
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

“Expresión heteróloga y caracterización bioquímica de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Giardia lamblia* como posible candidata para el diseño de fármacos contra la giardiasis”

TESIS

para obtener el grado de
Maestra en Biotecnología

PRESENTA

I.B.I Leilany Martínez Ramírez
Matrícula: 2192802290

DIRECTOR

Dr. Francisco José Fernández Perrino

CO- DIRECTOR

Dr. Jaime Marcial Quino

ASESORA

Dra. Carolina Campos Muñiz



Iztapalapa, Ciudad de México, octubre 2021.

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465. Se agradece el apoyo de la beca otorgada por CONACYT (CVU 1012514) y al proyecto CONACYT 259201 para la realización del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino, por siempre estar para resolver mis dudas, por todo el apoyo que me brindó, y, sobre todo, por la paciencia y estar al pendiente de la evolución del proyecto.

Al Dr. Jaime Marcial Quino, por compartir su conocimiento conmigo, por su asesoría en cada momento que lo necesité y por la confianza que depositó en mi para la realización de este proyecto.

A la Dra. Carolina Campos Muñiz, por su asesoría y por su apoyo para la realización de este proyecto.

Por último, agradezco a tres grandes instituciones que hicieron posible la realización del presente proyecto, la Universidad Autónoma Metropolitana, el Instituto Nacional de Pediatría y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

DEDICATORIA

A mi familia.

A Patricia Ramírez Jiménez, mi madre, quien con su apoyo ha estado a mi lado incondicionalmente alentando cada una de mis decisiones, procurando mi desarrollo personal y profesional.

A Abraham Martínez Ramírez, mi hermano, que ha sido un apoyo incondicional y ejemplo a seguir en lo personal, así como profesionalmente.

A Juan Carlos Martínez Nieto[†], mi padre, aunque en estos momentos no se encuentre presente, su amor, consejos y guía me ayudaron a llegar hasta este punto.

Gracias por todo.

Ciudad de México, a 26 de octubre de 2021

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“Expresión heteróloga y caracterización bioquímica de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Giardia lamblia* como posible candidata para el diseño de fármacos contra la giardiasis”

Que presentó:

I.B.I Leilany Martínez Ramírez

Comité tutorial

Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino
Universidad Autónoma Metropolitana

Co director: Dr. Jaime Marcial Quino
Instituto Nacional de Pediatría

Asesora: Dra. Carolina Campos Muñiz
Universidad Autónoma Metropolitana

Comité de evaluación

Presidente: Dra. Carolina Campos Muñiz
Universidad Autónoma Metropolitana



Secretario: Dra. Yenizey Merit Álvarez Cisneros
Universidad Autónoma Metropolitana



Vocal: Dra. Alba Mónica Montiel González
Universidad Autónoma de Tlaxcala



Vocal: Dr. Fernando Gómez Chávez
Instituto Nacional de Pediatría



RESUMEN

Las infecciones parasitarias constituyen uno de los principales problemas de salud pública en México, la giardiasis es una de estas infecciones causada por el protozoario *Giardia lamblia*, que emplea principalmente la glucólisis para la producción de energía.

La glucólisis es una vía metabólica importante para la mayoría de los organismos, incluidos los protozoarios como *Giardia lamblia*. Muchos de estos eucariotas primitivos han optimizado su metabolismo, favoreciendo la glucólisis para generar ATP en entornos ricos en glucosa en los que residen.

La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una enzima que participa en la vía de la glucólisis. Esta enzima utiliza gliceraldehído-3-fosfato como sustrato y durante su catálisis se forman el cofactor reducido $\text{NADH} + \text{H}^+$ y 1,3-bisfosfoglicerato, un intermediario esencial para la generación de energía.

Dada la relevancia de la enzima, el objetivo del presente trabajo fue la caracterización bioquímica de la proteína GIGAPDH-I y contrastar sus diferencias con la HsGAPDH de *Homo sapiens* por alineamiento de secuencia y estructura para considerarla un posible candidato en el diseño de fármacos. Para ello, se propuso aislar el gen *glgapdh-I* de *Giardia lamblia*, clonarlo y sobreexpresar la proteína. La expresión se hizo en *Escherichia coli*, y debido a que GIGAPDH-I contenía una etiqueta de seis histidinas, fue posible purificarla en un paso mediante cromatografía de afinidad. La proteína mostró una masa molecular monomérica de aproximadamente 36 kDa en SDS-PAGE, y la filtración en gel indicó que es un tetrámero. La GIGAPDH-I mostró valores óptimos de pH 7.7 y temperatura óptima de 35–37 °C.

También se determinaron los parámetros cinéticos, y los resultados revelaron que GIGAPDH-I muestra una cinética de Michaelis-Menten para el sustrato G3P y la coenzima NAD^+ , con valores de K_m de 0.41 mM y 0.02 mM, respectivamente. El análisis bioinformático permitió identificar motivos conservados característicos de las GAPDH, y el modelo 3D generado de la estructura tetramérica de GIGAPDH-I permitió observar la disposición de un fragmento conservado (150-ASCTTNCLAP-159) que contiene los residuos catalíticos Ser-151 y Cys-152, altamente conservados en las GAPDH de otros organismos.

Finalmente, al comparar GIGAPDH-I por alineamiento de secuencia y estructura con la proteína HsGAPDH, se identificaron motivos conservados característicos de las GAPDH. Sin embargo, el porcentaje de identidad entre ambas secuencias fue de 59.8% y con base en la RMSD de 0.895 la similitud estructural entre ambas topologías es baja.

En conclusión, el presente estudio sirve de base para comprender las propiedades bioquímicas de GIGAPDH y una posible propuesta futura como candidata para el diseño de moléculas frente a *Giardia lamblia*.

ABSTRACT

Parasitic infections are one of the main public health problems in Mexico. Giardiasis is one of these infections caused by the protozoan *Giardia lamblia*, which mainly uses glycolysis for energy production.

Glycolysis is an important metabolic pathway for most organisms, including protozoans like *Giardia lamblia*. Many of these primitive eukaryotes have optimized their metabolism, favoring glycolysis to generate ATP in the glucose-rich environments in which they reside.

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) participates in the glycolysis pathway. This enzyme uses glyceraldehyde-3-phosphate as a substrate and during its catalysis, the reduced cofactor NADH and 1,3-bisphosphoglycerate, an essential intermediary for energy generation, are formed.

Given the relevance of the enzyme, the aim of the present work was the biochemical characterization of the GIGAPDH-I protein and to contrast its differences with HsGAPDH from *Homo sapiens* by sequence alignment and structure in order to consider it as a possible candidate for drug design. For this purpose, it was proposed to isolate the *gapdh-I* gene from *Giardia lamblia*, clone it and overexpress the protein. Expression was done in *Escherichia coli*, and because GIGAPDH-I contains a (His)₆-tag, it was possible to purify it in one step by affinity chromatography. The protein showed a monomeric molecular mass of approximately 36 kDa on SDS-PAGE, and the gel filtration experiment indicated that it is a tetramer. The GAPDH showed optimal values of pH 7.7 and temperature of 35–37 °C.

The kinetic parameters were also determined, and the results showed that GIGAPDH-I demonstrates Michaelis–Menten kinetics for G3P and NAD⁺ substrates, with K_m values of 0.41 mM and 0.02 mM, respectively. Bioinformatic analysis allowed to identify conserved motifs characteristic of GAPDHs, and the 3D model generated of the tetrameric structure of GIGAPDH-I allowed us to observe the arrangement of a conserved fragment (150-ASCTTNCLAP-159) containing the catalytic residues Ser-152 and Cys-153, which are highly conserved in the GAPDHs of other organisms.

Finally, when comparing GIGAPDH-I by sequence and structure alignment with the HsGAPDH protein, conserved motifs characteristic of GAPDHs were identified. However, the percentage of identity between both sequences was 59.8% and based on the RMSD of 0.895 the structural similarity between both topologies is low.

In conclusion, the present study serves as a basis to understand the biochemical properties of GAPDH and its possible future proposal as a candidate for the design of molecules against *Giardia lamblia*.

ÍNDICE

Índice de ilustraciones.....	XIII
Índice de tablas.....	XV
Abreviaturas.....	XVI
1 Introducción.....	1
1.1 Características de <i>Giardia lamblia</i>	2
1.1.1 Taxonomía.....	2
1.1.2 Filogenia.....	3
1.1.3 Morfología.....	3
1.1.4 Genoma de <i>Giardia lamblia</i>	3
1.1.5 Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>	4
1.2 Metabolismo en protozoarios.....	5
1.2.1 Metabolismo de <i>Giardia lamblia</i> (Glucólisis).....	6
1.2.2 Propiedades de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).....	8
1.3 Estudios de enzimas metabólicas como dianas farmacológicas.....	8
2 Antecedentes.....	9
3 Justificación.....	10
4 Hipótesis.....	11
5 Objetivos.....	11
6 Material y métodos.....	12
6.1 Equipos.....	12
6.2 Microorganismos.....	12
6.2.1 <i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803 (cepa WB).....	12
6.2.2 <i>Escherichia coli</i> TOP 10F' (Thermo Fisher Scientific®).....	13
6.2.3 <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS (Thermo Fisher Scientific®).....	13
6.3 Vector plasmídico.....	13
6.3.1 Vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific®).....	13
6.4 Enzimas comerciales.....	14
6.4.1 Enzimas de restricción.....	14
6.4.2 DNasa I (desoxirribonucleasa I) (Thermo Fisher Scientific®).....	14
6.4.3 Transcriptasa reversa (Thermo Fisher Scientific®).....	14
6.4.4 ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Thermo Fisher Scientific®).....	14
6.5 Oligonucleótidos.....	14
6.6 Reactivos y kits comerciales.....	16
6.6.1 Trizol (Invitrogen, EE. UU.) Thermo Fisher Scientific®.....	16
6.6.2 PBS estéril (Thermo Fisher Scientific®).....	16

6.6.3	GelRed® (Nucleic Acid Gel, Biotium, Fremont, CA, EE. UU.)	16
6.6.4	GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific ®)	16
6.6.5	Azul de Coomassie coloidal (R-250) (Sigma-Aldrich).....	16
6.7	Software	17
6.7.1	BLAST ®.....	17
6.7.2	MODELLER 9.24®.....	17
6.7.3	UCSFChimera 1.14 ®.....	17
6.7.4	PDBsum®.....	17
6.7.5	Origin 8.0 ®.....	17
6.8	Análisis bioinformático entre las secuencias GIGAPDH-I y GIGAPDH-II.....	18
6.9	Extracción de ARN.....	18
6.10	Síntesis de ADNc por RT-PCR	19
6.11	Clonación del gen <i>glgapdh-I</i>	20
6.11.1	Propagación del plásmido pET3a-GIGAPDH-I en <i>E. coli</i>	21
6.11.2	Extracción de ADN plasmídico.....	22
6.12	Cultivo de <i>E. coli</i> y expresión de la proteína recombinante GIGAPDH-I	23
6.13	Purificación de la proteína recombinante GIGAPDH-I	23
6.14	Ensayo de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.....	24
6.15	Filtración analítica en gel de GIGAPDH-I	25
6.16	Efecto del pH y la desnaturalización térmica sobre la actividad de la GIGAPDH-I25	
6.17	Determinación de parámetros cinéticos de GIGAPDH-I	26
6.18	Espectros de dicroísmo circular (CD) y estabilidad térmica.....	26
6.19	Efecto del clorhidrato de guanidina (Gdn-HCl) sobre la estabilidad de la GIGAPDH-I.....	27
6.20	Determinación de la fluorescencia intrínseca de GIGAPDH-I.....	27
6.21	Modelado por similitud de la proteína GIGAPDH-I	28
7	Resultados y discusión	30
7.1	Análisis bioinformático de GIGAPDH-I y GIGAPDH-II.	30
7.2	Extracción de ARN y síntesis de ADNc por RT-PCR.	31
7.3	Clonación, expresión y purificación de la enzima recombinante GIGAPDH-I.....	32
7.4	Estado nativo de la proteína recombinante GIGAPDH-I.....	34
7.5	Efecto del pH y la desnaturalización térmica sobre la actividad de la GIGAPDH-I36	
7.6	Parámetros cinéticos K_m , V_{max} , K_{cat} de la enzima GIGADPH-I.	38
7.7	Estructura secundaria y estabilidad térmica de la GIGADPH-I por dicroísmo circular (CD).	39
7.8	Estabilidad de la proteína GIGAPDH-I en presencia de Gdn-HCl.....	41
7.9	Análisis estructural mediante fluorescencia intrínseca de la GIGAPDH-I.	41

7.10	Modelado por similitud de la proteína GIGAPDH-I	43
7.10.1	Alineamiento de secuencia y estructura entre GIGAPDH-I y HsGAPDH	46
8	Conclusiones	49
9	Perspectivas	50
10	Referencias	51
11	Anexos	60

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Ciclo de vida Giardia lamblia [29].	5
Ilustración 2. Vía de la glucólisis anaerobia de Giardia lamblia.	7
Ilustración 3. Reacción de la GAPDH en la vía de la glucólisis.	8
Ilustración 4. Vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific®).	13
Ilustración 5. Vectores pET3a-GIGAPDH-I y pET3a-GIGAPDH-II.	21
Ilustración 6. Alineamiento de secuencias (GIGAPDH-I y GIGAPDH-II), en Jalview.	30
Ilustración 7. GIGAPDH-I (regiones conservadas características de GAPDHs)	31
Ilustración 8. Electroforesis del ARN total obtenido trofozoítos de Giardia lamblia. Gel de agarosa al 1%.	31
Ilustración 9. Electroforesis del gen gapdh-I (carril 1), gapdh-II (carril 2) y el marcador de peso molecular (1 kb, Ladder, GeneRuler™) en el carril M.	32
Ilustración 10. Fragmento de la secuencia del plásmido pET3a-GIGAPDH-I, sitio de restricción NcoI, etiqueta 6xHistag y sitio NdeI.	32
Ilustración 11. Electroforesis en gel de agarosa. Genes obtenidos de GIGAPDH-I (1011 pb, carril 1) y GIGAPDH-II (1224 pb, carril 2) mediante PCR. Vectores construidos pET3a-GIGAPDH-I y pET3a-GIGAPDH-II digeridos con las enzimas NdeI-BamHI (carril 3 y 4 respectivamente) y el marcador de peso molecular (1 kb DNA Ladder, GeneRuler™) en el carril M.	33
Ilustración 12. Gel SDS-PAGE, fracción de lisado (carril 1), el extracto crudo (carril 2), la enzima recombinante GIGAPDH-I (carril 3) y el marcador de peso molecular (250 kDa, Bio-Rad, Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™) en el carril M.	34
Ilustración 13. Perfil del estado nativo de la enzima recombinante GIGAPDH-I.	35
Ilustración 14. Curva de calibración de las proteínas vs logaritmo de masa molecular (MW) del estándar de filtración en gel de Bio-Rad. El MW de GIGAPDH-I (círculo rosa) se muestra en la línea recta obtenida.	35
Ilustración 15. Perfil de actividad, pH vs actividad residual de GIGAPDH-I.	36
Ilustración 16. Perfil de termoestabilidad, Temperatura (°C) vs % actividad residual de GIGAPDH-I.	37
Ilustración 17. Velocidad de reacción a diferentes concentraciones de G3P, de GIGAPDH-I.	38
Ilustración 18. Velocidad de reacción a diferentes concentraciones de NAD+, de GIGAPDH-I.	38
Ilustración 19. Espectro de dicroísmo circular, longitud de onda (nm) vs elipticidad molar.	40
Ilustración 20. Espectro de estabilidad térmica, T (°C) vs fracción desplegada.	40
Ilustración 21. Perfil de estabilidad de GIGAPDH-I.	41
Ilustración 22. Espectro de fluorescencia intrínseca, longitud de onda (nm) vs Intensidad de fluorescencia (a.u).	42
Ilustración 23. Efecto sobre la fluorescencia intrínseca a diferentes concentraciones de Gdn-HCl.	42
Ilustración 24. Predicción de la estructura secundaria de GIGAPDH-I obtenido con el programa PSIPRED.	43
Ilustración 25. Estructura de la proteína GIGAPDH-I obtenida con el software UCSFChimera, fragmento conservado de 10 residuos en amarillo.	44
Ilustración 26. Alineamiento estructural entre GIGAPDH-I y CpGAPDH con UCSFChimera.	45
Ilustración 27. Gráfico de Ramachandran del modelo seleccionado para GIGAPDH-I.	45
Ilustración 28. Identificación de aa involucrados en los sitios de unión para G3P y NAD+ en GIGAPDH-I, usando UCSFChimera.	46

Ilustración 29. Alineamiento de secuencias (GIGAPDH-I y HsGAPDH), en Jalview.	47
Ilustración 30. Alineamiento estructural de GIGAPDH-I y HsGAPDH por UCSFChimera. ...	48
Ilustración 31. Secuencia de la proteína GIGAPDH-I de <i>G. lamblia</i> en la herramienta BLAST de NCBI para identificar homólogos empleando el algoritmo Blastp.	62
Ilustración 32. Matriz BLOSUM62.	62
Ilustración 33. Estructura cristalina de la GAPDH de <i>Cryptosporidium parvum</i>	63
Ilustración 34. BLAST del plásmido pET3a-HisTEV que codifica para GIGAPDH-I.	64
Ilustración 35. Peso molecular (DA) y punto isoeléctrico teórico de GIGAPDH-I, Expasy®.	65
Ilustración 36. Vmax y Km de G3P, Origin 8.0®.	65
Ilustración 37. Vmax y Km de NAD+, Origin 8.0®.	66
Ilustración 38. Gráfica de energía de los residuos de aa, Energía proteica optimizada discreta (DOPE) vs Posición.	67
Ilustración 39. Estadísticas de Ramachandran.	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de <i>Giardia</i> , ARN ribosomal [12].	2
Tabla 2. Características oligonucleótidos GIGAPDH-I Forward y Reverse, OligoEvaluator TM .	15
Tabla 3. Características oligonucleótidos GIGAPDH-II Forward y Reverse, OligoEvaluator TM .	15
Tabla 4. Oligonucleótidos GL50803_6687.	19
Tabla 5. Oligonucleótidos GL50803_17043.	20
Tabla 6. Condiciones del termociclador RT-PCR.	20
Tabla 7. Valores cinéticos de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa previamente reportados en diferentes organismos.	39
Tabla 8. Formulación del medio de cultivo TYI-S-33 para <i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803.	60
Tabla 9. Formulación del caldo de cultivo Luria Bertani.	60
Tabla 10. Formulación del medio sólido Luria Bertani.	61

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADP	Adenosín difosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Adenosín trifosfato
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GITIM	Trisa fosfato isomerasa de <i>G. lamblia</i>
Mb	Mega bases
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido forma oxidada
NADH + H	Nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfatos
PDB	Protein Data Bank
Pi	Fosfato inorgánico
PPi	Pirofosfato inorgánico
TIM	Triosa fosfato isomerasa

1 INTRODUCCIÓN

Giardia lamblia es un protozoo que causa una infección parasitaria conocida como giardiasis. Afecta a la mayoría de los mamíferos, incluido el ser humano. Se estima que aproximadamente 280 millones de personas se infectan cada año; debido a esta incidencia, la giardiasis se considera un problema de salud pública [1]. En México, en el año 2019 se reportaron 11,304 casos de giardiasis, de los cuales la población femenina fue la más afectada por esta parasitosis [2].

