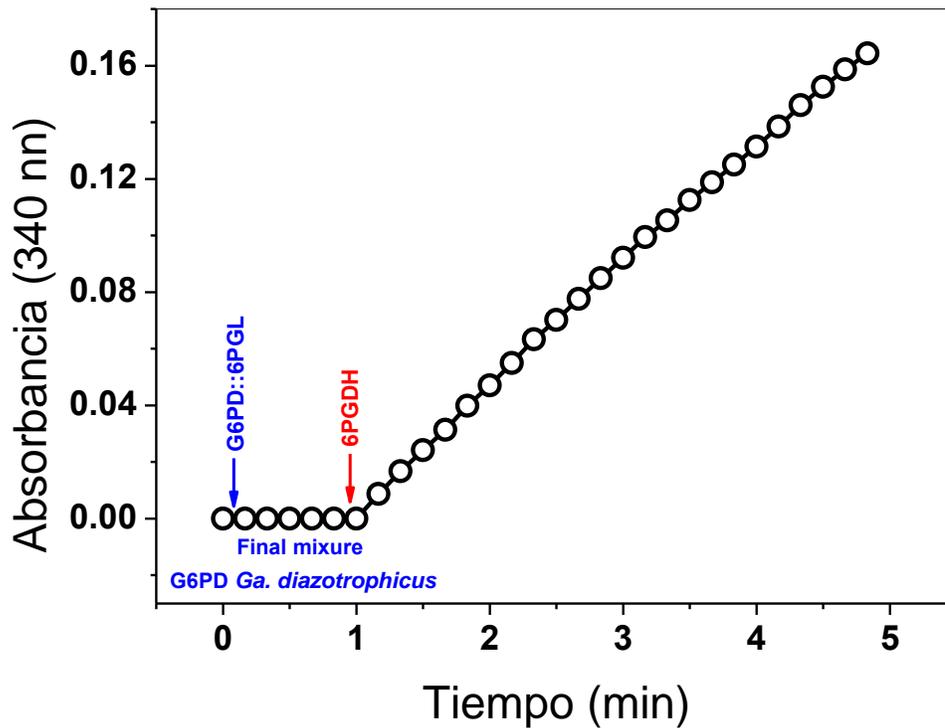


Figura 17. Evaluación del producto final de la reacción enzimática catalizada por la enzima G6PD recombinante de la bacteria gran negativa *Gluconacetobacter diazotrophicus* y acoplada con la enzima fusionada G6PD::6PGL.

Sin embargo, es importante mencionar que hasta este momento no sabemos si también existe la presencia del producto de la reacción catalizada por el dominio G6PD presente en la enzima fusionada G6PD::6PGL, el cual es la 6-fosfoglucono- δ -lactona, o si todas las moléculas de sustrato glucosa-6-fosfato son convertidas a 6-fosfogluconato por la enzima fusionada G6PD::6PGL. Para corroborar la presencia de los metabolitos presentes en la mezcla de reacción de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia*, el producto final de la reacción fue determinado por medio de espectrofotometría de masas MALDI-TOF.

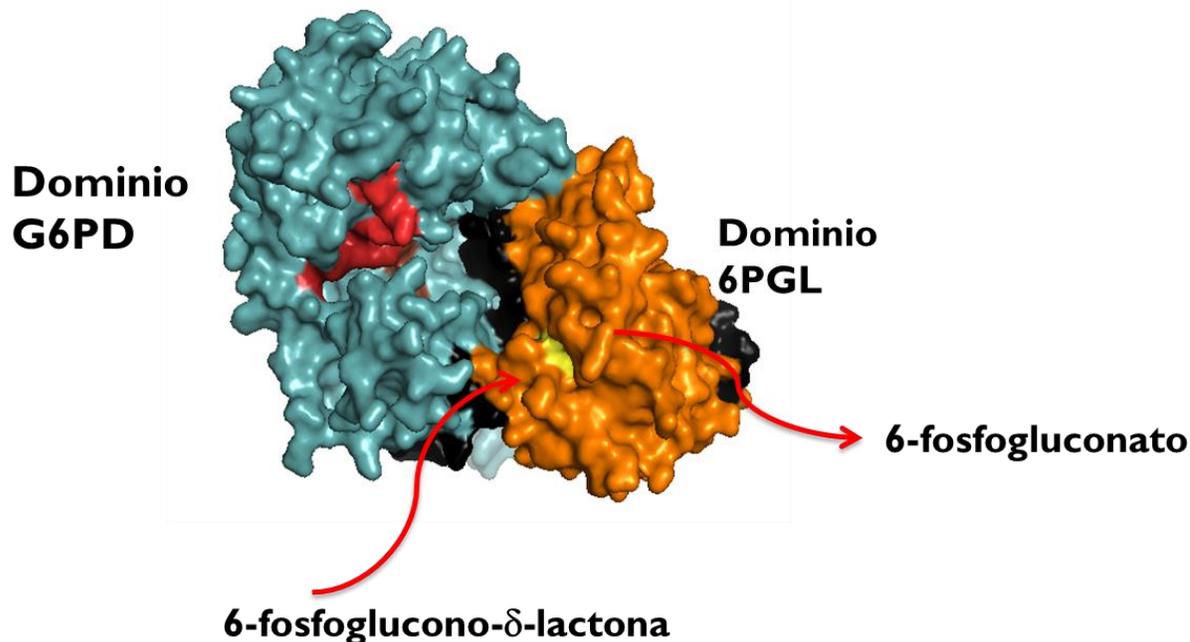


Figura 18. Modelo de acoplamiento de sustratos y productos. El sustrato 6-fofosglucono- δ -lactona es capturado del medio de reacción y la enzima realiza la producción de 6-fofosgluconato en el dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia*. Modelo obtenido del servidor phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>)

8.4.2. Determinación del producto final de la reacción enzimática por espectrofotometría de masas MALDI-TOF

Otro método empleado para determinar el producto final de la reacción enzimática catalizada por la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia* fue por medio de espectrometría de masas; la cual nos permite identificar la masa exacta de los compuestos presentes en una mezcla con base en su relación masa/carga. El producto final de la reacción de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia* se analizó en el equipo Bruker Microflex (MALDI-TOF). Los espectros obtenidos se compararon con los reportados para los sustratos G6P y NADP^+ , así como también con los productos de la reacción los cuales son: 6-fofosglucono- δ -lactona, 6-fofosgluconato y NADPH. En la Tabla 7, muestran los tamaños masa/carga obtenidos para cada uno de los metabolitos de interés.

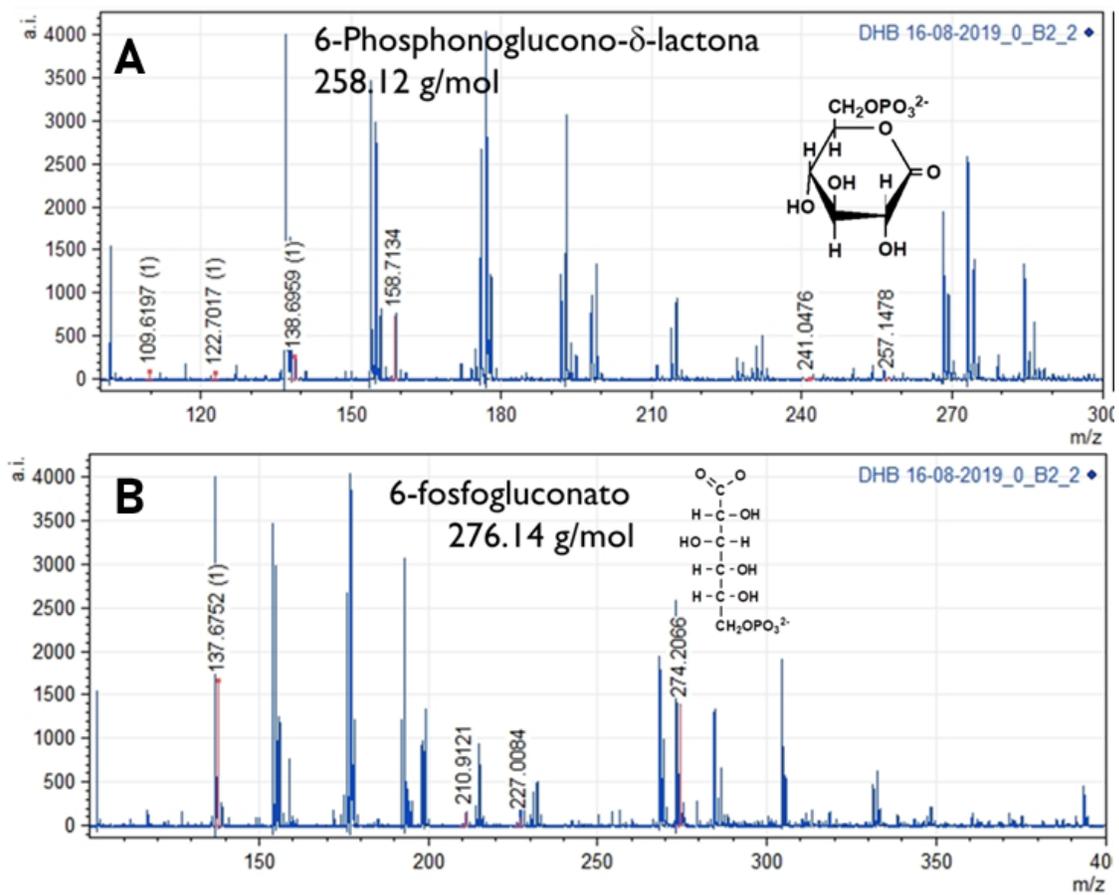
Tabla 7. Espectros esperados y obtenidos mediante MALDI-TOF para la reacción de la enzima G6PD::6PGL de *Giardia lamblia*.

Sustrato/producto	Masas Esperadas	Masas Encontradas
NADP⁺	122, 164, 194, 223, 246, 260, 272, 333, 426, 469, 505, 547, 562, 578, 580, 713, 725.	194, 246 260, 272, 333.
NADPH	123, 158, 166, 195, 257, 272, 287, 335, 415, 426, 471, 505, 520, 592, 728.	158, 166, 272, 287, 335.
G6P	101, 102, 132, 194, 209, 211, 226, 256, 260.	101, 260.
6-Phosphoglucono-δ-lactona	96, 98, 109, 122, 131, 138, 159, 171, 241, 258, 275.	109, 122, 138, 159, 241, 257.
6-fosfogluconato	104, 114, 125, 131, 137, 144, 153, 211, 227, 274.	137, 211, 227, 274.