Esta enfermedad afecta principalmente a la población pediátrica, aunque también afecta a pacientes inmunodeprimidos. El dolor abdominal, las náuseas, los vómitos, la diarrea e incluso la pérdida de peso son las manifestaciones más comunes de la giardiasis; no obstante, también se detectan casos asintomáticos [3]. Esta parasitosis se contrae por contacto directo o ingesta de alimentos y agua contaminada con quistes. El diagnóstico comúnmente se realiza mediante un examen de microscopía de heces, sin embargo, *G. lamblia* aún es difícil de detectar dado que, el éxito de la detección está relacionado con la intensidad de la infección [4] y la concentración del parásito en la muestra, relacionada a la cantidad insuficiente de muestra examinada al total colectado o incluso a una observación microscópica no detallada [5],[6], por lo que frecuentemente aparecen diagnósticos erróneos en la identificación [6].

El actual tratamiento para la giardiasis es el empleo de nitroimidazoles (metronidazol, tinidazol, ornidazol, nitazoxanida), derivados de benzimidazoles (albendazol), nitrofuranos (furazolidona), y antibióticos como paromomicina en combinación con metronidazol; sin embargo, algunos estudios han mostrado efectos secundarios para alguno de ellos (como el metronidazol, considerado cancerígeno) [7],[8]. Se ha reportado resistencia a medicamentos en *Giardia*, lo que origina fracasos en el tratamiento para la giardiasis. La resistencia a los medicamentos no solamente es la causante del fracaso del tratamiento, también pueden influir otros factores como la reinfección, concentraciones insuficientes de medicamentos administrados o la inmunosupresión [8].

Actualmente, se ha renovado el interés por estudiar y proponer enzimas metabólicas como dianas farmacológicas para el diseño de fármacos específicos en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Se ha identificado que la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) tiene otras propiedades además de su papel clave en la glucólisis. La capacidad de GAPDH para unirse a numerosas matrices extracelulares, la modulación de las respuestas inmunitarias del hospedero y un papel en la virulencia ha

llevado a numerosos investigadores a postular que GAPDH puede ser una buen candidato para vacuna en la protección contra numerosos patógenos [9].

1.1 Características de *Giardia lamblia*

1.1.1 Taxonomía

El género *Giardia* se incluyó originalmente en el *phylum* *Sarcomastigophora*, *subphylum* *Mastigophora*, clase *Zoomastigophorea*, orden *Diplomonadida* y familia *Hexamitidae* [10]. De acuerdo con un sistema basado en datos genéticos, estructurales y bioquímicos, *Giardia* pertenece, al *phylum* *Metamonada*, *subphylum* *Trichozoa*, clase *Trepomonadea* y orden *Giardiida* [11]. *Giardia lamblia* también es conocida como *Giardia duodenalis* o *Giardia intestinalis* [12].

Mediante microscopía han podido ser distinguidas seis especies de *Giardia*, y caracterizadas mediante la secuenciación del gen del ARN ribosomal (ARNr) y de otros genes de proteínas variables de superficie [18], tabla 1. Dentro de la especie *G. lamblia* existen dos grupos genéticos o ensamblajes patógenos para el ser humano (A y B) que poseen potencial zoonótico.

Tabla 1. Especies de *Giardia*, ARN ribosomal [12].

Especies de <i>Giardia</i>	Ensamblajes	Número de acceso de GenBank (ARNr 18s)
<i>G. duodenalis</i> (<i>intestinalis</i> , <i>lamblia</i>)	Ensamble A (polaco) ([13]- [15])	AF199446 (A2) AB159796 (A1) X52949 (A1)
	Ensamble B (belga) ([13]y [14])	M54878 (A1) U09491 (B) AF199447 (B) AF113898 (BIV) AF113897 (BIII)
	Ensamble C y D ([16]y [17]) Ensamble E ([18]) Ensamble F ([17]) Ensamble G ([17])	AF113899 AF199443 (C) AF113900 AF199449 (D) AF199448 AF113901 AF199450
<i>G. agilis</i>	-	No disponible
<i>G. muris</i> ([19])	-	X65063 AF113895
<i>G. psittaci</i> ([20])	-	AF473853

Especies de <i>Giardia</i>	Ensamblados	Número de acceso de GenBank (ARNr 18s)
<i>G. ardeae</i> ([21] y [20])	-	Z17210 U20351
<i>G. mícroti</i> ([22])	-	AF006676 AF006677 AF473852

1.1.2 Filogenia

Los primeros trabajos que investigaron la posición filogenética de *Giardia* utilizaron secuencias de ARN ribosomal y demostraron que *Giardia* pertenece a un linaje ramificado cercano a los eucariotas [23]. Estudios filogenéticos posteriores utilizaron, adicionalmente, otros *loci* conservados como los factores de elongación [24] y cinasas dependientes de ciclina. Esto llevó a la deducción de que *Giardia* es el organismo eucariota más primitivo [25]. De hecho, la ausencia de mitocondrias, peroxisomas y aparato de Golgi [22] ha generado muchos problemas en cuanto a su clasificación y también ha obligado a la realización de múltiples análisis filogenéticos.

1.1.3 Morfología

Giardia lamblia posee dos morfologías o estadios: trofozoíto (forma vegetativa) y quiste (forma de resistencia e infección). El trofozoíto tiene forma de pera, con una superficie dorsal convexa que mide unos 12-15 μm y una anchura de 6-8 μm . Posee dos núcleos (binucleado), situados en la parte anterior del organismo, y cuatro pares de flagelos, con simetría bilateral. El quiste tiene forma ovoide, con dimensiones de 8-14 μm de largo y 6-10 μm de ancho [25].

1.1.4 Genoma de *Giardia lamblia*

Como se mencionó anteriormente, cada trofozoíto de *G. lamblia* posee dos núcleos. Estudios han revelado que cada núcleo tiene la misma cantidad de ARNr [26], de manera que probablemente los dos contengan la misma información de ADN.

El contenido de ADN total es estimado en 1.2×10^7 pb. Mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) se identificaron cinco cromosomas en *G. lamblia*, con tamaños de 1.6 a 3.8 Mb, para un total de 12 Mb en el genoma completo. Estos resultados sugieren que un trofozoíto contiene de 30 a 50 moléculas de ADN ó de 6 a 10 copias de cada cromosoma. En reportes anteriores de *G. lamblia* no se han obtenido secuencias de intrones, por lo que si existen intrones en el genoma de *G. lamblia* estos deben encontrarse en un número relativamente pequeño de genes [27].

En cuanto a investigaciones previas sobre expresión génica en este organismo, en un estudio anterior se analizó el promotor del gen para la α 2-tubulina y se comparó con otros cinco promotores (α 2-giardina, δ -giardina, actina, GDH y una proteína de localización nuclear, ran). La expresión de un gen reportero de luciferasa fue cinco veces mayor con el promotor α 2-tubulina que con el promotor de GDH. Adicionalmente, se confirmó la importancia de secuencias ricas en adenina y timina para modular los niveles de expresión génica [28].

1.1.5 Ciclo de vida de *Giardia lamblia*

El ciclo de vida de *G. lamblia* comprende dos estadios principales: una etapa de trofozoíto, que coloniza el intestino delgado del hospedero y causa enfermedad, y una etapa de quiste infeccioso que es resistente en el ambiente.

Después de la ingesta oral de algún alimento contaminado con quistes de *G. lamblia*, la pared del quiste se rompe y los trofozoítos se liberan en la parte superior del intestino delgado [25]. Para la colonización del intestino delgado es esencial la unión del disco adhesivo ventral del trofozoíto a las células epiteliales [29].

Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria en el lumen del intestino delgado. La exposición a las sales biliares conduce al enquistamiento de los trofozoítos, este proceso se lleva a cabo de una forma controlada: la glucosa se transforma en N-acetilgalactosamina, componente de la pared de los quistes y se activa la ruta de la arginina dihidrolasa para producir energía (ATP) y contrarrestar la disminución de glucosa. Los quistes producidos (infecciosos inmediatamente después de la excreción) pasan a las heces, lo que permite completar el ciclo de vida del parásito [25], ilustración 1.

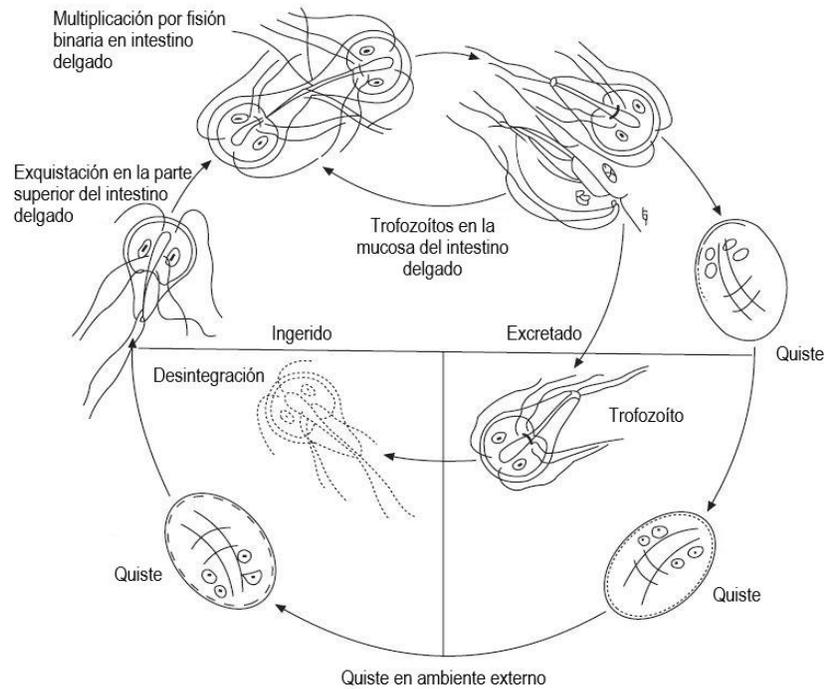


Ilustración 1 Ciclo de vida *Giardia lamblia* [29].

1.2 Metabolismo en protozoarios

Los eucariotas segmentan su metabolismo, dividiendo las vías catabólicas (generadoras de energía) y anabólicas (biosintéticas) entre el citoplasma y múltiples orgánulos cerrados por membranas. En el consumo de carbohidratos, como la glucosa, las células generan ATP a través de la fosforilación a nivel de sustrato, utilizando diversos intermediarios catabólicos. El catabolismo de la glucosa (glucólisis) es una vía citoplasmática (tanto en procariotas como eucariotas) que genera una pequeña ganancia neta de ATP, pero en organismos aeróbicos las mitocondrias son las potencias celulares que oxidan completamente los sustratos de carbono a CO_2 , utilizando los electrones adquiridos de tales reacciones catabólicas para generar cantidades mucho mayores de energía, en un proceso llamado fosforilación oxidativa [30]. Existen dos tipos de glucólisis: aerobia y anaerobia; ambas requieren un total de diez reacciones y se llevan a cabo en el citosol.

La comprensión del metabolismo de los protozoarios se ve limitada debido a la incapacidad de replicar experimentalmente el medio ambiente en que han evolucionado [30], principalmente organismos primitivos como *G. lamblia*. El nuevo conocimiento generado acerca del metabolismo de los parásitos proviene más bien del uso de enfoques genómicos comparativos, para producir mapas metabólicos hipotéticos. Por otro lado, hay que tomar

en cuenta que una cantidad limitada de biomasa puede ser suficiente en la actualidad para un análisis proteómico, utilizando enfoques modernos de espectrometría de masas. De esta manera, se puede determinar la expresión temporal de muchas proteínas involucradas en los procesos bioquímicos durante el ciclo de vida de un parásito [30]. Un ejemplo de aplicación de este tipo de enfoque, basado en la biología de sistemas, es la identificación de estrategias metabólicas distintas utilizadas por los parásitos de la malaria en el hospedero (mamíferos) y el vector (mosquitos) [31].

Algunos protozoos se replican dentro de las células del hospedero. Aquí, el metabolismo de la célula huésped puede conducir a ambigüedades en la interpretación de patrones metabólicos (sobre todo si se usan metabolitos enriquecidos isotópicamente para estudiar las reacciones químicas en una vía metabólica dada). La presencia de una célula del hospedero también puede proporcionar complicaciones adicionales para la purificación o fraccionamiento de un parásito intracelular [30].

1.2.1 Metabolismo de *Giardia lamblia* (Glucólisis)

G. lamblia carece de mitocondrias, y por ende de fosforilación oxidativa, por lo que los trofozoítos emplean principalmente la glucólisis anaerobia y la ruta de la arginina dihidrolasa (que dependen de la fosforilación a nivel de sustrato) para la producción de energía. Sin embargo, como ya se comentó, esta última ruta se activa exclusivamente durante el enquistamiento, para contrarrestar la pérdida de energía en dicho proceso [25].

De manera general, el primer paso de la glucólisis consiste en la fosforilación del carbono seis de la glucosa, por una enzima llamada hexocinasa y una molécula de ATP, lo que da como resultado glucosa-6-fosfato y ADP. En la segunda reacción, una fosfohexosa isomerasa cataliza la isomerización de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato. En la tercera reacción, la fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato (PPI) cataliza la transferencia de un grupo fosfato hasta la fructosa-6-fosfato para dar fructosa-1,6-bisfosfato y Pi; esta reacción es irreversible en *Giardia*. La enzima fructosa-1,6-bisfosfato o aldolasa cataliza una condensación aldólica en la cuarta reacción, para dar dos triosas fosfato: gliceraldehido-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. En la quinta reacción, una triosa fosfato isomerasa rápidamente cataliza la reacción reversible de la dihidroxiacetona en gliceraldehido-3-fosfato. La enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa cataliza, a continuación, la oxidación del gliceraldehido-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato. En la séptima reacción, la enzima fosfoglicerato cinasa realiza la transferencia de un grupo fosfato del 1,3-

bisfosfoglicerato a una molécula de ADP, para dar 3-fosfoglicerato y ATP. La enzima fosfoglicerato mutasa cataliza, seguidamente, el desplazamiento del grupo fosfato del C-3 al C-2, para dar 2-fosfoglicerato. En la novena reacción, la enzima enolasa promueve la eliminación reversible de una molécula de agua del 2-fosfoglicerato para dar fosfoenolpiruvato. El último paso de la glucólisis es la transferencia del grupo fosfato desde el fosfoenolpiruvato al ADP, reacción catalizada por la piruvato cinasa [25], ilustración 2.

El balance global muestra una ganancia de dos moléculas de piruvato, tres moléculas de ATP y dos moléculas de NADH+ H⁺ por cada molécula de glucosa consumida. Los productos finales de la fermentación de la glucosa en *G. lamblia* son acetato, etanol, alanina, dióxido de carbono e hidrógeno [25].

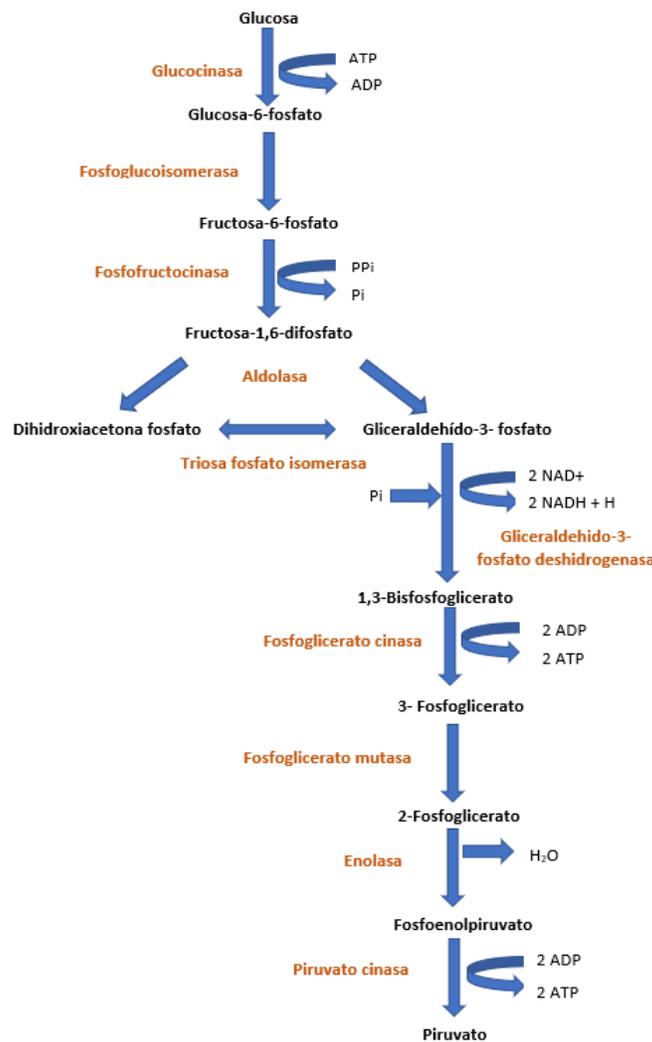


Ilustración 2. Vía de la glucólisis anaerobia de *Giardia lamblia*.

1.2.2 Propiedades de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)

En la glucólisis, la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa cataliza la reacción de oxidación del gliceraldehído-3-fosfato, es decir lo utiliza como sustrato y durante su catálisis se forman el cofactor reducido $\text{NADH} + \text{H}^+$ y 1,3-bisfosfoglicerato, un intermediario esencial para la generación de energía [32], ilustración 3.

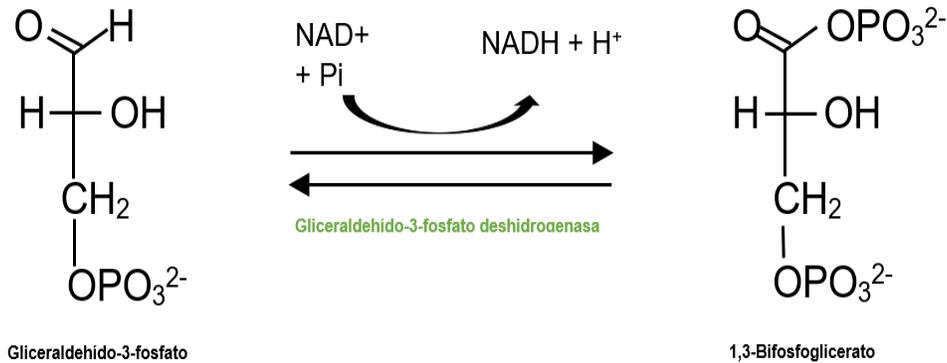


Ilustración 3. Reacción de la GAPDH en la vía de la glucólisis.

La enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se consideraba una enzima de la vía de la glucólisis sin mucho interés; no obstante, recientes investigaciones demostraron que la GAPDH en células de mamíferos participa en un diverso número de actividades que no están relacionadas con su función en la vía de la glucólisis. Interviene en la fusión de membranas, el ensamblaje de microtúbulos, el transporte vesicular y el mantenimiento de la integridad del ADN. Además, recientes estudios demuestran que está directamente involucrada en la regulación de genes transcripcionales, postranscripcionales y en el mantenimiento de la estructura de la cromatina [33].

En el genoma de *G. lamblia* hay dos genes que codifican para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, el gen *glgapdh-I* y *glgapdh-II*, sin embargo, no se ha realizado la caracterización bioquímica de las dos proteínas [34],[35].