La Figura 19 que muestra los espectros del producto final de la reacción catalizados por la enzima G6PD::6PGL, se encontraron señales que corresponden a la 6-fosfoglucono- δ -lactona (Figura 19A), así como para el compuesto 6-fosfogluconato, producto del dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL (Figura 19B). Además, se observaron señales que corresponden a las masas moleculares esperadas para el NADPH (Figura 19C) el cual es un producto de la reacción del dominio G6PD. Finalmente, es importante mencionar que también se encontraron señales de masas moleculares que corresponden a los sustratos G6P y NADP⁺ (Figura 19D, 19E), respectivamente los cuales forman parte de la reacción enzimática y que fueron adicionados a la reacción de forma saturante.

Estos resultados nos indican que la presencia de señales de masas de emisión pertenecientes a 6-fosfoglucono- δ -lactona y 6-fosfogluconato es posible dilucidar que ambos dominios G6PD y 6PGL que conforman a la enzima fusionada G6PD::6PGL son activos. El dominio G6PD cataliza a la G6P y los productos de la reacción (6-fosfoglucono- δ -lactona y NADPH) son difundidos al medio y posteriormente el dominio 6PGL reconocería a su sustrato fisiológico 6-fosfoglucono- δ -lactona y lo catalizaría a 6-fosfogluconato, el cual este último es difundido al medio. Además, al identificar el producto 6-fosfoglucono- δ -lactona, es posible inferir que la región catalítica perteneciente a la G6PD no transfiere

directamente el producto de su reacción a la región catalítica 6PGL ya que de producirse la transferencia directa no debería identificarse dicho compuesto y únicamente deberíamos encontrar al 6-fosfogluconato.