1.3 Estudios de enzimas metabólicas como dianas farmacológicas

Las vías metabólicas que extraen energía de los compuestos de carbono son esenciales para la supervivencia de un organismo. Por lo tanto, la inhibición de las enzimas en estas

vías representa una estrategia terapéutica potencial para combatir las infecciones parasitarias. Sin embargo, el alto grado de similitud entre las enzimas del hospedero y del parásito hace que esta estrategia sea potencialmente difícil. Aun así, varios medicamentos existentes para tratar infecciones por parásitos helmintos (gusanos) se dirigen a las enzimas metabólicas. Estos incluyen los antimoniales trivalentes que se dirigen a la fosfofructoquinasa y clorsulón que se dirige a la fosfoglicerato mutasa y fosfoglicerato quinasa. Se han caracterizado bioquímicamente enzimas glucolíticas de una variedad de helmintos que son de interés en el desarrollo de posibles vacunas [36].

El uso de enzimas como dianas terapéuticas abarca actualmente una amplia gama de aplicaciones, que van desde los trastornos digestivos hasta la terapia del cáncer. Un estudio reciente proporcionó información sobre las diferencias significativas en el descubrimiento de motivos, secuencias y el análisis del árbol filogenético de las aminoacil ARNt sintetasas humanas y las aminoacil ARNt sintetasas de *Plasmodium malariae*, protozooario que causa la malaria. Dicha información puede proporcionar una base para una exploración adicional de las aminoacil ARNt sintetasas de *Plasmodium* como posibles dianas farmacológicas, debido a la importancia de estas enzimas en la supervivencia del protozooario [37].

2 ANTECEDENTES

Se han realizado estudios de las enzimas relevantes en el metabolismo de *G. lamblia*, con resultados favorables, como los efectos funcionales y estructurales desencadenados por la modificación del aminoácido (aa) no conservado cisteína-222, de la triosa fosfato isomerasa de *G. lamblia* (GITIM), aa que al sufrir una modificación química inactiva específicamente a GITIM. El estudio reveló que las modificaciones tales como la polaridad, la carga y el volumen de la cadena lateral en el aa cisteína-222 alteran diferencialmente la actividad, la afinidad, la estabilidad y la estructura de la enzima. En la estructura cristalográfica se observó, que las modificaciones perturban el loop 7, una región de la enzima cuyas interacciones con el loop catalítico 6 son esenciales para la estabilidad de la GITIM, la unión del ligando y la catálisis. Dichos resultados en conjunto con la secuencia de aa de TIM en diversos grupos filogenéticos indicó que la Cisteína-222 y sus residuos circundantes están poco conservados, lo que respalda la propuesta de que la región loop 7 podría ser un buen objetivo para el diseño de fármacos [38].

Otro ejemplo, es el estudio de la caracterización bioquímica y modelado estructural de la proteína recombinante glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), primera enzima de la vía

de las pentosas fosfato de *G. lamblia*, fusionada con la fosfogluconolactonasa (6PGL). Los estudios de modelado por computadora revelaron características estructurales y funcionales únicas, que establecieron claramente las diferencias entre la proteína G6PD::6PGL de *G. lamblia* y la enzima G6PD humana, lo que demostró que el modelo puede usarse para el diseño de nuevos fármacos con actividad anti-giardíasis [39].

El primer acercamiento relativo a la enzima GAPDH de *G. lamblia*, se dio al obtener las secuencias completas de los dos genes que codifican para esta enzima, el gen *gapdh-I* y *gapdh-II*. Se observó que la secuencia del gen *gapdh-I* muestra un marco de lectura abierto (ORF) que codifica una GAPDH típica, pero la secuencia de aminoácidos derivada de *gapdh-II* es diferente a las secuencias típicas de GAPDH [34].

En análisis posteriores se diferenciaron sus roles funcionales, se cuantificaron las transcripciones de GIGAPDH (I y II) en el estadio de trofozoíto y durante la etapa de enquistación de *G. lamblia*, hibridando con sondas específicas para cada gen (*glgapdh-I* y *glgapdh-II*) el ARNm aislado de ambas etapas. En los resultados, se demostró que de las dos GAPDH presentes en el parásito, GIGAPDH-I se expresa constitutivamente (en ambas etapas), mientras que GIGAPDH-II solo lo hace durante el enquistamiento. Se realizaron pruebas complementarias con un mutante knockout *Escherichia coli* gap y los resultados sugirieron que GIGAPDH-I es una enzima responsable de la actividad glucolítica en *G. lamblia* [35]. Inclusive cuando se midió la expresión de la GIGAPDH-I en cepas con resistencia a compuestos como metronidazol y nitazoxanida, los niveles de los transcritos fueron altos, otro dato que revela la importancia de su expresión y regulación en el parásito [40].

3 JUSTIFICACIÓN

La giardiasis afecta alrededor de 280 millones de personas por año en el mundo, observándose a las poblaciones inmunodeficiente y pediátrica como las más vulnerables [25]. La transmisión se da fácilmente por contacto directo o ingesta de alimentos contaminados. El diagnóstico por el método más usado y asequible (microscopia) presenta ciertas dificultades y diagnósticos erróneos, de igual forma requiere de personal altamente capacitado, el cual se dispone escasas veces en las zonas de prevalencia de esta afección. Debido a la resistencia e inespecificidad de los nitroimidazoles empleados contra esta parasitosis y en conjunto con el limitado conocimiento de las enzimas implicadas en la principal vía de obtención de energía de este protozoario, se requiere encontrar nuevas

dianas terapéuticas para el diseño de fármacos específicos en el tratamiento de esta enfermedad infecciosa. Previamente se han reportado estudios de la caracterización bioquímica y modelado estructural de enzimas de *Giardia lamblia* que pueden emplearse en el diseño de fármacos específicos; así como estudios que demuestran la importancia de GIGAPDH-I como housekeeping glucolítico. Esto permitirá que el presente trabajo se enfoque en la caracterización y comprensión bioquímica, estructural y en la expresión heteróloga de la proteína GIGAPDH-I, del gen *glgapdh-1* de *Giardia lamblia*, como posible candidato para el diseño de fármacos.

4 HIPÓTESIS

La proteína GIGAPDH-I expresada en *E. Coli*, tendrá un comportamiento cinético de tipo Michaelis-Menten, con una fuerte afinidad ($K_m < 1$) por el sustrato gliceraldehído-3-fosfato.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Caracterizar bioquímicamente la proteína GAPDH-I de *Giardia lamblia* (GIGAPDH-I) y contrastar sus diferencias con la proteína de *Homo sapiens* (HsGAPDH) para considerarla un posible candidato en el diseño de fármacos.

5.2 Objetivos particulares:

- 1) Realizar un análisis bioinformático y confirmar la diferencia entre las dos secuencias que codifican para GAPDH en *G. lamblia*.
- 2) Evaluar el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de GIGAPDH-I.
- 3) Determinar los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) de la proteína GIGAPDH-I
- 4) Generar un modelo tridimensional de la proteína GIGAPDH-I y predecir sus sitios de unión al sustrato G3P y a la coenzima NAD⁺.
- 5) Comparar las proteínas GIGAPDH-I y HsGAPDH por alineamiento de secuencia y estructura.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Equipos

Autoclave

Balanza analítica

Campanas de flujo laminar

Columna de filtración en gel Sephacryl 200

Espectrofotómetro Varian Cary® 50 UV-Vis

Espectrómetro de fluorescencia Perkin-Elmer LS-55

Espectropolarímetro Jasco J-810®

Espectropolarímetro Jasco J-8190®

Gel de Biorad (EE. UU.)

Incubadora

Micropipetas

MultiDoc-It Digital Imaging System (UVP, Upland, CA, EE. UU.)

Potenciómetro

Resina Profinity™ imac (Fase estacionaria en la Cromatografía de Afinidad Metálica Inmovilizada)

Sistema de electroforesis

Sistema FPLC, AKTA (GE Healthcare, EE. UU.)

Sistema NanoDrop

6.2 Microorganismos

6.2.1 *Giardia lamblia* ATCC 50803 (cepa WB)

Se utilizaron trofozoítos de *Giardia lamblia* ATCC 50803 (cepa WB), el inóculo de aproximadamente 1000 células, se cultivó en medio TYI-S-33 suplementado con suero bovino fetal al 10% (GIBCO Lifetechnologies) y se dejaron crecer a confluencia por 60 horas. A partir de las células crecidas, se contaron 1×10^7 células y se cultivaron en tubos de vidrio con 9 mL de medio a 37 °C por 72 h. Posteriormente, para recuperar las células, los tubos con los trofozoítos se colocaron en hielo durante 10 min, seguido de centrifugación a $3,500 \times g$ durante 5 min.

6.2.2 *Escherichia coli* TOP 10F' (Thermo Fisher Scientific ®)

La cepa *E. coli* TOP 10F' se usó para la propagación del plásmido pET3a-GIGAPDH-I, por su alta eficiencia. Se cultivó en medio sólido Luria Bertani (LB) que contenía ampicilina (100 µg/mL), a 37 °C durante la noche. El cribado de las células transformadas se realizó mediante selección por antibiótico.

6.2.3 *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS (Thermo Fisher Scientific ®)

La cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS expresa constitutivamente niveles bajos de lisozima T7, lo que reduce la expresión basal de genes recombinantes al inhibir los niveles basales de la ARN polimerasa del bacteriófago T7. Se usó para expresar la proteína recombinante GIGAPDH-I de *G. lamblia*.

6.3 Vector plasmídico

6.3.1 Vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific ®)

Es un vector de clonación linealizado, que acepta inserciones de 6 pb a 10 kb. Los extremos 5' del vector contienen grupos fosforilo, por lo que no se requiere la fosforilación de los cebadores de PCR. Se utilizó por protocolo del Instituto Nacional de Pediatría para la clonación y conservación del gen *Glgapdh-I*.

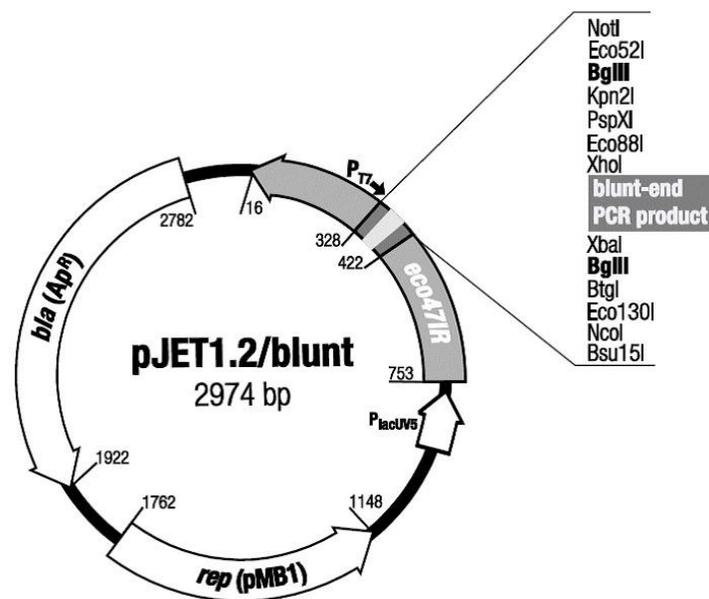


Ilustración 4. Vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific®).

6.4 Enzimas comerciales

6.4.1 Enzimas de restricción

Se utilizaron las enzimas *NdeI* y *BamHI* (Thermo Fisher Scientific ®), las cuales son endonucleasas que ensinde en la secuencia de reconocimiento 5'-CA[^]TATG-3' y 5'-G[^]GATCC-3', respectivamente. Ambas enzimas su utilizaron en la clonacion del gen *glgapdh-I* de *G. lamblia*.

6.4.2 DNasa I (desoxirribonucleasa I) (Thermo Fisher Scientific ®)

Enzima que digiere ADN mono y bicatenario en oligodesoxirribonucleótidos que contienen 5' fosfato. Se empleó en la digestion del ADN después de la extracción de ARN de *G. lamblia*.

6.4.3 Transcriptasa reversa (Thermo Fisher Scientific ®)

Es una enzima empleada en la síntesis de ADNc (ADN complementario) mediante un ARN monocatenario como plantilla.

6.4.4 ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Thermo Fisher Scientific ®)

Es una enzima que lleva a cabo la síntesis de la nueva cadena de ADN emparejando los desoxirribonucleótidos trifosfato con los desoxirribonucleótidos complementarios correspondientes en el ADN molde. Se usó en la RT-PCR para la síntesis de ADNc.

6.5 Oligonucleótidos

Se usaron oligonucleótidos para amplificar la secuencia codificante de las proteínas GIGAPDH-I y GIGAPDH-II. Las bases subrayadas indican los sitios de corte de las enzimas *NdeI* y *BamHI*, respectivamente. Las características de los oligonucleótidos se obtuvieron por medio de la herramienta OligoEvaluator™, (<http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>), tabla 5 y 6.

Tabla 2. Características oligonucleótidos GIGAPDH-I Forward y Reverse, OligoEvaluator™.

GIGAPDH-I						
Forward: 5'-TTACATATGCCTATTGCCTCGG-3'						
Cuenta de bases	µg/OD a 260 nm	Longitud (pb)	Tm (°C)	GC%	Estructura secundaria	Dímeros
A = 4 G = 4 C = 7 T = 8 Total = 23	33.2	23	67.5	47.8	Ninguna	No
Reverse: 5'-TATGGATCCTTAGCAGCCCTTGGAC-3'						
Cuenta de bases	µg/OD a 260 nm	Longitud (pb)	Tm (°C)	GC%	Estructura secundaria	Dímeros
A = 5 G = 6 C = 7 T = 7 Total = 25	33.22	25	70.5	52	Débil	No

Tabla 3. Características oligonucleótidos GIGAPDH-II Forward y Reverse, OligoEvaluator™.

GIGAPDH-II						
Forward: 5'-CATATGTCGGCCCCGAAG-3'						
Cuenta de bases	µg/OD a 260 nm	Longitud (pb)	Tm (°C)	GC%	Estructura secundaria	Dímeros
A = 4 G = 5 C = 6 T = 3 Total = 18	32	18	66.4	61.1	Débil	No
Reverse: 5'-GGATCCTCACTTAGAAGAGCCGA-3'						
Cuenta de bases	µg/OD a 260 nm	Longitud (pb)	Tm (°C)	GC%	Estructura secundaria	Dímeros
A = 7 G = 6 C = 6 T = 4 Total = 23	30.9	23	66.7	52.2	Débil	No

6.6 Reactivos y kits comerciales

6.6.1 Trizol (Invitrogen, EE. UU.) Thermo Fisher Scientific ®

Es un reactivo usado para la extracción del ARN de los trofozoítos de *G. lamblia*. El reactivo es una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros componentes patentados.

6.6.2 PBS estéril (Thermo Fisher Scientific ®)

Es una solución salina equilibrada que se utiliza para una variedad de aplicaciones de cultivo celular, como el lavado de células antes de la disociación, el transporte de células o tejidos, la dilución de células para el recuento y la preparación de reactivos. PBS está formulado sin calcio y magnesio para enjuagar los quelantes del cultivo antes de la disociación celular. Se empleo para realizar lavados a las células de trofozoítos recolectadas.

6.6.3 GelRed® (Nucleic Acid Gel, Biotium, Fremont, CA, EE. UU.)

GelRed® es un colorante para ácidos nucleicos fluorescente ultrasensible, se emplea para teñir ADN y ARN en geles de agarosa o geles de poliacrilamida, reemplaza el bromuro de etidio, por su mayor poder de detección y menor toxicidad. Se utilizó para teñir el ADNc del RT-PCR.

6.6.4 GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific ®)

El kit GeneJET Plasmid Miniprep de Thermo Scientific® utiliza una tecnología de membrana a base de sílice en forma de una práctica columna de centrifugado. Se usó para recuperar el ADN plasmídico de células *E. coli* TOP 10F'.

6.6.5 Azul de Coomassie coloidal (R-250) (Sigma-Aldrich)

El Azul de Coomassie coloidal es un colorante del tipo trifenilmetano aniónico, que se une de forma no covalente a los residuos de histidina, arginina y lisina de las proteínas; el límite de detección es 1 µg de proteína por punto. Se empleó para teñir los geles de poliacrilamida de la proteína recombinante GIGAPDH-I.

6.7 Software

6.7.1 BLAST®

Es una herramienta de la base de datos biológica NCBI (The National Center for Biotechnology Information). BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas. El programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos de secuencias y calcula la significancia estadística. Se empleó para comparar las secuencias de GIGAPDH-I y GIGAPDH-II de *G. lamblia* e identificar las regiones características.

6.7.2 MODELLER 9.24®

MODELLER 9.24 es un software para el modelado de estructuras de proteínas mediante la satisfacción de restricciones espaciales. Se empleó para el modelado de la estructura GIGAPDH-I de *G. lamblia*. El modelo se seleccionó de acuerdo con los parámetros estadísticos GMQE (Estimación de la calidad del modelo global), QSQE (Estimación de la calidad de la estructura cuaternaria) y QMEAN (el análisis energético del modelo cualitativo).

6.7.3 UCSFChimera 1.14®

UCSFChimera es un programa para la visualización interactiva y el análisis de estructuras moleculares y datos relacionados, incluidos mapas de densidad, trayectorias y alineaciones de secuencias. El modelo de la proteína GIGAPDH-I de *G. lamblia* predicho por MODELLER9.24 fue visualizado usando este software.

6.7.4 PDBsum®

Es un servidor web que proporciona información estructural sobre las entradas en Protein Data Bank (PDB). Los análisis se basan principalmente en imágenes e incluyen estructura secundaria de proteínas, interacciones proteína-ligando y proteína-ADN y análisis PROCHECK de calidad estructural. Se utilizó para validar el modelo por homología y construir el diagrama de Ramachandran de la proteína GIGAPDH-I de *G. lamblia*.

6.7.5 Origin 8.0®

Origin 8.0® es un software para análisis de datos y genera gráficos, en el que se analizaron las mediciones cinéticas, se trazaron los espectros de dicroísmo circular, se obtuvo la T_m

(ajustando los datos de estabilidad térmica con la ecuación de Boltzmann) y se trazaron los espectros de fluorescencia.

6.8 Análisis bioinformático entre las secuencias GIGAPDH-I y GIGAPDH-II

Se realizó un análisis bioinformático de las dos secuencias que codifican para GAPDH en *G. lamblia*, se confirmó la longitud de los aa, la secuencia de los motivos conservados y el porcentaje de identidad al compararse entre ellas. Los genes se consultaron en la base de datos del genoma de *Giardia* (<http://giardiadb.org/giardiadb/>) con los números de acceso GL50803_6687 y GL50803_17043 para GAPDH-I y GAPDH-II, respectivamente [34]. Se efectuó un BLASTp utilizando la base de datos UniprotKB/Swiss-Prot de Uniprot (<https://www.uniprot.org/blast/>) de la secuencia GIGAPDH-I y se identificaron varias de las regiones características de las GAPDH.