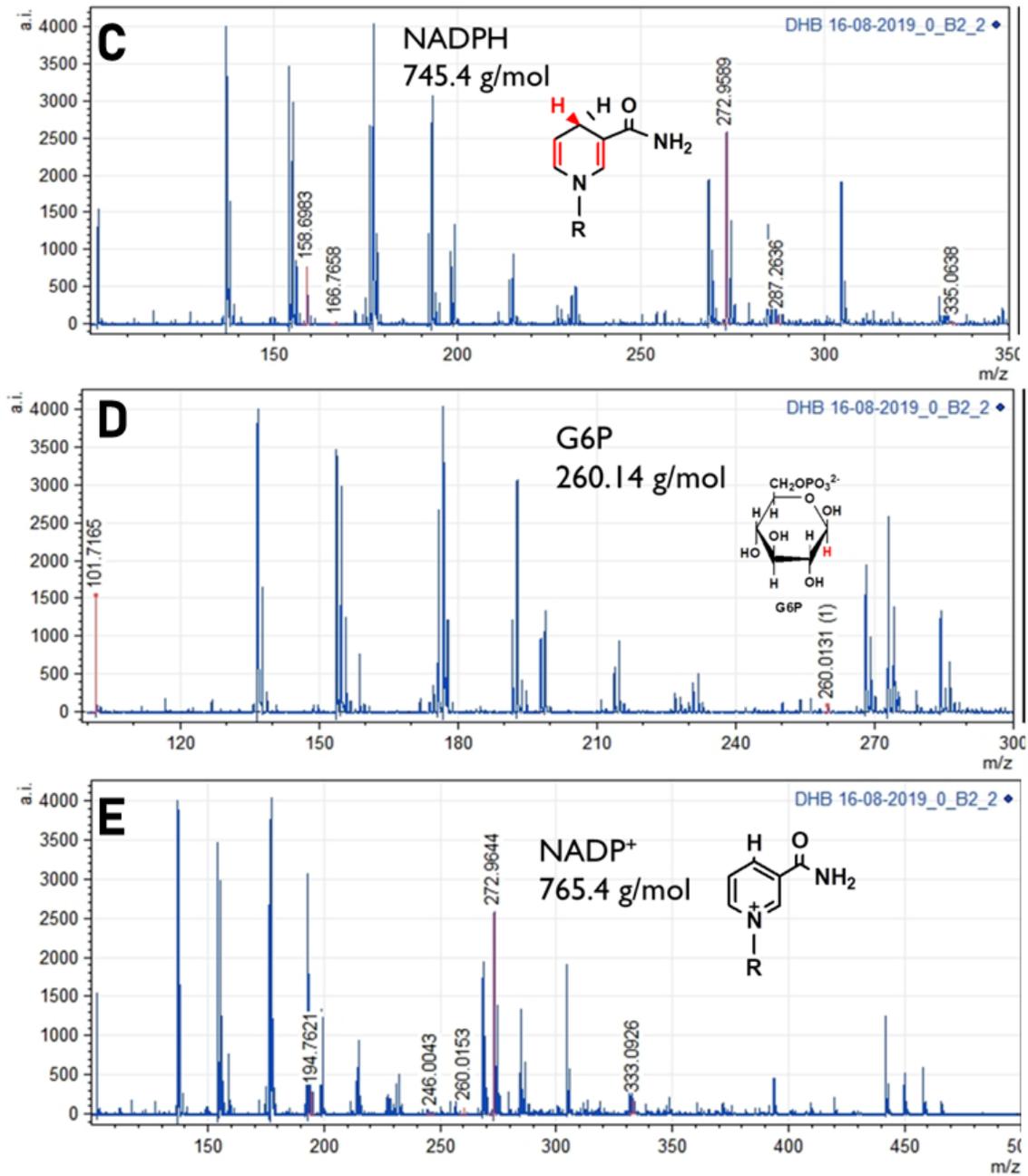


Figura 19. Determinación del producto final de la reacción enzimática por espectrofotometría de masas MALDI-TOF. (A) Señales de presencia de las masas obtenidas correspondientes al producto 6-fosfoglucono- δ -lactona, (B) 6-fosfogluconato, (C) NADPH. (D), y al sustrato G6P, y (E) NADP⁺. El número colocado sobre cada pico corresponde a cada una de las masas correspondiente a los productos y sustratos presentes en la reacción de la enzima G6PD::6PGL de *G. lamblia*. El experimento fue realizado por triplicado.

9. Discusión

La purificación del dominio individual G6PD de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia* fue posible mediante el uso de columnas de intercambio aniónico y de afinidad a nucleótido 2´5ADP; sin embargo el rendimiento final de la purificación fue bajo (0.9%) y obteniendo un total de 0.8 mg/mL de proteína pura a partir de 2 litros de medio de cultivo. Además es importante mencionar que la actividad de la enzima sola fue 500 veces menor ($0.017 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) en comparación de su contraparte fusionada ($11.5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$). Estos resultados sugieren alteración en la estructura en la región individual G6PD que probablemente tenga efecto en un mal plegamiento y baja estabilidad, lo cual no le permite mantenerse estable en todo el proceso de la purificación ver figura 13. La comparación de los parámetros catalíticos de la enzima fusionada G6PD::6PGL y de su dominio individual G6PD mostraron que la proteína denominada como dominio individual G6PD presentó menor actividad catalítica, pérdida de afinidad por sus sustratos fisiológicos G6P y NADP^+ , todo lo anterior con respecto a la enzima fusionada G6PD::6PGL (figura 12). Esta pérdida de afinidad para sus sustratos fisiológicos podría deberse a pérdida en la estabilidad estructural la cual probablemente se deba a que al no contar con la región 6PGL, la región individual G6PD no adopta la conformación nativa necesaria para llevar a cabo la catálisis correcta y eficiente de sus sustratos. Datos similares fueron reportados por para la región individual G6PD de la enzima fusionada de *Plasmodium falciparum* (PfGluPhos) donde el dominio G6PD en la enzima fusionada, presentó mejor afinidad para el sustrato G6P ($19.2 \mu\text{M}$) con respecto a la afinidad de la región individual G6PD purificada ($33.2 \mu\text{M}$) (Jortzik *et al.*, 2011). Sin embargo, fue reportada la misma afinidad para el sustrato NADP^+ en ambas enzimas ($6.5 \mu\text{M}$ y $6.1 \mu\text{M}$, respectivamente). Además, la k_{cat} del dominio G6PD de la enzima fusionada (8.6 s^{-1}), con respecto a la región individual (6.3 s^{-1}), fueron similares; por lo que fue posible determinar que la mejor catálisis de la enzima G6PD se encontraba en estado fusionado por lo que determinaron que la enzima era una enzima bifuncional. Es importante mencionar que este ha sido el único estudio de enzimas bifuncionales G6PD::6PGL que ha reportado la actividad enzimática de la región G6PD y 6PGL de la enzima fusionado (Jortzik *et al.*, 2011); sin embargo otros estudios solo se han limitado a reportar la actividad de la región G6PD, como es el caso de *Plasmodium vivax* (Haeussier *et al.*, 2019) y *Giardia lamblia* (Morales *et al.*, 2018). La enzima G6PD/6PGL de

Plasmodium falciparum presenta la fusión de la región G6PD en la parte carboxilo de la enzima y la región 6PGL en la parte amino de la proteína, a diferencia de la enzima fusionada de *Giardia lamblia* que presenta el dominio G6PD en el N-terminal, y en el C-terminal se encuentra localizado el dominio 6PGL. Es de importancia mencionar que aún son necesario estudios que nos permitan evaluar la estabilidad de la enzima G6PD individual y compararla con la enzima fusionada G6PD::6PGL, esto con la finalidad de poder demostrar que la enzima fusionada presenta mayor estabilidad. También es necesario realizar análisis estructurales que de igual forma nos permitan determinar la estructura de la enzima fusionada y evaluar si se observan cambios en la enzima individual.

Además, en el presente estudio fue posible determinar la actividad catalítica del dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL, donde se determinaron los parámetros catalíticos para el sustrato 6-fosfoglucono- δ -lactona ($K_m = 51.5 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 14.11$). Estos valores difieren de los datos reportados en las enzimas 6PGL de *H. Sapiens* ($K_m = 242 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 1055$), *P. falciparum* ($K_m = 172 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 46.6$), y *Saccharomyces cerevisiae* ($K_m = 43 \mu\text{M}$), por lo que es posible determinar que aun cuando se determinó la actividad en enzimas fusionadas *P. falciparum* y *G. lamblia* muestran parámetros distintos, lo cual podría deberse a los diferentes ambientes que habitan los organismos que poseen las enzimas.

Mediante los resultados obtenidos de la purificación y la caracterización cinética del dominio G6PD de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia*, es posible inferir que la región individual G6PD necesita estar fusionada para realizar su eficiente función catalítica. Además, de que los datos obtenidos mediante el ensayo enzimático acoplado y espectrometría de masas nos indican que el producto final de la enzima fusionada es el 6-fosfoglucono- δ -lactona y el 6-fosfogluconato, por lo que es posible inferir que la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia* es una enzima bifuncional debido a que sus dos dominios presentes en la enzima fusionada son catalíticamente activos.

Así mismo, la presencia del 6-fosfoglucono- δ -lactona y el 6-fosfogluconato en el producto final de la enzima fusionada G6PD::6PGL, nos permiten llegar a proponer el posible mecanismo catalítico de la proteína (Figura 20); el cual podría presentarse como una

primera reacción catalítica por parte del dominio G6PD liberando el producto 6-fosfoglucono- δ -lactona al medio y posteriormente este es captado por el dominio 6PGL, el cual podría ser más favorable a captar su sustrato a diferencia que sí se encontrara más alejado. Quizá esta sería una posible explicación a la cercanía que presentan ambos sitios activos de ambas enzimas pero presentando impedimento espacial que no favorece el paso directo del producto de la enzima G6PD al sitio activo del dominio 6PGL.

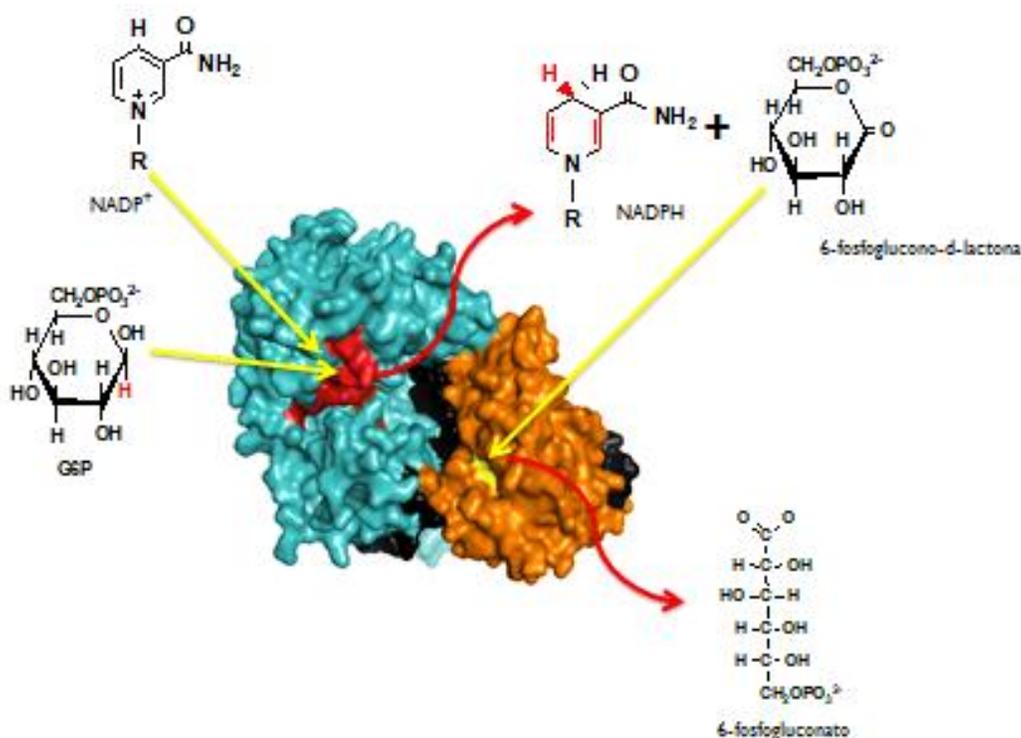


Figura 20. Posible mecanismo enzimático de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *Giardia lamblia*. La región en color azul corresponde al dominio G6PD, la parte negra corresponde al loop existente entre los dos dominios presentes en la enzima fusionada. La región marcada en color naranja corresponde al dominio de la enzima 6PGL. Las flechas amarillas señalando al sitio de entrada de los sustratos G6P y NADP⁺ y su acoplamiento al sitio activo del dominio G6PD marcado en color rojo. Las flechas en color rojo indican la salida del producto 6-fosfoglucono- δ -lactona al medio de reacción, y su entrada al sitio activo del dominio 6PGL marcado en color naranja. Finalmente se indica con una flecha en color rojo la salida del 6-fosfogluconato al medio de reacción. Modelo obtenido del servidor phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>)

10. Conclusiones/ Resumen de resultados y algunas observaciones

En el presente trabajo se determinó la actividad enzimática del dominio 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia*, lo cual no se había podido realizar en trabajos anteriores debido a que no se podía acoplar la enzima 6PGDH de levadura en el presente trabajo fue necesario obtener a la enzima 6PGDH de *G. lamblia* por lo que se amplificó y clonó el gen *6pgdh*, además se sobreexpresó y purificó la enzima 6PGDH de *G. lamblia*. La enzima 6PGDH se utilizó para realizar un ensayo acoplado con el cual fue posible determinar la actividad del dominio 6PGL de la enzima fusionada.