6.9 Extracción de ARN

Los trofozoítos se recolectaron como se describió en el numeral 6.2.1 y previo a la extracción de ARN, se colocaron en hielo durante 20 minutos, seguido de tres lavados con PBS estéril. El ARN total de *G. lamblia* fue extraído a partir de 1×10^7 trofozoítos, con un método de alta calidad adecuado para la secuenciación de ARN [41], utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, EE. UU.), conforme los siguientes pasos:

- Homogenización: 1 mL de Trizol y glucógeno se agregaron a una concentración final de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, esta solución se mezcló pasando por una aguja de calibre 26G, la operación se repitió 10 veces hasta obtener una solución homogénea, luego se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la solución se centrifugó durante 5 minutos a $12,000 \times g$, a 4°C , para eliminar los restos celulares.
- Separación: El sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.5 mL, se adicionaron 0.2 mL de cloroformo, se mezcló por inversión y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Esta solución se centrifugó posteriormente durante 15 minutos a $12,000 \times g$, a 4°C .
- Precipitación: Se trasladó la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 mL, se agregaron 0.5 mL de isopropanol frío, el tubo se mezcló por inversión y la mezcla se incubó durante 10 minutos a 4°C . El ARN fue precipitado por centrifugación a $12,000 \times g$, 4°C , durante 10 minutos.

- Lavado ARN: Se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 1 mL de etanol frío al 75%, luego se centrifugó de nuevo a 12,000 × g, 4 ° C, durante 5 minutos y el sobrenadante se removió.
- Resuspensión de ARN: el sedimento de ARN se dejó secar y se resuspendió en 30 µL de agua libre de ARNasa. El ARN se almacenó a -70 ° C hasta su uso.

El ARN se cuantificó con el equipo NanoDrop y la integridad del ARN extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

6.10 Síntesis de ADNc por RT-PCR

El ARN extraído (1 µg) se trató con 1U de DNasa I (Thermo Scientific®). Para la obtención del ADNc (ADN complementario) se utilizó la técnica de transcriptasa reversa (RT-PCR). En la técnica de RT-PCR el ARN es copiado a ADNc por la transcriptasa reversa. Para la síntesis se utilizaron ARN (100 ng/µL), cebadores oligo (dT)₁₈, una mezcla de dNTP [10 mM] y una polimerasa transcriptasa reversa (Thermo Scientific®) en un volumen final de 20 µL. La reacción se incubó a 42 °C durante 60 minutos y luego se detuvo calentando a 70 °C durante 10 minutos. Los pasos de la técnica de transcripción reversa fueron los siguientes:

- 1- El cebador oligo (dT)₁₈ se unió a la secuencia del ARN que previamente fue extraído.
- 2- La polimerasa transcriptasa reversa, catalizó la extensión del cebador mediante la adición de nucleótidos.
- 3- Se obtuvo el ADNc.
- 4- Posteriormente se amplificó la secuencia codificante de GIGAPDH-I y GIGAPDH-II a partir del ADNc de *G. lamblia* mediante PCR. La secuencia para el diseño de los oligonucleótidos empleados para ambos genes se obtuvo de la base de datos del genoma de *Giardia* (<http://giardiadb.org/giardiadb/>), GL50803_6687 (1011 pb) del gen *Glgapdh-I* y GL50803_17043 (1224 pb). Los oligonucleótidos utilizados se observan en las tablas 7 y 8, las bases subrayadas indican los sitios de corte para *NdeI* y *BamHI*, respectivamente:

Tabla 4. Oligonucleótidos GL50803_6687.

GL50803_6687 (1011 pb)

Forward: 5'-TTACATATGCCTATTCGCCTCGG-3'

Reverse: 5'-TATGGATCCTTAGCAGCCCTTGAC-3'

Tabla 5. Oligonucleótidos GL50803_17043.

GL50803_17043 (1224 pb)

Forward: 5'-CATATGTCGGCCCCGAAG-3'

Reverse: 5'-GGATCCTCACTTAGAAGAGCCGA-3'

Para la PCR se usó la siguiente mezcla de reacción: 20 ng de ADNc, 200 ng de oligonucleótido, dNTP [10mM], tampón de PCR 1x y 1U de ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Thermo Scientific, Hudson, NH, EE. UU.). Las condiciones del termociclador se describen en la tabla 9:

Tabla 6. Condiciones del termociclador RT-PCR.

Ciclo	Fase	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización	98°C	2 min
25 ciclos	Desnaturalización	98°C	35 s
	Hibridación	65°C	20 s
	Extensión	72°C	30 s
1	Extensión	72°C	5 min

El producto de la PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, se tiñó con GelRed (Nucleic Acid Gel, Biotium, Fremont, CA, EE. UU.) Y se visualizó en un MultiDoc-It Digital Imaging System (UVP, Upland, CA, EE. UU.). Los amplicones obtenidos fueron de 1011 pb y 1224 pb.

6.11 Clonación del gen *gigapdh-I*

Los amplicones se insertaron en los vectores pJET1.2/blunt (Thermo Scientific ®) para obtener los vectores pJET-GIGAPDH-I y pJET-GIGAPDH-II, de acuerdo con las instrucciones del fabricante:

- 1- Homogenización: 10 µL de buffer de reacción 2X, 50 ng del producto PCR (amplicón, 1011 pb), 1 µL del vector pJET1.2/blunt [50 ng/µL], 1 µL de ADN ligasa T4 y agua libre de nucleasa en un volumen final de 20 µL, la mezcla se homogeneizó con un vortex.
- 2- Incubación: la mezcla de ligación se incubó a 22 °C durante 5 min.

Posteriormente, de cada plásmido se liberó el gen *gapdh-I* y el gen *gapdh-II* con las enzimas *NdeI*-*Bam*HI y se ligaron a los plásmidos pET3a-HisTEV, previamente digeridos con las mismas enzimas. Los nuevos vectores se denominaron pET3a-GIGAPDH-I y pET3a-GIGAPDH-II (Ilustración 5). Estos vectores añaden una secuencia que codifica una etiqueta de seis histidinas (His) N-terminal, seguida de un sitio de escisión para la enteroquinasa del virus del tabaco (TEVP). Se confirmó la construcción mediante secuenciación (Unidad de síntesis y secuenciación del IBT-UNAM) y se verificó por restricción, visualizándose en un gel de agarosa al 1%.

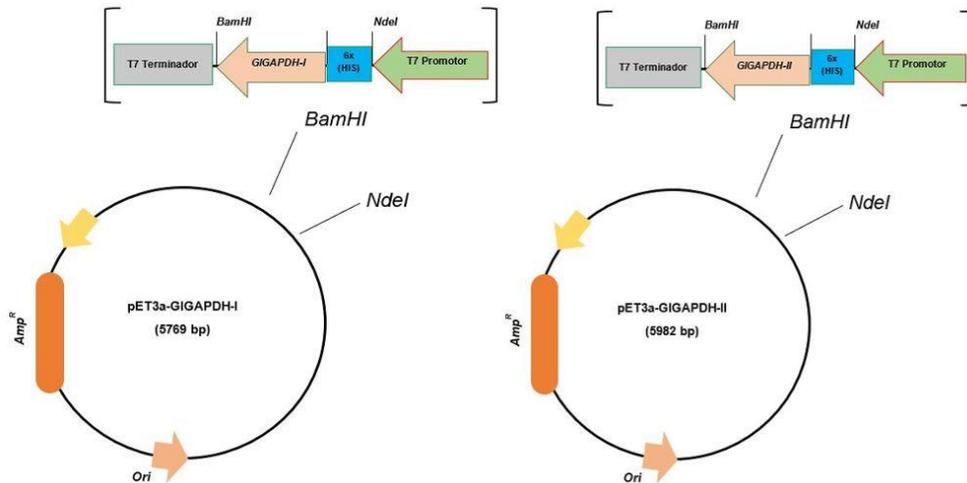


Ilustración 5. Vectores pET3a-GIGAPDH-I y pET3a-GIGAPDH-II.

Tomando en consideración el análisis bioinformático (del presente estudio) y la información existente sobre la activación de la proteína GIGAPDH-II, la cual sólo ocurre en la etapa de enquistamiento, los posteriores métodos se delimitaron a la proteína GIGAPDH-I, objetivo del presente estudio.

6.11.1 Propagación del plásmido pET3a-GIGAPDH-I en *E. coli*.

El plásmido construido pET3a-GIGAPDH-I, se propagó en células de *E. coli* TOP 10F' por choque térmico, de acuerdo con el procedimiento indicado por el fabricante:

- 1- Se descongeló en hielo un vial de 50 μ L de células *E. coli* TOP 10F' One Shot® para la transformación.

- 2- Se mezclaron 5 μL de la solución de ligación (que contenía el vector pET3a-GIGAPDH-I) con 50 μL de bacterias *E. coli* TOP 10F', agitando suavemente sin pipeteo.
- 3- Se incubó durante 10 minutos a 4°C, posteriormente durante 5 minutos a 42°C y, por último, 10 minutos a 4°C.
- 4- Se añadieron 500 μL de medio LB y se agitó a 225 rpm durante 1 hora a 37 °C.
- 5- El cultivo se centrifugó durante 1 min, después al pellet bacteriano se le adicionaron 200 μL de medio LB, se homogenizó y se transfirió a placas Petri con medio sólido LB conteniendo ampicilina/IPTG/X-Gal. Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

El cribado de las células transformadas se realizó mediante selección por antibiótico (ampicilina). Las colonias seleccionadas se transfirieron a 10 mL de medio LB que contenía ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

6.11.2 Extracción de ADN plasmídico

El ADN plasmídico fue extraído de las células *E. coli* TOP 10F' con el kit GeneJET Plasmid Miniprep de Thermo Scientific®, siguiendo las especificaciones del fabricante:

- 1- Centrifugación: Se tomó una alícuota de 2 mL del medio LB (ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que contenía las células *E. coli* TOP 10F' transformadas en un tubo Eppendorf y posteriormente se centrifugó a 6,800 $\times g$, durante 2 minutos a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante.
- 2- Resuspensión, lisado y neutralizado de células: Se adicionaron 250 μL de solución de resuspensión, se agitó con vortex. Después se agregaron 250 μL de solución de lisis, se mezcló por inversión cinco veces y por último se adicionaron 250 μL de solución de neutralización. Se mezcló por inversión cinco veces el tubo y se centrifugó a 6,800 $\times g$, durante 5 minutos.
- 3- Se transfirió el sobrenadante a la columna de centrifugación GeneJET, por decantación, evitando transferir el precipitado blanco.
- 4- Lavado de la columna: Se añadieron 500 μL de solución de lavado y se centrifugó a 6,800 $\times g$, durante 30 segundos; este paso se repitió dos veces. Se desechó el flujo continuo. Y se centrifugó la columna vacía a 6,800 $\times g$, durante 1 minuto.
- 5- Elución del ADN purificado: Se transfirió la columna a un nuevo tubo. Se añadieron 50 μL de tampón de elución a la columna y se incubó durante 2 minutos a

temperatura ambiente. Se centrifugó a $6,800 \times g$, durante 2 minutos. Se desechó la columna y se almacenó el ADN plasmídico purificado a -20°C .

6.12 Cultivo de *E. coli* y expresión de la proteína recombinante GIGAPDH-I

Para lograr la expresión de la proteína GIGAPDH-I, se utilizó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, la cual se transformó con el plásmido pET3a-GIGAPDH-I, mediante choque térmico, conforme al numeral 6.12.1 con la diferencia de la adición de $34 \mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol en la etapa 5.

Posteriormente, se transfirió un clon de las células transformadas cultivadas en una placa Petri a un tubo con 8 mL de medio Luria Bertani (LB) que contenía ampicilina ($100 \mu\text{g/mL}$), las células se cultivaron con agitación durante la noche a 37°C , y posteriormente, las células se conservaron en glicerol (40%) a -70°C . Estas células preservadas sirvieron para inocular matraces con 50 mL de medio LB (ampicilina $100 \mu\text{g/mL}$). El cultivo se hizo crecer con agitación (180 rpm) durante la noche a 37°C ; Después, se inoculó todo el cultivo en 1 L de medio LB (suplementado con $100 \mu\text{g/mL}$ de ampicilina), el cultivo se colocó nuevamente en agitación durante 16 horas a 30°C , hasta obtener una densidad óptica de $A_{600\text{nm}} = 0.8$, se añadió el isopropil β -d-galactopiranosido (IPTG) para inducir la expresión de la proteína en el cultivo (concentración final de 0.4 mM), y se incubó a 30°C durante 12 horas [42].

6.13 Purificación de la proteína recombinante GIGAPDH-I

Se purificó la GIGAPDH-I a partir de 1 L de cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, conforme el siguiente procedimiento:

- 1- Las células se concentraron por centrifugación ($4,000 \times g$ durante 20 min a 4°C). El sedimento celular se resuspendió en buffer para lisis¹ y después se rompió mediante sonicación en hielo, para una posterior centrifugación.
- 2- El lisado obtenido se centrifugó durante 20 min a $15,000 \times g$, a 4°C y el sobrenadante (denominado extracto crudo) se utilizó para purificar la GIGAPDH-I mediante Cromatografía de Afinidad Metálica Inmovilizada (IMAC), utilizando como

¹ Buffer de lisis: Tris [50 mM], NaCl [50 mM], β -mercaptoetanol [5 mM] y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) [1 mM], pH 8.0.

fase estacionaria la Resina Profinity™ IMAC, cargada con níquel (Bio-Rad, EE. UU.) [42], acorde con lo siguiente:

- Se preparó el empaque de la columna usando 3 mL de resina Profinity™ IMAC según instrucciones del manual.
- La resina se cargó con níquel como indica el manual, equilibrando al final con la solución buffer pH 8.0².
- El extracto crudo se cargó en la resina para permitir la interacción de la proteína con el ión de níquel, luego de lavar la resina con buffer³. La proteína GAPDH se eluyó con el mismo buffer pero con una concentración 250 mM de imidazol. Finalmente, el imidazol se eliminó de la muestra mediante pasos consecutivos de dilución diez veces mayor, con Tris-HCl [50 mM] a pH 8.0 y NaCl [50 mM], por concentración en tubos Amicon YM-30 (Millipore, MA, EE. UU.) [43].

Las fracciones obtenidas (lisado y extracto crudo) y la GIGAPDH-I recombinante purificada se cargaron y analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12%. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal (R-250) (Sigma-Aldrich), lo que permitió observar la pureza de la proteína GAPDH-I purificada. Las concentraciones de proteínas se cuantificaron mediante el método de Lowry y utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como proteína estándar [44].

6.14 Ensayo de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

La técnica empleada para determinar la actividad enzimática de la GIGAPDH-I por espectrofotometría [45], se describe a continuación:

- El grado de conversión enzimática de G3P en 1,3-BPG se midió controlando la conversión de NAD⁺ en NADH a 340 nm en un espectrofotómetro Varian Cary® 50 UV-Vis.
- La cubeta de reacción contenía un volumen total de 500 µL de buffer de reacción⁴.
- La reacción se inició mediante la adición de proteína recombinante GIGAPDH-I.
- La actividad enzimática se calculó a partir de la pendiente inicial de la curva obtenida durante 60 segundos de reacción.

² Solución buffer pH 8.0: Tris [50 mM], NaCl [150 mM].

³ Buffer: Tris-HCl [50 mM], NaCl [150 mM], imidazol [50 mM], DTT [2 mM], pH 8.0.

⁴ Buffer de reacción: Tris-HCl [50 mM], ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) [1 mM], β-mercaptoetanol [1 mM], G3P [1 mM], NAD⁺ [5 mM] y pirofosfato de sodio [30 mM].

6.15 Filtración analítica en gel de GIGAPDH-I

Se realizó cromatografía de filtración en gel para determinar el estado nativo de la proteína recombinante GIGAPDH-I.

- 1- La proteína GIGAPDH-I purificada se cargó en una columna de filtración en gel Sephacryl 200 (16/60), que se equilibró previamente con buffer de fosfato [50 mM] pH 7.35.
- 2- Se acopló a un sistema FPLC puro AKTA (GE Healthcare, EE. UU.) [39], la proteína se eluyó usando un gradiente isocrático con la misma solución buffer, con un flujo de 0.5 mL por minuto.

Se utilizaron los estándares de filtración en gel de Bio-Rad (EE. UU.). Para la proteína GIGAPDH-I y las proteínas utilizadas como estándares, se monitoreó la absorbancia a 280 nm (mUA). El ensayo se realizó por triplicado. Se construyó una curva de calibración de las proteínas con volúmenes de elución vs logaritmo de masa molecular (MW) del estándar de filtración en gel de Bio-Rad.

6.16 Efecto del pH y la desnaturalización térmica sobre la actividad de la GIGAPDH-I

La dependencia del pH sobre la actividad enzimática se determinó en diferentes tampones [50 mM], con valores de pH como MES (pH 5-6,5), HEPES (pH 6,5-8), TAPS (pH 8-10) [39]. La actividad del perfil de pH de GIGAPDH-I se determinó midiendo la conversión de NAD⁺ en NADH + H⁺ a 340 nm.

- La proteína (0.2 mg/mL) se suspendió en cada tampón y la reacción se inició con la adición de G3P [1 mM], NAD⁺ [5 mM] y pirofosfato de sodio [30 mM] [45].
- Las velocidades iniciales se calcularon a partir de la pendiente inicial de la curva obtenida durante 60 segundos de reacción.
- La reducción no enzimática de NAD⁺ se midió en cada valor de pH y se restó del punto experimental.

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la actividad de la proteína GIGAPDH-I mediante la realización de un ensayo de inactivación térmica:

- 1- La proteína se ajustó a 0.2 mg/mL en tampón fosfato [50 mM] pH 7.35 y se incubó a diferentes temperaturas, de 35 °C a 60 °C, durante 20 min.

- 2- Después se midió la actividad residual enzimática, como se describió anteriormente, en el ensayo de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Material y métodos, Sección 6.15).
- 3- La actividad residual se expresó como porcentaje. La actividad de la proteína GIGAPDH-I incubada a 35 °C se estableció en 100%.

Los ensayos de pH y temperatura se realizaron por triplicado.

6.17 Determinación de parámetros cinéticos de GIGAPDH-I

Para la determinación de parámetros cinéticos, como K_m , V_{max} y k_{cat} para G3P y NAD⁺, se utilizaron los valores de pH y temperatura óptimos.

- Las concentraciones de G3P ensayadas fueron de [0.0 mM] a [1.0 mM].
- Las concentraciones de NAD⁺ probadas fueron de [0.01 mM] a [1 mM].
- Los datos de las tasas iniciales se ajustaron mediante regresión no lineal trazando el modelo de Michaelis-Menten.
- Las mediciones cinéticas se analizaron mediante el programa Origin 8.0 ®.

Los experimentos se realizaron por triplicado.

6.18 Espectros de dicroísmo circular (CD) y estabilidad térmica

Para determinar la estructura secundaria de la proteína GIGADPH-I de *G. lamblia*, se realizó un ensayo de dicroísmo circular (CD) utilizando un espectropolarímetro Jasco J-810® (Jasco® Inc., EE. UU.).

- 1- La concentración de proteína utilizada fue de 0.5 mg/mL, que se resuspendió en buffer fosfato [50 mM] pH 7.35 y se cargó en una cubeta de cuarzo (paso óptico de 1 cm).
- 2- A continuación, se registraron masas espectrales a 25 °C, para monitorear los cambios en la elipticidad de la proteína en la región ultravioleta lejana (200–260 nm) como se ha descrito previamente [47]. Además, se utilizó un espectro de emisión en blanco con el tampón fosfato [50 mM] pH 7.35 y se restó del obtenido con la proteína GIGAPDH-I.
- 3- Los espectros finales se trazaron utilizando el programa Origin 8.0 ®.

Los experimentos se realizaron por triplicado.