Se clonaron y amplificaron los dominios individuales *g6pd* y *6pgl* del gen fusionado *g6pd::6pgl*, además se purificó la región individual G6PD y se determinaron los parámetros cinéticos los cuales fueron menores que los reportados para la enzima fusionada.

No se logró purificar la región individual de 6PGL de la enzima fusionada G6PD::6PGL, lo cual nos indica que el dominio individual 6PGL es inestable.

Se determinaron los productos de la enzima fusionada, mediante ensayo enzimático acoplado y espectrometría de masas, donde se identificó la presencia de 6-fosfoglucono- δ -lactona, 6-fosfogluconato, y NADPH. Además fue posible dilucidar el posible mecanismo enzimático de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *G. lamblia*.

Mediante el presente proyecto se determinó la bifuncionalidad de la enzima fusionada G6PD::6PGL de *Giardia lamblia*.

Perspectivas del estudio

Se contempla analizar el producto final de la reacción enzimática por resonancia magnética nuclear (RMN).

Se contempla analizar la estructura del dominio individual G6PD mediante fluorescencia intrínseca y extrínseca con la finalidad de comparar su estructura terciaria con la enzima fusionada G6PD::6PGL.

Se contempla analizar la estabilidad del dominio individual G6PD mediante termo inactivación seguida por dicroísmo circular con la finalidad evaluar y comparar su estabilidad con la enzima fusionada G6PD::6PGL.

11. Referencias Bibliográficas

Adam Rodney D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*, *Clinical Microbiology Reviews*, 3(14): 447–475. doi: 10.1128/CMR.14.3.447-475.2001

Sevki Adem, Mehmet Ciftci. (2012). Purification of rat kidney glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, and glutathione reductase enzymes using 2',5-ADP Sepharose 4B affinity in a single chromatography step. *Protein Expression and Purification*, 81(1):1–4. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.031>

Ayene Iramoudi S., Stamato Thomas D., Mauldin Stanley K., Biaglow John E., Tuttle Steven W., Jenkins Susan F., Koch Cameron J. (2002). Mutation in the Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Gene Leads to Inactivation of Ku DNA end binding during Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 9929-9935. doi: 10.1074/jbc.M111366200

Bastidas Gilberto, Pérez Hilda, Vizzi Esmeralda. (2015). Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa: características bioquímicas y moleculares. Prevalencia de la deficiencia. *Archivos de Medicina*, 15(1):138-150.

Berckman Douglas S., Lescano Andres G., Gilman Robert H., Lopez Sonia L., Black Maureen M. (2002), Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *The Lancet* 359(9306):564-571. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07744-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07744-9).

Beutler E., Kuhl W., Gelbart T. (1986). Blood cell phosphogluconolactonase: assay and properties. *British Journal of Haematology*, 62. 577-586.

Bingham Alan K., Meyer Ernest A. (1979). *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions. *Nature*, 277:301–302.

Carter E.R., Nabarro L.E., Hedley L., Chiodini P.L. (2018) Nitroimidazole-refractory giardiasis: a growing problem requiring rational solutions. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(1): 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.05.028>.

Cernikova Lenka, Faso Carmen, Hehl Adrian B. (2018). Five facts about *Giardia lamblia*. *PLOS Pathogens*, 14(9):1-25. doi: 10.1371/journal.ppat.1007250.

Cedillo-Rivera Roberto, Darby Jocelyn M., Enciso-Moreno J. Antonio, Ortega-Pierres Guadalupe, Ey Peter L. (1996). Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in Mexico. *Parasitology Research*, 90, 119–123. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0807-0>

Céu Sousa M., Gonçalves C. A., Bairos V. A., Poiaraes-da-Silva J. (2001). Adherence of *Giardia lamblia* Trophozoites to Int-407 Human Intestinal Cells. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(2):258-265. doi: 10.1128/CDLI.8.2.258-265.2001

Chacón de Alvarez N., Jiménez Carlos J. (2010). Giardiasis como causa de la diarrea del viajero. *Ant e Inf*, 16(14), 15-24.

Chen Jin-Wen, Dodia Chandra, Feinstein Sheldon I., Jain Mahendra K., Fisher Aron B.(2000) 1-Cys Peroxiredoxin, a Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A2 Activities. *Applied and environmental microbiology*, 66(6)-2484-2490.

Clarke Julia L., Scorpes Deborah A., Olugbemiro Sodeinde, Mason Phillip J., (2001). Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase A novel bifunctional enzyme in malaria parasite. *European Journal of Biochemistry*, 268:2103-2019. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02078.x>.

Duffieux Francis, Van Roy J., Michels Paul A., Opperdoes Fred R. (2000). Molecular Characterization of the First Two Enzymes of the Pentose-phosphate Pathway of *Trypanosoma brucei*-Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconolactonase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 27559-27565.

Escobedo Angel A., Almirall Pedro, Alfonso Maydel, Jones Jony, Avila Ivonne, Salazar Yohana, Del Sol Yaremis, Duenas Nancy. (2017). Pediatric Giardiasis: Recent Advances in Therapeutic Management. *J Infect Dis Diagn*, 2(2), 1-5. doi:10.4172/2576-389X.1000118

Esch Kevin J., Petersen Christine A. (2013). Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 58-85. doi: 10.1128/CMR.00067-12.

Fonseca Dora, Mateus Heidi, Silva Claudia, Contreras Nora, Restrepo Carlos. (2005). Deficiency of glucose 6-phosphate dehydrogenase General aspects of the world's most frequent erithroenzimopathy. *Acta Med Colomb*, 30(2), 59-64.

Gómez-Manzo S., Escamilla José E., González-Valdez A., López-Velázquez G., Vanoye-Carlo A., Marcial-Quino J., de la Mora-de la Mora I., Garcia-Torres I., Enríquez-Flores S., Contreras-Zentella M., Arreguín-Espinosa R., Kroneck Peter M., Sosa-Torres M. (2015) The Oxidative Fermentation of Ethanol in *Gluconacetobacter diazotrophicus* Is a Two-Step Pathway Catalyzed by a Single Enzyme: Alcohol-Aldehyde Dehydrogenase (ADHa). *Int. J. Mol. Sci.*, 16(1), 1293-1311. <https://doi.org/10.3390/ijms16011293>

Gómez-Manzo S., Terrón-Hernández J., De la Mora-De la Mora, I., González-Valdez A., Marcial-Quino J., García-Torres I., Vanoye-Carlo A., López-Velázquez, G., Hernández-Alcántara G., Oria-Hernández J., Reyes-Vivas H., Enríquez-Flores S. (2014). The Stability of G6PD Is Affected by Mutations with Different Clinical Phenotypes. *Int. J. Mol. Sci.*, 15(11), 21179-21201. <https://doi.org/10.3390/ijms151121179>

Gómez-Manzo S., Marcial-Quino J., Vanoye-Carlo A., Enríquez-Flores S., De la Mora-De la Mora I., González-Valdez A., García-Torres I., Martínez-Rosas V., Sierra-Palacios E., Lazcano-Pérez F., Rodríguez-Bustamante E., Arreguin-Espinosa R. (2015). Mutations of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Durham, Santa-Maria and A+ Variants Are Associated with Loss Functional and Structural Stability of the Protein. *Int. J. Mol. Sci.*, 16(12), 28657-28668. <https://doi.org/10.3390/ijms161226124>

Gómez-Manzo S., Marcial-Quino J., Vanoye-Carlo A., Serrano-Posada H., Ortega-Cuellar D., González-Valdez A., Castillo-Rodríguez R., Hernández-Ochoa B., Sierra-Palacios E., Rodríguez-Bustamante E., Arreguin-Espinosa R. (2016). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and Analysis of New Mutations around the World. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(12), 2069. <https://doi.org/10.3390/ijms17122069>

Gómez-Manzo S., Marcial-Quino J., Ortega-Cuellar D., Serrano-Posada H., González-Valdez A., Vanoye-Carlo A., Hernández-Ochoa B., Sierra-Palacios E., Castillo-Villanueva A., Reyes-Vivas H. (2017) Functional and Biochemical Analysis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Variants: Elucidating the Molecular Basis of G6PD Deficiency. *Catalysts*, 7(5), 135. <https://doi.org/10.3390/catal7050135>

Igoillo-Esteve M., Cazzulo Juan J. (2006). The glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Its role in the defense of the parasite against oxidative stress. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 149(2), 170-181. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.05.009>

Jortzik Esther, Mailu Boniface M., Preuss Janina, Fischer Marina, Bode Lars, Rahlfs Stefan, Becker Katja. (2011). Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase: a unique bifunctional enzyme from *Plasmodium falciparum*. *Biochem J.*, 436(3): 641-650. <https://doi.org/10.1042/BJ20110170>

Kirkman Henry N., Hendrickson Elizabeth M., (1962) Glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. II. Subactive states of the enzyme form normal persons. *J Biol Chem*, 237(7), 2371-2376.

Leitsch David, Schlosser Sarah, Burgess Anita, Duchêne Michael. (2012). Nitroimidazole drugs vary in their mode of action in the human parasite *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 166-170

Liu Leo X., Weller Peter F. (1996). Antiparasitic Drugs. *The New England Journal of Medicine*. 334(18), 1178-1184. doi: 10.1056/NEJM199605023341808

McCormick Benjamin J. (2014) Frequent symptomatic or asymptomatic infections may have long-term consequences on growth and cognitive development. *Old Herborn University Foundation, Herborn-Dill, Germany*, 27, 23-39.