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la proteína recombinante GIGAPDH-I, se realizó un ensayo de desnaturalización térmica de la GIGAPDH-I monitoreando la elipticidad molar a 222 nm de la fracción desplegada de las hélices α en función de la temperatura, usando un espectropolarímetro Jasco J-810® (Jasco® Inc., EE. UU.), como se ha descrito previamente [48].

- 1- La proteína se ajustó a 0.5 mg/mL con buffer fosfato [50 mM] (pH 7.35), y se cargó en una cubeta de cuarzo rectangular (paso óptico de 1 cm).
- 2- Se aumentó la temperatura de 20°C a 90 °C, a una velocidad de 1 °C/2.5 min.
- 3- Finalmente, los datos se ajustaron con la ecuación de Boltzmann, utilizando el programa Origin 8.0 ®, para obtener el valor de la Tm.

Los experimentos se realizaron por triplicado.

6.19 Efecto del clorhidrato de guanidina (Gdn-HCl) sobre la estabilidad de la GIGAPDH-I

Otro enfoque para evaluar la estabilidad de la actividad de la GIGAPDH-I recombinante fue evaluar la presencia de clorhidrato de guanidina (Gdn-HCl).

- 1- Se usaron 0.2 mg/mL de proteína resuspendida en buffer fosfato [50 mM] (pH 7.35), para este ensayo se usaron diferentes concentraciones de Gdn-HCl, de 0 a 0.5 M.
- 2- La mezcla se incubó durante 2 horas a 37 °C [49].
- 3- Se midió la actividad residual de GIGADPH-I a 25 °C, como se describió anteriormente en la Sección 6.14. La actividad residual del control GIGADPH-I (sin Gdn-HCl) se fijó como 100%.

El ensayo se realizó por triplicado.

6.20 Determinación de la fluorescencia intrínseca de GIGAPDH-I

La fluorescencia de la proteína recombinante GIGAPDH-I se determinó en un espectrómetro de fluorescencia Perkin-Elmer LS-55 (Perkin Elmer, EE. UU.).

- 1- La proteína GIGAPDH-I se ajustó a 0.1 mg/mL con buffer fosfato [50 mM] (pH 7.35) y se incubó a 37 °C durante 2 horas, con diferentes concentraciones de Gdn-HCl (de 0 a 0.5 M).
- 2- Las muestras se cargaron en una celda de cuarzo con una longitud de recorrido de 1 cm.

- 3- La fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófano presentes en la proteína se registró de 310 a 500 nm, a 25 °C, utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm, con ranuras de 4.5 y 3.7 nm para la excitación y la emisión, respectivamente.
- 4- El espectro final a diferentes concentraciones de Gdn-HCl fue el promedio de cinco exploraciones, y de cada espectro se restó el espectro en blanco [49].
- 5- Los espectros finales se trazaron utilizando el programa Origin 8.0 ®.

Los experimentos se realizaron por triplicado.

6.21 Modelado por similitud de la proteína GIGAPDH-I

El modelado de la proteína GIGAPDH-I de *G. lamblia* se llevó a cabo conforme lo siguiente:

- 1- La secuencia GIGAPDH-I se envió a la herramienta BLAST del NCBI para identificar los homólogos estrechamente relacionados de GIGAPDH-I utilizando el algoritmo BLASTp (una base de datos) del banco de datos de proteínas y la matriz BLOSUM 62 (Anexo 1-B y 2-B) .
- 2- La estructura cristalina de la GAPDH de *Cryptosporidium parvum* (PDB 1VSU) [50] fue seleccionada como el molde para el modelado de similitud, ya que tuvo un mayor porcentaje de identidad (Anexo 3-B).
- 3- La estructura GIGAPDH-I se modeló utilizando la información cristalográfica de CpGAPDH utilizando el software MODELLER 9.24 [51]. El mejor modelo se seleccionó de acuerdo con los parámetros estadísticos GMQE, QSQE y QMEAN. El modelo predicho fue validado por alineación de estructura usando UCSFChimera 1.14 [52] y herramientas PDBsum [53].
- 4- El PDBsum se utilizó para construir el diagrama de Ramachandran y poder visualizar los ángulos diedros de la columna vertebral ψ contra ϕ de los residuos de aminoácidos en la estructura del modelo.
- 5- Se usó Chimera para la predicción de Q-score y la desviación cuadrática media (RMSD), que se calcularon alineando el molde CpGAPDH y el modelo construido GIGAPDH I. Si los valores Q-score y RMSD son altos y bajos, respectivamente, entonces la estructura es aceptable. Las representaciones gráficas se realizaron con el software Chimera.

- 6- Se realizó un alineamiento de secuencia (en Mview) y estructura (en Chimera) entre la proteína GIGAPDH-I y HsGAPDH de *Homo sapiens* (PDB 1ZNQ), obteniendo la predicción de Q-score y la desviación cuadrática media (RMSD).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis bioinformático de GIGAPDH-I y GIGAPDH-II.

El análisis de los dos genes que codifican para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de *Giardia lamblia*, confirmó las secuencias previamente publicadas [34]. Al comparar las secuencias entre sí, empleando Mview(www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mview/) se obtuvo un 48.3 % de identidad. La enzima GIGAPDH-I está compuesta por 336 aa, mientras que GIGAPDH-II contiene 407 aa, y al analizar las secuencias con mayor detalle se identificaron cinco motivos de aminoácidos característicos en las GAPDHs (Ilustración 6, recuadros amarillos), presentes en *Caenorhabditis elegans* [54], *Fasciola hepatica* [63] y *Fasciola gigantica* [67]. La mayor conservación de estas regiones se encontró en la GIGAPDH-I, mientras que en la secuencia de GIGAPDH-II varios de esos aa difieren en las regiones indicadas (recuadros amarillos) en el alineamiento. Estas diferencias entre las secuencias de proteínas (GIGAPDH-I y GIGAPDH-II) también se observaron en los 24 aa que forman el loop-S (indicado con asteriscos), característico de las GAPDH. La secuencia de aa que mostró similitud entre ambas proteínas fue la del sitio activo (recuadro rojo), incluida en uno de los motivos identificados.

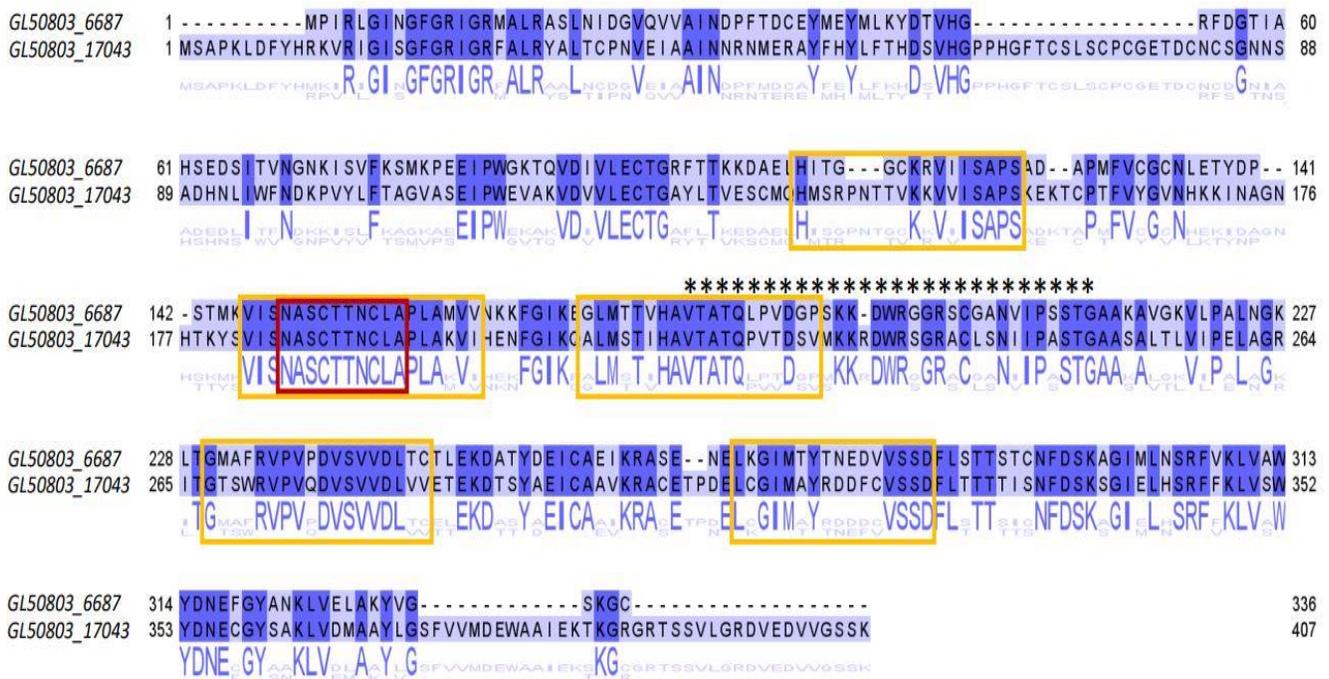


Ilustración 6. Alineamiento de secuencias (GIGAPDH-I y GIGAPDH-II), en Jalview.

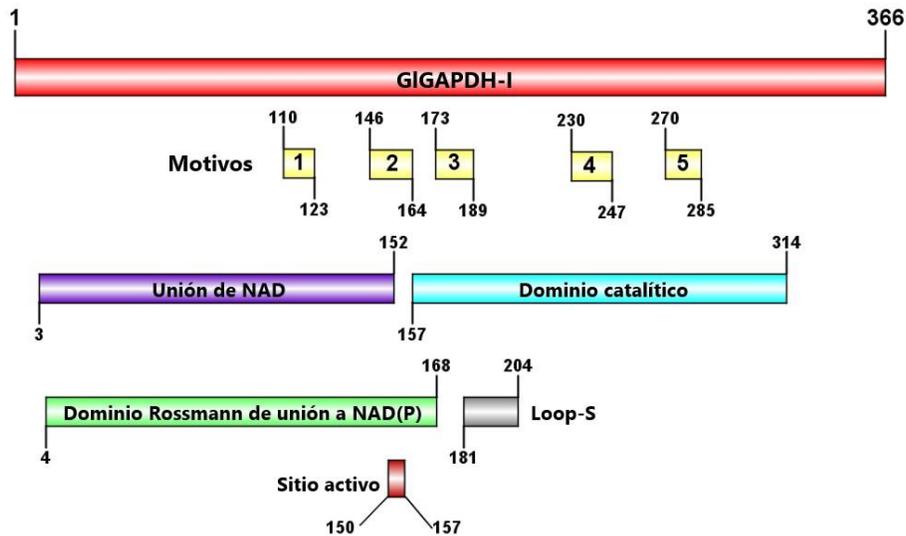


Ilustración 7. GIGAPDH-I (regiones conservadas características de GAPDHs)

Se realizó un BLASTp utilizando la base de datos UniprotKB/Swiss-Prot de Uniprot (<https://www.uniprot.org/blast/>) de la secuencia GIGAPDH-I y se identificaron varias de las regiones características de las GAPDH (Ilustración 7). Las dos regiones principales, como la unión de NAD (3-152; el número de aa correspondiente a la secuencia de la proteína GAPDH-I de *G. lamblia*) y el dominio catalítico (157-314; número de aa). También se identificó el dominio NAD(P)-Rossmann (4-168; número aa), el loop-S (181-204; número aa) y el sitio activo (150-157; número aa) (Ilustración 7).

7.2 Extracción de ARN y síntesis de ADNc por RT-PCR.

La extracción de ARN total presentó un ARN íntegro, con una concentración de 1982 ng/μL, una relación 260 nm/280 nm de 2.01 y una relación 260 nm/230 nm de 2.09 (Ilustración 8).

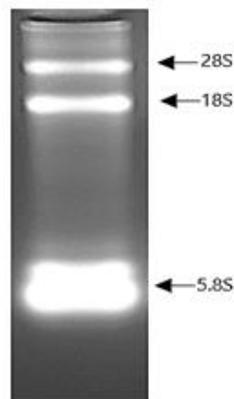


Ilustración 8. Electroforesis del ARN total obtenido trofozoítos de *Giardia lamblia*. Gel de agarosa al 1%.

El ARN obtenido se empleó para la síntesis de ADNc por RT-PCR, para amplificar los genes de *gapdh-I* y *gapdh-II* de *G. lamblia*, de 1011 pb y 1224 pb, respectivamente (Ilustración 9).

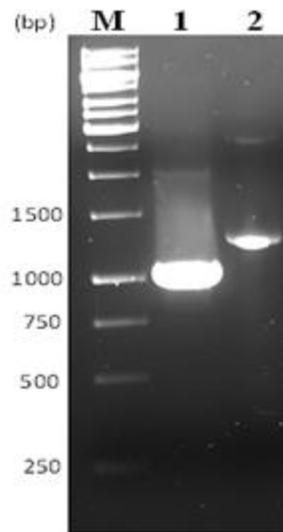


Ilustración 9. Electroforesis del gen *gapdh-I* (carril 1), *gapdh-II* (carril 2) y el marcador de peso molecular (1 kb, Ladder, GeneRuler™) en el carril M.

7.3 Clonación, expresión y purificación de la enzima recombinante GIGAPDH-I.

Para expresar la proteína recombinante GIGAPDH-I, se construyó el plásmido nombrado pET3a-GIGAPDH-I, el cual contiene una etiqueta de seis histidinas N-terminal (6xHis). Para corroborar su correcta clonación y que el gen obtenido por PCR no presentara mutaciones se secuenció en la unidad de síntesis y secuenciación del IBT-UNAM, la ilustración 10 presenta una región de la secuencia obtenida, donde se indica la secuencia nucleotídica que codifica las 6xHis (región que facilita la purificación de la proteína) y el sitio de corte *NdeI* que incluye el codón de inicio ATG del gen. Además, el plásmido se verificó por restricción (Ilustración 11, carril 3).

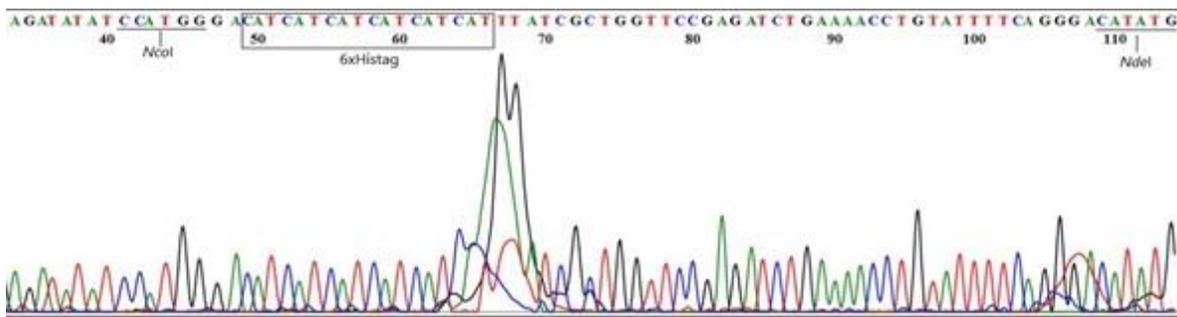


Ilustración 10. Fragmento de la secuencia del plásmido pET3a-GIGAPDH-I, sitio de restricción *NcoI*, etiqueta 6xHistag y sitio *NdeI*.

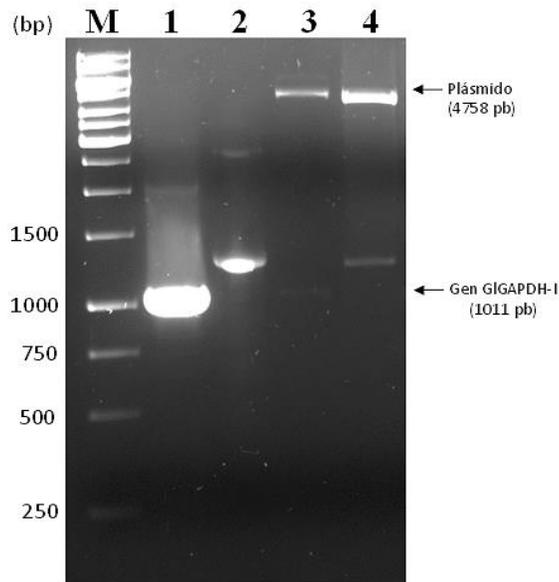


Ilustración 11. Electroforesis en gel de agarosa. Genes obtenidos de GIGAPDH-I (1011 pb, carril 1) y GIGAPDH-II (1224 pb, carril 2) mediante PCR. Vectores construidos pET3a-GIGAPDH-I y pET3a-GIGAPDH-II digeridos con las enzimas NdeI-BamHI (carril 3 y 4 respectivamente) y el marcador de peso molecular (1 kb DNA Ladder, GeneRuler™) en el carril M.

Posteriormente se realizó un BLAST de la secuencia del plásmido pET3a-GIGAPDH-I que se obtuvo del IBT-UNAM, para corroborar que el gen GIGAPDH-I se clonó en el vector de forma exitosa (Anexo C).

Los estudios de expresión en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS revelaron que la proteína GIGAPDH-I se produjo en forma soluble en las condiciones de cultivo mencionadas en la Sección 6.13, lo que permitió purificar la proteína mediante un procedimiento simple por cromatografía de afinidad (resina cargada con Ni). La fracción de lisado, el extracto crudo y la proteína recombinante GIGAPDH-I se visualizaron mediante SDS-PAGE (Ilustración 12). La enzima purificada se observó en el gel SDS-PAGE como una única banda correspondiente a un monómero de aproximadamente 39 kDa (Ilustración 12, carril 3) (36.3 kDa de proteína GIGADPH-I más 2.7 kDa de (6xHistag), que también coincide con la masa molecular teórica calculada de 36.3 kDa y el punto isoeléctrico de 6.8 (https://web.expasy.org/compute_pi/) (Anexo D).

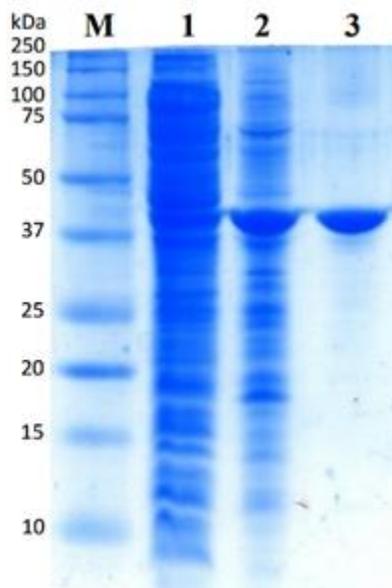


Ilustración 12. Gel SDS-PAGE, fracción de lisado (carril 1), el extracto crudo (carril 2), la enzima recombinante GIGAPDH-I (carril 3) y el marcador de peso molecular (250 kDa, Bio-Rad, Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™) en el carril M.

Esta forma monomérica obtenida de la GIGAPDH-I concuerda con otras GAPDH descritas para otros organismos, en bacterias, como *Bacillus cereus* (35 kDa) [55], *Streptococcus agalactiae* (45 kDa) [56], *Xanthomonas campestris* (38 kDa) [57], *Idiomarina loihiensis* (36 kDa) [58], *Mycobacterium tuberculosis* (40 kDa) [59], la arquea *Haloferax volcanii* (38 kDa) [60] y eucariotas patógenos como *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* (38 kDa) [61], *Trypanosoma cruzi* (45 kDa) [62], *Fasciola hepatica* (37 kDa) [63] y *Plasmodium falciparum* (36 kDa) [64].

7.4 Estado nativo de la proteína recombinante GIGAPDH-I

El estado nativo de la enzima GIGAPDH-I recombinante en solución se determinó mediante cromatografía de filtración en gel (Ilustración 13). La columna se calibró con marcadores de peso molecular (MW) y, cuando se correlacionó con los estándares usados (Bio-Rad) (Ilustración 14), la composición oligomérica nativa resultó en un valor de aproximadamente 125 kDa, lo que indica que esta proteína corresponde a un tetrámero nativo.

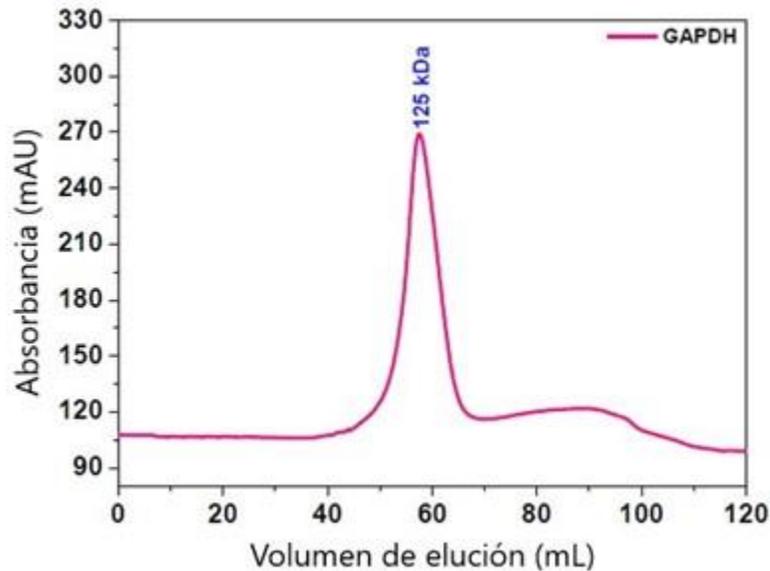


Ilustración 13. Perfil del estado nativo de la enzima recombinante GIGAPDH-I.

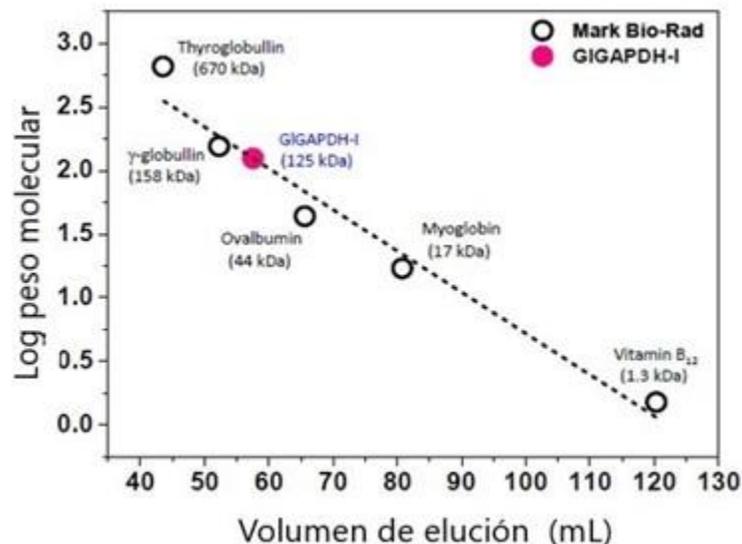


Ilustración 14. Curva de calibración de las proteínas vs logaritmo de masa molecular (MW) del estándar de filtración en gel de Bio-Rad. El MW de GIGAPDH-I (círculo rosa) se muestra en la línea recta obtenida.

Este resultado concuerda con los datos reportados previamente, ya que se ha demostrado que la mayoría de los organismos forman tetrámeros de 140 a 180 kDa [60], [64],[65] con la excepción de *Streptomyces arenae*, que forma un octámero [66]. En *Fasciola hepatica* se observó la relevancia de los ligandos en relación con FhGAPDH, ya que en ausencia de ligandos existe una mezcla de dímeros y tetrámeros, pero la presencia de NAD⁺ o G3P favorece al desplazamiento de este equilibrio para la formación de dímeros. También se demostró que como dímero es más estable que como tetrámero [63]; mientras que en la

proteína GAPDH de *Fasciola gigantica*, en una concentración 300 mM de NaCl, se estabiliza su estado tetramérico sin cambiar a la forma dímera [67].

7.5 Efecto del pH y la desnaturalización térmica sobre la actividad de la GIGAPDH-I

Para determinar el efecto del pH sobre la actividad de la proteína GIGAPDH-I recombinante purificada, se midió la actividad en un intervalo de pH de 6 a 10. De acuerdo al perfil de actividad, la GIGAPDH-I muestra un valor de pH óptimo de 7.7 y por debajo de este valor de pH, la enzima muestra una pérdida significativa de su actividad. Sin embargo, a valores de pH más altos (de 9,0 a 10,0), la enzima también mostró un ligero incremento en actividad de al menos el 50% (Ilustración 15).

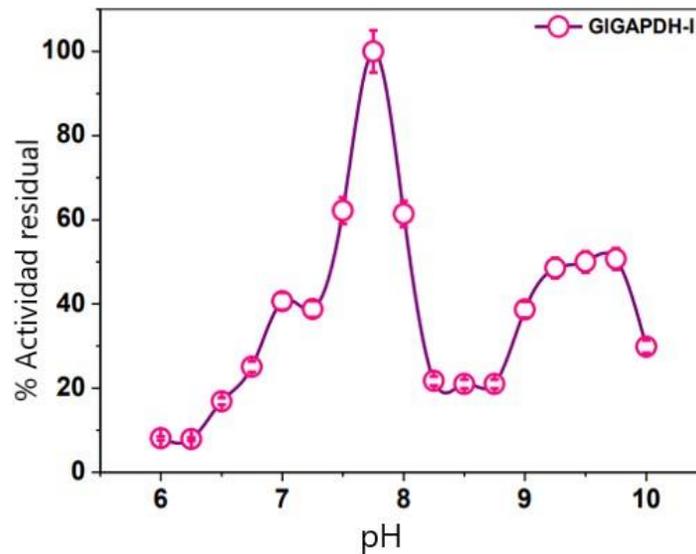


Ilustración 15. Perfil de actividad, pH vs actividad residual de GIGAPDH-I.

El valor de pH registrado para GIGAPDH-I se acerca a los valores de pH de otras GAPDHs, con un rango de 7.0 y 10.0, aunque la mayoría se ha reportado entre pH 8.0 y 9.0, de los cuales podemos mencionar los siguientes: *Proteus vulgaris* pH 7.5 [68], *Naegleria gruberi* pH 8,0 [45], *Homo sapiens* pH 8.5 [69], *Idiomarina loihiensis* pH 8,0–8,5 [58], *Micobacterium tuberculosis* pH 9.0 [59], *Trypanosoma brucei* pH 9.4 [61], *Trypanosoma cruzi* pH 8.6 [62], con excepción en los parásitos *Plasmodium yoelii* y *Xanthomonas campestris* donde sus pH óptimos de actividad fueron 9.0 y 9.5, respectivamente [64] y [57].

También se determinó la termoestabilidad de la proteína midiendo su actividad residual después de incubar la enzima en un gradiente de temperatura de 35 a 60 °C. La actividad más alta de la enzima GIGAPDH-I se observó a 35 °C y 37 °C (Ilustración 16), muy similar a la GAPDH de *P. vulgaris* (35 - 37 °C) [68], y de acuerdo con las temperaturas óptimas descritas anteriormente para *T. cruzi* [62].

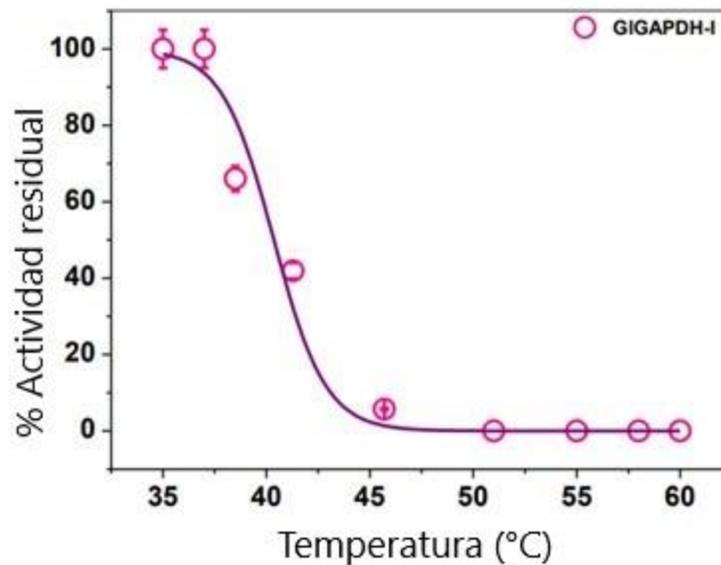


Ilustración 16. Perfil de termoestabilidad, Temperatura (°C) vs % actividad residual de GIGAPDH-I.

Sin embargo, este hallazgo es diferente a la temperatura óptima reportada para *Idiomarina loihiensis* (30-45 °C) [58], *Naegleria gruberi* (25 °C) [45] y *Homo sapiens* (43 °C) [69]. El valor T 1/2 definido como la temperatura a la que GIGAPDH-I donde la enzima pierde el 50% de su actividad original fue de 40.28 °C. Mientras que la inactivación térmica de la enzima se produjo por encima de 38 °C y la actividad disminuyó drásticamente a 45 °C, lo que puede estar relacionado con cambios en el plegamiento de la proteína causado por el efecto de la temperatura y llevando por consiguiente a la pérdida de su funcionalidad. Se considera que, durante el calentamiento la proteína GIGADPH-I formada por tetrámeros puede disociarse a dímeros y luego a monómeros, afectando la estructura de la proteína y por tanto su forma activa. Incluso el aumento de temperatura conduce a una desnaturalización rápida de la proteína, seguida de su agregación, tal como se describió anteriormente para la GAPDH de *T. cruzi* [62].

7.6 Parámetros cinéticos K_m , V_{max} , K_{cat} de la enzima GIGADPH-I.

La actividad enzimática de GIGADPH-I se midió mediante espectrofotometría UV-visible, lo que permitió determinar los parámetros cinéticos. Los valores de K_m y V_{max} se obtuvieron de la dependencia de la velocidad de reacción de la concentración del sustrato G3P y la coenzima NAD^+ (Anexo E). Para determinar el valor de K_m de ambos sustratos, se realizaron mediciones de velocidad inicial variando la concentración de un sustrato (G3P o NAD^+) y manteniendo constante la cantidad del segundo sustrato (G3P o NAD^+). Se observó un comportamiento hiperbólico de la enzima GIGADPH-I para el sustrato G3P (Ilustración 17) y la coenzima NAD^+ (Ilustración 18), y los valores se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten mediante cálculos de regresión no lineal. Los parámetros obtenidos fueron los siguientes: K_m G3P = 0.41 mM (Ilustración 17) y K_m NAD^+ = 0.02 mM (Ilustración 18).

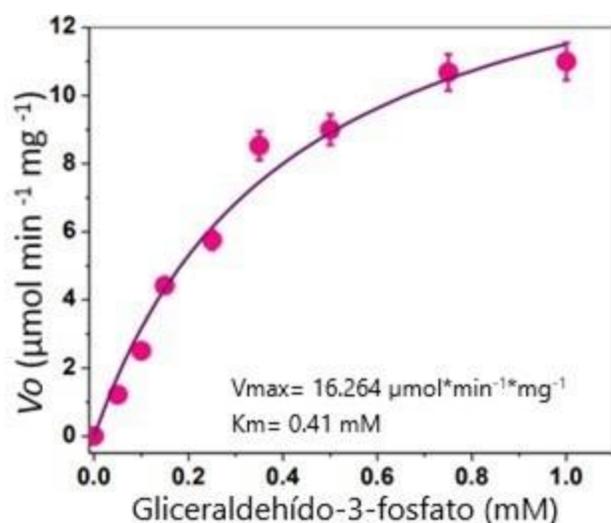


Ilustración 17. Velocidad de reacción a diferentes concentraciones de G3P, de GIGADPH-I.

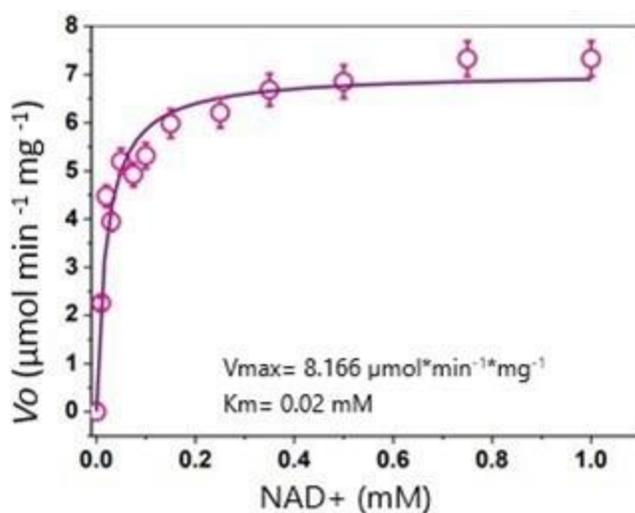


Ilustración 18. Velocidad de reacción a diferentes concentraciones de NAD^+ , de GIGADPH-I.

Comparando estos valores con los reportados previamente en diferentes organismos, se observa que la K_m de varias GAPDHs cubre un rango bastante amplio, de 0.003 a 1.78 mM para el sustrato G3P y de 0.005 a 3.68 mM para la coenzima NAD⁺ (Tabla 7).

Tabla 7. Valores cinéticos de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa previamente reportados en diferentes organismos.

Organismo	K_m (G3P mM)	K_m (NAD ⁺ mM)	K_{cat} S ⁻¹	Referencia
<i>Giardia lamblia</i>	0.41	0.02	39.06	Este estudio
<i>Bacillus anthracis</i>	1.78	0.36	*	[70]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	0.09	0.03	*	[70]
<i>Streptococci sp</i>	1.33	0.15	*	[72]
<i>Idiomarina loihiensis</i>	0.003	0.01	*	[58]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0.58	0.13	188.33	[59]
<i>Trypanosoma brucei</i> (glicosoma)	0.15	0.45	*	[71]
<i>T. brucei</i> (citosólica)	0.17	0.04	*	[71]
<i>T. brucei</i> (recombinante)	0.14	0.53	*	[61]
<i>T. cruzi</i> (recombinante)	0.10	0.47	*	[61]
<i>T. cruzi</i> (recombinante)	0.35	0.27	*	[62]
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	0.15	0.005	*	[73]
<i>Naegleria gruberi</i>	0.51	3.68	*	[45]
<i>Plasmodium yoelii</i>	0.25	0.28	*	[64]
<i>Homo sapiens</i>	0.02	0.01	*	[69]

*: No reportado.

El valor de V_{max} de $16.264 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, que se obtuvo de la dependencia de la velocidad de reacción de la concentración de G3P, se utilizó para calcular la constante catalítica K_{cat} , dando como resultado 39.06 s^{-1} (Anexo E), valor que difiere del de *M. tuberculosis* ($K_{cat} = 188.33 \text{ s}^{-1}$) [59], lo que sugiere, que la enzima Mtb-GAPDH de *M. tuberculosis* convierte un mayor número de moléculas de G3P a 1,3-bisfosfoglicerato en un segundo, en comparación con la enzima GIGAPDH-I de *G. lamblia*.

7.7 Estructura secundaria y estabilidad térmica de la GIGADPH-I por dicroísmo circular (CD).

El ensayo de CD se realizó para determinar la estructura secundaria de la proteína GIGAPDH I recombinante. Los espectros obtenidos mostraron una absorción mínima de 208 nm a 222 nm, lo que indica que la proteína GIGAPDH consiste en α -hélices y hojas β . Sin embargo, el pico de absorción negativo más alto se observó a 218 nm en la región de UV lejano (Ilustración 19), que es característico de las proteínas ricas en hojas β [59]. Este

mismo perfil de espectro se mostró en la GAPDH de *Thermotoga maritima* y *Lactobacillus acidophilus*, con picos de absorción a 220 y 215 nm, respectivamente [74],[75].

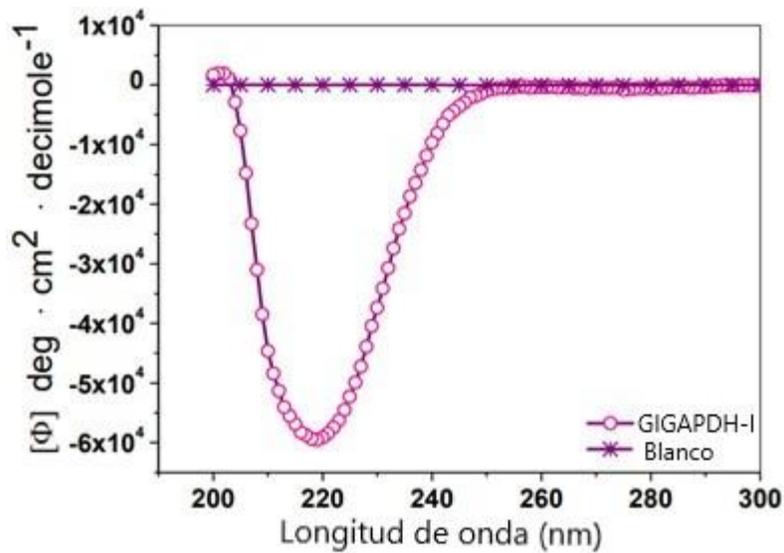


Ilustración 19. Espectro de dicroísmo circular, longitud de onda (nm) vs elipticidad molar.

De igual manera, aprovechamos la técnica de CD para determinar la estabilidad térmica global de la proteína GIGAPDH-I, lo cual se logró monitoreando los cambios en la elipticidad (ϕ) a 218 nm en la estructura de la proteína (pico negativo más alto) a través del aumento gradual de temperatura (desde 20 °C a 90 °C). Como se observa en la Ilustración 20, se obtuvieron espectros de estabilidad térmica de CD, lo que permitió calcular la temperatura (T_m) a la que se desplegaron la mitad de las α -hélices. El valor de T_m para la GIGAPDH-I fue de 54 °C, que fue menos estable que la temperatura descrita (60 °C) para la GAPDH de *L. acidophilus* [75].

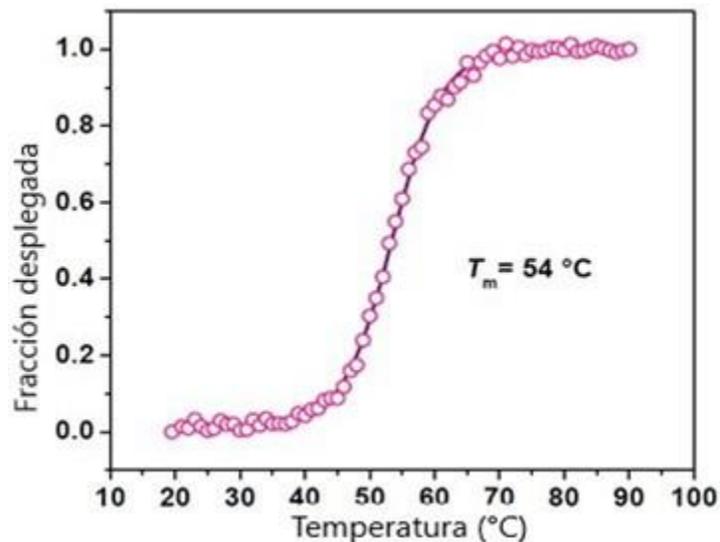


Ilustración 20. Espectro de estabilidad térmica, T (°C) vs fracción desplegada.