Morales-Luna L., Serrano-Posada H., González-Valdez A., Ortega-Cuellar D., Vanoye-Carlo A., Hernández-Ochoa B., Sierra-Palacios E., Rufino-González Y., Castillo-Rodríguez R., Pérez de la Cruz V.; Moreno-Vargas L., Prada-Gracia D., Marcial-Quino J., Gómez-Manzo S. (2018). Biochemical Characterization and Structural Modeling of Fused Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase-Phosphogluconolactonase from *Giardia lamblia*. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(9), 2518. <https://doi.org/10.3390/ijms19092518>

Morales-Luna L., González-Valdez A., Sixto-López Y., Correa-Basurto J., Hernández-Ochoa B., Cárdenas-Rodríguez N., Castillo-Rodríguez R., Ortega-Cuellar D., Roberto Arreguin-Espinosa, Pérez de la Cruz V., Serrano-Posada H., Centeno-Leija S., Rocha-Ramírez L., Sierra-Palacios E., Montiel-González A., Rufino-González Y., Marcial-Quino J., Gómez-Manzo S. (2020). Identification of the NADP⁺ Structural Binding Site and Coenzyme Effect on the Fused G6PD::6PGL Protein from *Giardia lamblia*. *Biomolecules*, 10(46), 1-18. doi:10.3390/biom10010046

Morrison Hilary G., McArthur Andrew G., Gillin Frances D., Aley Stephen B., Adam Rodney D., Olsen Gary J, Best Aaron A., Cande W. Zacheus, Chen Feng, Cipriano Michael J., David's Barbara J., Dawson Scott C., Elmendorf Heidi G., Hehl Adrian B., Holder Michael E., Huse Susan M., Kim Ulandt U., Lasek-Nesselquist Erica, Manning Gerard, Nigam Anuranjini, Nixon Julie E. J., Palm Daniel, Passamaneck Nora E., Prabhu Anjali, Reich Claudia I., Reiner David S., Samuelson John, Svard Staffan G., Sogin Mitchell L. (2007). Genomic Minimalism in the Early Diverging an Intestinal Parasite *Giardia lamblia*, USA, *Science*, 317 (5846), 1921-1926. doi: 10.1126/science.1143837

Nash Theodore E., Ohl Christopher A., Thomas Elaine, Subramanian Gangadnaran, Keiser Paul, Moore Thomas A. (2001), Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clinical Infectious Diseases*, 33(1), 22-28. <https://doi.org/10.1086/320886>

Naylor Claire E., Gover Sheila, Basak Ajit K., Cosgrove Michael S., Levy H. Richard, Adams Margaret J. (2001). NADP⁺ and NAD⁺ binding to the dual coenzyme specific enzyme *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase: different interdomain hinge angles are seen in different binary and ternary complexes. *Biological Crystallography*, D57, 638-648. <https://doi.org/10.1107/S0907444901003420>

Quihui Luis, Morales Gloria G., Méndez Rosa O., Leyva Johanna G., Esparza Julián, Valencia Mauro E. (2010). Could giardiasis be a risk factor for low zinc status in schoolchildren from northwestern Mexico? A cross sectional study with longitudinal follow-up. *BMC Public Health*. 10(85), 1-7.

Rivera María, de la Parte María A., Hurtado Pilar, Magaldi Luis, Collazo María. (2002). Giardiasis intestinal. Mini-Revision, *Invest Clin*, 43(2):119-128. ISSN 0535-5133

Rowland Paul, Basak Ajit K., Gover Sheila, Levy Richard H., Adams Margaret J. (1994). The three-dimensional structure of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2.0 Å resolution. *Structure*, 2(11), 1073-1087. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(94\)00110-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(94)00110-3)

Soriano Alcaraz M. (2002). Giardia y Giardiosis. *Control Calidad SEIMC*, 1-9.

Scott Kevin G., Yu Linda C., Buret André G. (2004). Role of CD8+ and CD4+ T Lymphocytes in Jejunal Mucosal Injury during Murine Giardiasis. *Infection and Immunity*, 72(6), 3536–3542. doi: 10.1128/IAI.72.6.3536–3542.2004

Stover Nicholas A., Dixon Thomas A, Cavalcanti Andre R. (2011). Multiple Independent Fusions of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase with Enzymes in the Pentose Phosphate Pathway. *PLoS ONE* 6(8), e22269. doi:10.1371/journal.pone.0022269

Stincone A., Prigione A., Cramer T., Wamelink M.M., Campbell K., Cheung E., Olin-Sandoval V., Grüning N., Krüger A., Tauqeer Alam M., (2015), The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 927-963. <https://doi.org/10.1111/brv.12140>

Thompson Andrew R. (2000), Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 30(12), 1259-1267. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00127-2)

Torres Lindarte G., Zapata Tamayo M., Restrepo Isaza M., Ríos Osorio L. (2011). Investigación científica sobre genotipificación y distribución de Giardia intestinalis en humanos y caninos de América. *Salud Uninorte*, 27(1), 49-62. ISSN: 0120-5552

Tian L., Dixon A. R. (2006) Engineering isoflavone metabolism with an artificial bifunctional enzyme. *Planta*, 224: 496–507.

Vázquez Tsuji O., Campos Rivera T. (2007). Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial, *Revista del Centro de Investigación. Universidad La Salle*, 31(8), 5-90.