7.8 Estabilidad de la proteína GIGAPDH-I en presencia de Gdn-HCl.

Se llevó a cabo un ensayo para evaluar la estabilidad de la proteína GIGAPDH-I en presencia de Gdn-HCl. Este compuesto es un agente caotrópico y es uno de los más utilizados en estudios fisicoquímicos para observar su efecto sobre proteínas, como desnaturalización, estabilidad, desplegamiento y plegamiento [76]. La proteína se incubó con diferentes concentraciones de Gdn-HCl (0 a 0.5 M), se observó (Ilustración 21) que, a medida que aumenta la concentración de Gdn-HCl, hay una disminución sigmoidea de la actividad residual de la GIGAPDH-I; mientras que a 0.5 M la pérdida de actividad fue muy lenta, hasta inhibirse como se ha descrito previamente [77]. A 0.15 M, la actividad disminuyó al 35%, y el valor $[C \frac{1}{2}]$ fue 0.12 M, este último valor difiere del reportado de *Thermotoga maritima* de 2.4 M [74], lo que podría sugerir que la proteína GAPDH de *G. lamblia* es más susceptible a desplegarse con Gdn-HCl que la proteína de *T. maritima*.

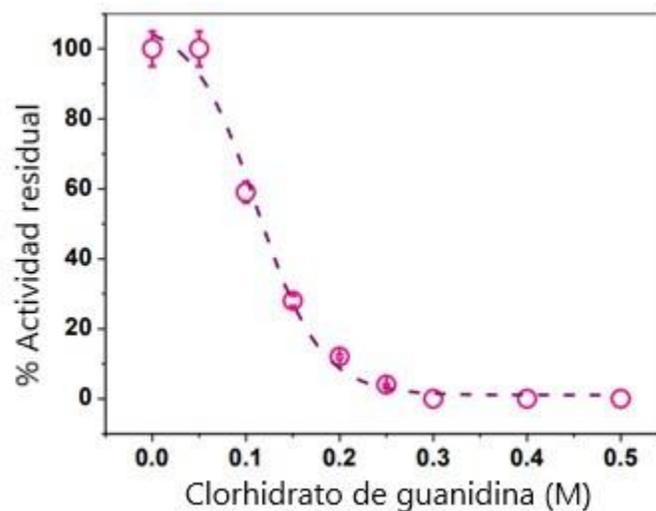


Ilustración 21. Perfil de estabilidad de GIGAPDH-I.

7.9 Análisis estructural mediante fluorescencia intrínseca de la GIGAPDH-I.

Para determinar si la pérdida de actividad con Gdn-HCl se debió a cambios estructurales de la proteína GIGAPDH-I, se realizaron ensayos de fluorescencia intrínseca de los tres residuos de triptófano contenidos en la proteína (por cada monómero). Para ello, la proteína se incubó con diferentes concentraciones de Gdn-HCl (0 a 0.5 M). Los resultados del espectro obtenido de fluorescencia intrínseca (Ilustración 22) muestran que la proteína a [0.4 M] Gdn-HCl emitió un pico a 345 nm, con una intensidad máxima de 325 unidades arbitrarias (a.u).

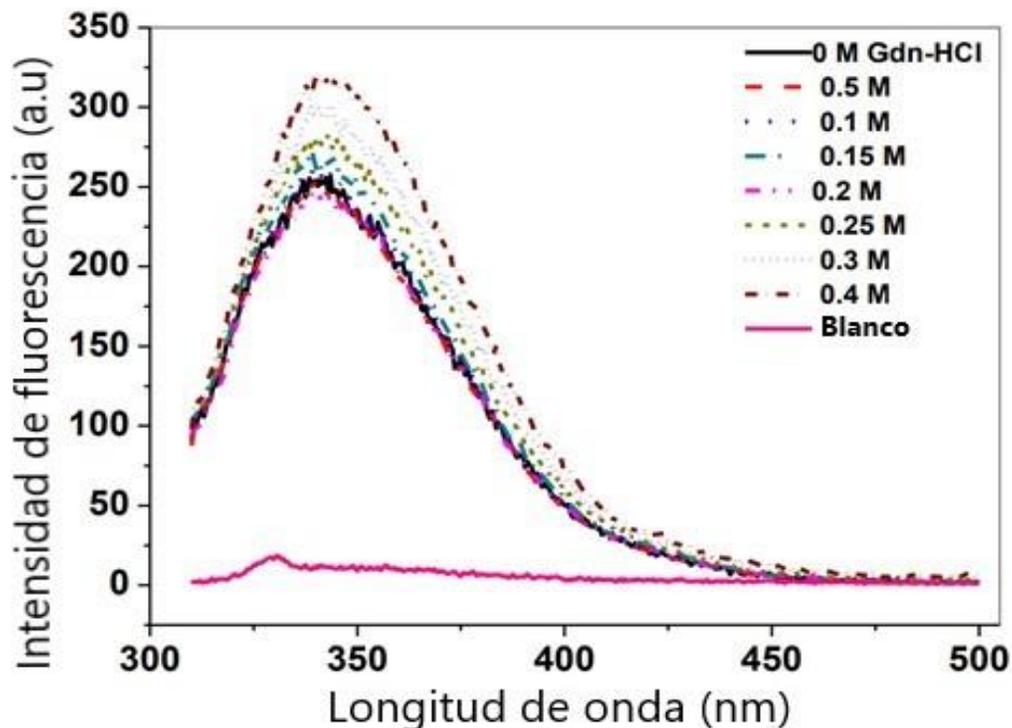


Ilustración 22. Espectro de fluorescencia intrínseca, longitud de onda (nm) vs Intensidad de fluorescencia (a.u).

Estos resultados sugieren que un aumento en la intensidad máxima de la señal de fluorescencia intrínseca de la GIGAPDH-I puede deberse al hecho de que la proteína entró en contacto con Gdn-HCl, ya que a medida que la concentración de Gdn-HCl se incrementó de 0 a 0.4 M, la intensidad de la fluorescencia aumentó (Ilustración 23), contrario a lo reportado para la GAPDH [77]. Esto puede sugerir que la estructura de la proteína se desplegó y los tres residuos de triptófano por monómero en la proteína se expusieron al medio ambiente.

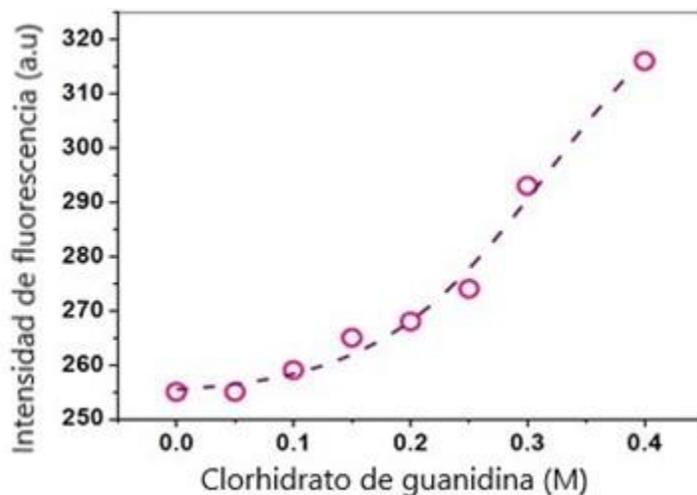


Ilustración 23. Efecto sobre la fluorescencia intrínseca a diferentes concentraciones de Gdn-HCl.

7.10 Modelado por similitud de la proteína GIGAPDH-I

Debido a que no existe reporte de la estructura secundaria de GIGAPDH-I se decidió obtener una predicción de la proteína usando el servidor PSIPRED (Ilustración 24). El resultado reveló que la estructura contiene 13 hélices α , 17 láminas β y 28 conformaciones en helicoide. El modelo obtenido para GIGAPDH-I está de acuerdo con lo observado en el ensayo de CD (estructura secundaria), donde se observó un pico de absorción negativo más alto a 218 nm (ilustración 19), característico de las proteínas ricas en hojas β .



Ilustración 24. Predicción de la estructura secundaria de GIGAPDH-I obtenido con el programa PSIPRED.

Al realizar un BLAST de la proteína y realizar la búsqueda en el protein data bank (PDB) para identificar los homólogos, los resultados revelaron 116 secuencias con más del 40% de identidad. Las estructuras que exhibieron la mayor identidad con GIGAPDH fueron, GAPDH de *Cryptosporidium parvum* con 61.8% (PDB 1VSU) [78], GAPDH de *Homarus americanus* con 61.5% (PDB 1GPD) [79], GAPDH de *Panulirus versicolor* con 61.5% (AP 1CRW) [80], GAPDH de *Homo sapiens* con 60.8% (PDB 1ZNQ) [81] y GAPDH de *Bos Taurus* con 60.2% (AP 4O59) [82]. Por lo tanto, se seleccionó la estructura cristalina de *Cryptosporidium parvum* [78] (rayos X, 2.2 Å) para generar el modelo GIGAPDH-I, ya que presentó el mayor porcentaje de identidad y cobertura en secuencia del 99%.

El modelo se generó con el software Modeller 9.24® y en la estructura que se obtuvo de la proteína GIGAPDH-I se observó en UCSFChimera, con una región conservada de 10 residuos (número de aminoácidos 150-ASCTTNCLAP-159), resaltados en amarillo, Ilustración 25.

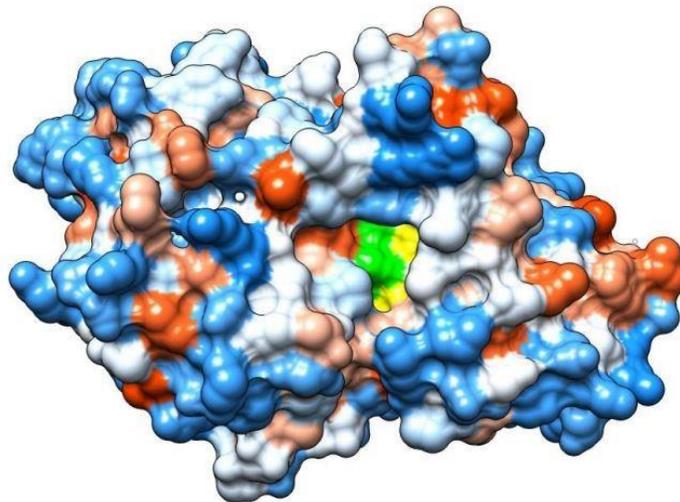


Ilustración 25. Estructura de la proteína GIGAPDH-I obtenida con el software UCSFChimera, fragmento conservado de 10 residuos en amarillo.

Para confirmar el modelo obtenido, se realizó un alineamiento entre GIGAPDH-I (predicción de estructura) y CpGAPDH de *Cryptosporidium parvum* (PDB 1VSU) usando el programa UCSFChimera, donde se obtuvieron las medidas de similitud estructural, con valores de RMSD de 0.444 Å para 320 átomos de C_α (Ilustración 26) y un Q-score de 0.918 con dicho programa.

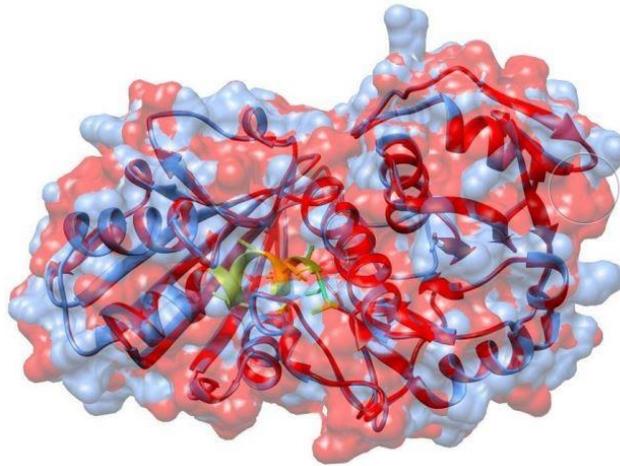


Ilustración 26. Alineamiento estructural entre GIGAPDH-I y CpGAPDH con UCSFChimera.

El plot (gráfico) de energía calculada con UCSFChimera de los residuos de aa sugirió que todos los residuos tenían poca energía, excepto algunos (≈ 30) (Anexo 1-F). Para el análisis estructural del modelo seleccionado se obtuvo un gráfico de Ramachandran (Ilustración 27), el cual reveló que el 90.4% de residuos se encontraban en las regiones más favorecidas, el 7.5% en regiones permitidas adicionales, el 1.4% en regiones permitidas generosamente y 0.7% en regiones no permitidas (Anexo 2-F, estadísticas de Ramachandran).

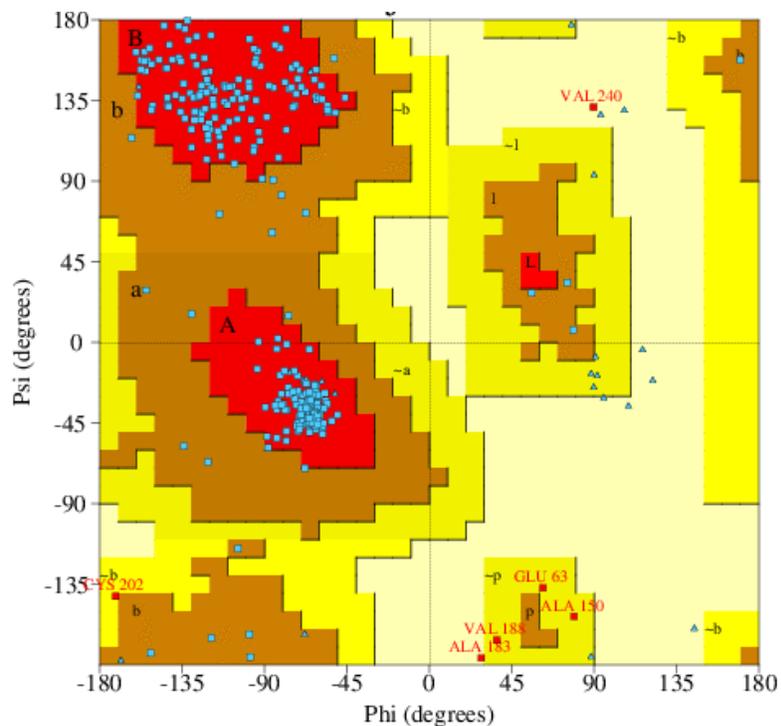


Ilustración 27. Gráfico de Ramachandran del modelo seleccionado para GIGAPDH-I.

El sitio de unión del sustrato se predijo a partir de la estructura PDB de *Geobacillus stearothermophilus* (GsGAPDH), que se co-cristalizó con el sustrato G3P y la coenzima NAD⁺ (PDB 1NQO) [83]. Entonces, para predecir el sitio de unión de NAD⁺ y G3P en el modelo de GIGAPDH-I se superpuso con la de GsGAPDH usando UCSFChimera 1.14, para lograr identificar los aminoácidos involucrados en ambos sitios de unión. Para G3P, los residuos del sitio de unión clave identificados fueron Thr153, His179, Thr182, Asp189 y Arg234, mientras que para NAD⁺, los residuos del sitio de unión identificados fueron Asn8, Arg12, Pro35, Phe36, Thr37, Thr98, Phe101, Ser121 y Asn316 (Ilustración 28).

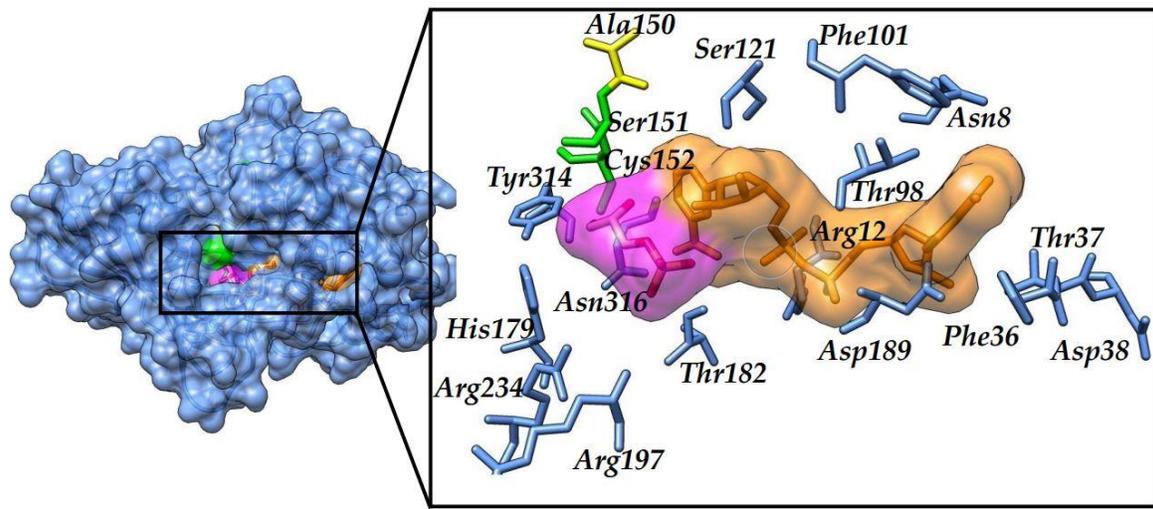


Ilustración 28. Identificación de aa involucrados en los sitios de unión para G3P y NAD⁺ en GIGAPDH-I, usando UCSFChimera.

7.10.1 Alineamiento de secuencia y estructura entre GIGAPDH-I y HsGAPDH

Con la finalidad de considerar que la GIGAPDH-I de *G. lamblia* pudiese ser empleado como posible candidato en el diseño de fármacos, se realizó un alineamiento de secuencia y estructura de la proteína GIGAPDH-I y la proteína GAPDH de *Homo sapiens* (HsGAPDH).

En el alineamiento de ambas secuencias, empleando Mview se obtuvo un 59.8 % de identidad, la enzima GIGAPDH-I está compuesta por 336 aa, a diferencia de HsGAPDH que contiene 338 aa, se encontraron ocho motivos (de aa) característicos en las GAPDHs (Ilustración 29, recuadros amarillos), presentes en otros organismos como *Caenorhabditis elegans* [54], *Fasciola hepatica* [63] y *Fasciola gigantica* [67]. La mayor conservación de estas regiones se encontró en la HsGAPDH, mientras que en la secuencia de GIGAPDH-I varios de esos aa difieren en las regiones indicadas (recuadros amarillos), también se observaron diferencias en los 24 aa que forman el loop-S (indicado con asteriscos),

característico de las GAPDH. La secuencia de aa que mostró similitud entre ambas proteínas fue la del sitio activo (recuadro rojo), incluida en uno de los motivos identificados.

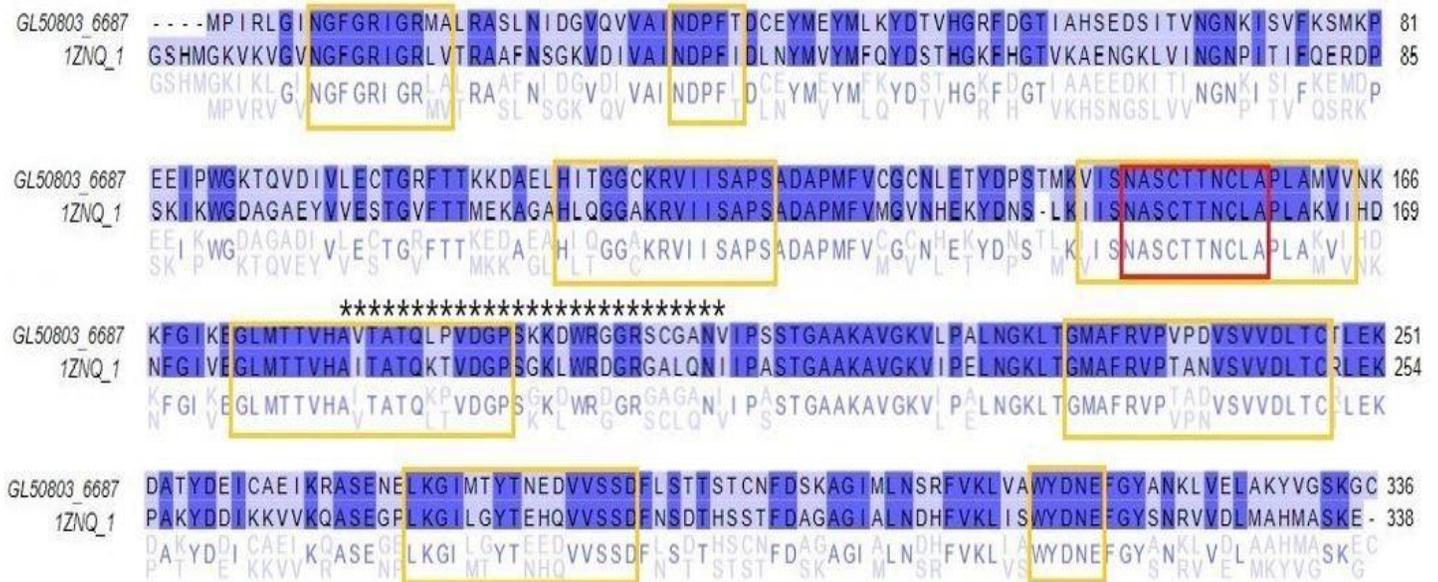


Ilustración 29. Alineamiento de secuencias (GIGAPDH-I y HsGAPDH), en Jalview.

La estructura 3D previamente obtenida (ilustración 25) también se comparó con la de la proteína GAPDH de *Homo sapiens* (HsGAPDH), al alinear dicha estructura del cristal de HsGAPDH (PDB 1ZNP), se obtuvo un valor RMSD de 0.895 Å para 319 átomos de C α (Ilustración 30), y con un Q-score calculado de 0.835.

El valor de distancia RMSD indica la diferencia estructural entre ambas topologías, de modo que cuanto menor sea el valor RMSD de comparación de dos estructuras mayor será la similitud entre ellas. Con base en la RMSD obtenida del alineamiento de la proteína GAPDH-I de *G. lamblia* con la HsGAPDH de *H. sapiens*, se encontró que era un valor alto, por lo tanto, la similitud entre proteínas es baja, por lo que podría proponerse como un blanco farmacológico conforme a la predicción de los valores obtenidos, similar como en otros parásitos patógenos [84]-[86].

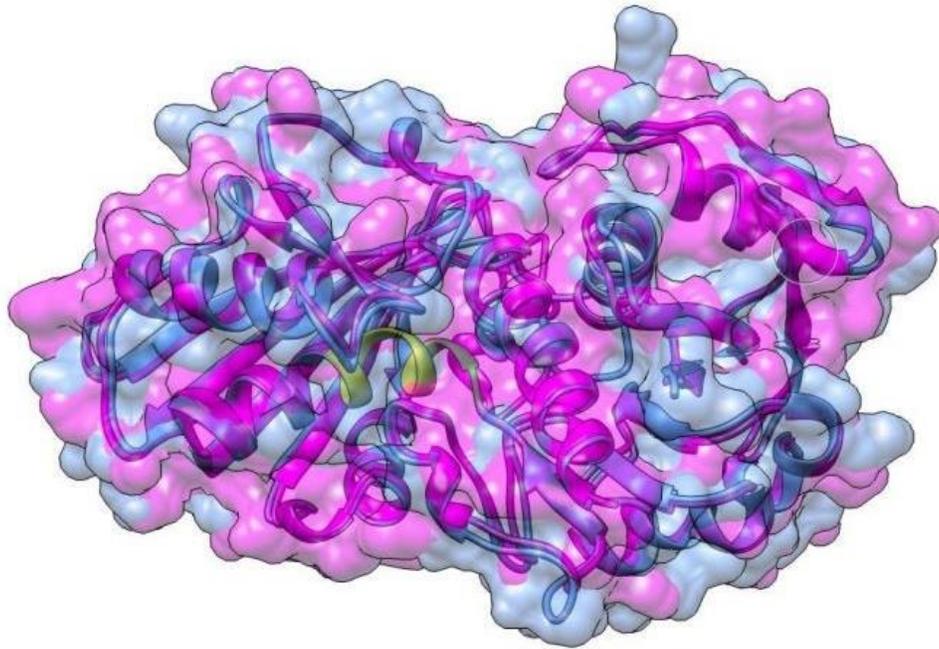


Ilustración 30. Alineamiento estructural de GIGAPDH-I y HsGAPDH por UCSFChimera.

Por su parte, un estudio más detallado de la estructura generada en este proyecto en conjunto con la secuencia, podría revelar la identificación de residuos clave no conservados en los sitios de unión de ligandos, y al ejercer mutaciones o inhibiciones en estas regiones posiblemente se desencadenarían cambios en la estructura y funcionalidad de la GIGAPDH-I, respaldado a dichas regiones no conservadas como un nuevo potencial objetivo farmacológico similar a otras enzimas metabólicas [38], [87], [88].

8 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se alcanzan las siguientes conclusiones:

1. De acuerdo a análisis bioinformáticos, se confirmó que la proteína GIGAPDH-I de *Giardia lamblia* a pesar de ser un eucariota primitivo contiene las mismas regiones conservadas características de las GAPDH, a diferencia de la proteína GIGAPDH-II que no contiene estas regiones conservadas.
2. Los datos de masa molecular nativa obtenidos revelaron que la proteína GIGAPDH-I es un tetrámero, formado por subunidades de aproximadamente 36 kDa.
3. GIGAPDH-I mostró propiedades bioquímicas similares a otras GAPDHs caracterizadas, como un amplio rango de pH y una afinidad por el sustrato G3P y la coenzima NAD⁺, que se ajustan a la curva de Michaelis-Menten.
4. La estructura 3D generada de GIGAPDH-I permitió analizar y confirmar que esta proteína contiene aminoácidos esenciales de las regiones correspondientes al sitio catalítico del sustrato G3P y la coenzima NAD⁺.
5. Conforme al modelo generado de la proteína GIGAPDH-I se observó que es diferente en secuencia y estructura con respecto a la humana, por lo que puede ser considerada como un candidato para el diseño de moléculas frente a *Giardia lamblia*.

9 PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo permitirán realizar más estudios que incluyan ensayos con GIGAPDH-I usando fármacos existentes o que esta proteína sirva como modelo para el diseño de nuevas moléculas para su inhibición. Incluso el análisis bioinformático mediante docking, también permitiría la búsqueda de nuevos compuestos que sean empleados para inhibir la actividad de GIGAPDH-I.

En la misma línea, se podrían realizar estudios de silenciamiento del gen *gapdh-I*, mediante ARN de interferencia, que al disminuir la expresión de dicho gen, sus efectos en el metabolismo de *G. lamblia* generarían conocimiento celular/molecular si es esencial sobre el parásito, revelando así que el gen y la proteína que codifica es un potencial objetivo farmacológico de este parásito.

En otra perspectiva, estudios de mutagénesis en regiones no conservadas de GIGAPDH-I, podrían generar alteraciones estructurales que a su vez afecten la actividad enzimática de dicha proteína en el parásito, y así sentar las bases para el desarrollo de moléculas dirigidas a regiones clave no conservadas en la proteína GIGAPDH-I.

10 REFERENCIAS

- [1] Einarsson, E., Ma'ayeh, S., & Svärd, S. G. (2016). An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology*, **34**: 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.019>.
- [2] Dirección General de Epidemiología. (2019). Anuario de morbilidad 1986-2019. https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2019/morbilidad/nacional/distribucion_casos_nuevos_enfermedad_mes.pdf.
- [3] Vivancos, V., González-Álvarez, I., Bermejo, M., & Gonzalez-Alvarez, M. (2018). Giardiasis: Characteristics, Pathogenesis and New Insights About Treatment. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **18**: 1287-1303. <https://doi.org/10.2174/1568026618666181002095314>.
- [4] Ash, L., & Orihel, T. (2010). Atlas de parasitología humana (5ª ed.). Editorial Médica Panamericana.
- [5] Petithory J, Charmet M, Garin N. (1999). Evaluation de la qualité des examens en Parasitologie et Mycologie, *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, **83**: 81-96.
- [6] Anayo F, Sabanero G. (2000). Use of Wrights stain to identify *Entamoeba histolytica* trophozoites in faeces. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **83**: 211-19.
- [7] Plummer, S., Harris, J., & Lloyd, D. (2001). Antigiardial drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**: 614-619. <https://doi.org/10.1007/s002530100720>.
- [8] Leitsch, D. (2015). Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. *Current Tropical Medicine Reports*, **2**: 128-135. <https://doi.org/10.1007/s40475-015-0051-1>.
- [9] Pérez-Casal, J., & Potter, A. A. (2016). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a suitable vaccine candidate for protection against bacterial and parasitic diseases. *Vaccine*, **34**: 1012-1017. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.11.072>.
- [10] Levine, N.D., Corlis, J., Cox, F.E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G. F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F.G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of Protozoology*, **27**: 37-58.
- [11] Cavalier-Smith, T. (2003). Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European Journal of Protistology*, **39**: 338-348. <https://doi.org/10.1078/0932-4739-00002>.
- [12] Plutzer, J., Ongerth, J. & Karanisc, P. (2010). *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **213**: 321-333. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.06.005>.

- [13] Homan, W.L. (1992). Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitol Research*, **78**: 316–323.
- [14] Mayrhofer, G., Andrews, R.H., Ey, P.L. & Chilton NB. (1995). Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology*, **111**: 11-17.
- [15] Karanis, P. & Ey, P.L. (1998). Characterization of axenic isolates of *Giardia intestinalis* established from humans and animals in Germany. *Parasitol Research*, **84**: 442-449.
- [16] Meloni, B.P. & Thompson, R.C.A. (1987). Comparative studies on the axenic in vitro cultivation of *Giardia* of human and canine origin: Evidence for intraspecific variation. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **81**: 637–640.
- [17] Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G. & Ey, P.L. (1999). Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Molecular Biology and Evolution*, **16**: 1135–1144.
- [18] Ey, P.L., Mansouri, M., Kulda, J., Nohýnková, E., Monis, P.T., Andrews, R.H. & Mayrhofer, G. (1997). Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *Journal Eukaryotic Microbiology*, **44**: 626-635.
- [19] Grassi, B. (1879). Dei protozi parassiti specialmente de quelli che sono nell' uomo. *Gazzete medico Italia lombardia*, **39**: 445-448.
- [20] Erlandsen, S. L. & Bemrick, W.J. (1987). SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. *Journal of Parasitol*, **73**: 623–629.
- [21] Noller, W. (1920). Kleine Beobachtungen an parasitischen Protozoen. *Archiv für Protistenkunde*, **41**: 169-189.
- [22] Feely, D.E. (1988). Morphology of the cyst of *Giardia microti* by light and electron microscopy. *Journal of Protozoology*, **35**: 52–54.
- [23] Sogin, M.L., Gunderson, J.H., Elwood, H.J., Alonso, R.A. & Peattie, D.A. (1989). Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science*, **243**: 75–77.
- [24] Hashimoto, T., Nakamura, Y., Nakamura, F., Shirakura, T., Adachi, J., Goto, N., Okamoto, K. & Hasegawa, M. (1994). Protein phylogeny gives a robust estimation for early divergences of eukaryotes: phylogenetic place of a mitochondria lacking protozoan, *Giardia lamblia*. *Molecular Biology and Evolution*, **11**: 65–71.
- [25] Lujan, H.D. & Svärd, S. (2011). *Giardia*: A model organism. Springer Verlag, Viena, Austria.

- [26] Kabnick, K.S. & Peattie, D.A. (1990). *In situ* analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *Journal of Cell Science*, **95**: 353-360.
- [27] Adam, R.D. (2000). The *Giardia lamblia* genome. *International Journal for Parasitology*, **30**: 475–484. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00191-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00191-5).
- [28] Elmendorf, G., Singer, M., Pierce, J., Cowan, J. & Nash, T. (2001). Initiator and upstream elements in the α 2-tubulin promoter of *Giardia lamblia*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, **113**: 157–169. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00211-0](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00211-0).
- [29] Smith, H., & Evans, R. (2009). Parasites: *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii* and pathogenic free-living amoebae (*Acanthamoeba spp.* and *Naegleria fowleri*) as foodborne pathogens. *Foodborne Pathogens*, 930–1008. <https://doi.org/10.1533/9781845696337.3.930>.
- [30] Ginger, M. L. (2006). Niche metabolism in parasitic protozoa. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **361**: 101–118. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1756>.
- [31] Hall, N., Karras, M., Raine, J.D., Carlton, J.M., Kooij, T.W., Berriman, M., Florens, L., Janssen, C.S., Pain, A., Christophides, G.K., James, K., Rutherford, K., Harris, B., Harris, D., Churcher, C., Quail, M.A., Ormond, D., Doggett, J., Trueman, H.E., Mendoza, J., Bidwell, S.L., Rajandream, M.A., Carucci, D.J., Yates, J.R., Kafatos, F.C., Janse, C.J., Barrell, B., Turner, C.M., Waters, A.P. & Sinden, R.E. (2005). A comprehensive survey of the Plasmodium life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science*, **307**: 82-86. <https://doi.org/10.1126/science.1103717>.
- [32] Nelson, D.L. & Cox, M. (2019). *Lehninger: principios de bioquímica*. Omega, Barcelona, España.
- [33] Rodacka, A. (2013). Properties and functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej.*, **67**: 775-789. <https://doi.org/10.5604/17322693.1061630>.
- [34] Rozario, C., Morin, L., Roger, A.J., Smith, M.W. & Müller, M. (1996). Primary structure and phylogenetic relationships of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes of free-living and parasitic diplomonad flagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **43**: 330-40. <https://doi:10.1111/j.1550-7408.1996.tb03997.x>
- [35] Yang, H.W., Yong, T.S., Lee, J.H., Im, K.I. & Park, S.J. (2002). Characterization of two glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase genes in *Giardia lamblia*. *Parasitology Research*. **88**: 646-50. <https://doi:10.1007/s00436-002-0627-2>.
- [36] Timson, J. (2016). Metabolic Enzymes of Helminth Parasites: Potential as Drug Targets. *Current Protein & Peptide Science*, **17**: 280-295. <https://doi.org/10.2174/1389203717999160226180733>.

- [37] Nyamai, D. W., & Tastan Bishop, Ö. (2019). Aminoacyl tRNA synthetases as malarial drug targets: a comparative bioinformatics study. *Malaria journal*, **18**: 34. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2665-6>.
- [38] Hernández-Alcántara, G., Torres-Larios, A., Enríquez-Flores, S., García-Torres, I., Castillo-Villanueva, A., T. Méndez, S., De la Mora-de la Mora, I., Gómez-Manzo, S., Torres-Arroyo, A., López-Velázquez, G., Reyes-Vivas, H., Oria-Hernández, J. (2013). Structural and Functional Perturbation of *Giardia lamblia* Triosephosphate Isomerase by Modification of a Non-Catalytic, Non-Conserved Region. *PLOS ONE* **8**: e69031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069031>.
- [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. A., 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*. *International journal of molecular sciences*, **19**: 2518. <https://doi.org/10.3390/ijms19092518>.
- [40] Marcial-Quino J, Fierro F, De la Mora-De la Mora I, Enríquez-Flores S, Gómez-Manzo S, Vanoye-Carlo A, García-Torres I, Sierra-Palacios E, Reyes-Vivas H. (2016). Validation of housekeeping genes as an internal control for gene expression studies in *Giardia lamblia* using quantitative real-time PCR. *Gene*, **581**: 21-30. doi: 10.1016/j.gene.2016.01.018.
- [41] Cortés-Maldonado L, Marcial-Quino J, Gómez-Manzo S, Fierro F. & Tomasini A. (2020). A method for the extraction of high-quality fungal RNA suitable for RNA-seq. *Journal of Microbiological Methods*. **170**: 105855. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105855>.
- [42] Hernández-Ochoa, B., Gómez-Manzo, S., Alcaraz-Carmona, E., Serrano-Posada, H., Centeno-Leija, S., Arreguin-Espinosa, R., Cuevas-Cruz, M., González-Valdez, A., Mendoza-Espinoza, J.A., Acosta Ramos, M., Cortés-Maldonado, L., Montiel-González, A.M., Pérez de la Cruz, V., Rocha-Ramírez, L.M., Marcial-Quino, J. & Sierra-Palacios, E. (2019). Gene Cloning, Recombinant Expression, Characterization, and Molecular Modeling of the Glycolytic Enzyme Triosephosphate Isomerase from *Fusarium oxysporum*. *Microorganisms*, **8**: 40. <https://doi:10.3390/microorganisms8010040>.
- [43] Gómez-Manzo, S, Terrón-Hernández, J., de la Mora-de la Mora, I., García Torres, I., López-Velázquez, G., Reyes-Vivas, H. & Oria-Hernández, J. (2013). Cloning, expression, purification and characterization of His-tagged human *glucose-6-phosphate dehydrogenase*: A simplified method for protein yield. *Protein Journal*, **32**: 585–592. <https://doi:10.1007/s10930-013-9518-x>.
- [44] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265–275.

- [45] Machado, A.T.P., Silva, M. & Iulek, J. (2016). Expression, purification, enzymatic characterization and crystallization of *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* from *Naegleria gruberi*, the first one from phylum *Percolozoa*. *Protein Expression and Purification*, **127**: 125-130. <https://doi:10.1016/j.pep.2016.07.007>.
- [46] Ramírez-Nava, E.J., Ortega-Cuellar, D., González-Valdez, A., Castillo-Rodríguez, R.A., Ponce-Soto, G.Y., Hernández-Ochoa, B., Cárdenas-Rodríguez, N., Martínez-Rosas, V., Morales-Luna, L., Serrano-Posada, H., Sierra-Palacios, E., Arreguin-Espinosa, R., Cuevas-Cruz, M., Rocha-Ramírez, L.M., Pérez de la Cruz, V., Marcial-Quino, J. & Gómez-Manzo, S. (2019). Molecular Cloning and Exploration of the Biochemical and Functional Analysis of Recombinant *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase* from *Gluconoacetobacter diazotrophicus* PAL5. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**: 5279. <https://doi:10.3390/ijms20215279>.
- [47] Gómez-Manzo, S., Marcial-Quino, J., Vanoye-Carlo, A., Serrano-Posada, H., González-Valdez, A., Martínez-Rosas, V., Hernández-Ochoa, B., Sierra-Palacios, E., Castillo-Rodríguez, R.A., Cuevas-Cruz, M. & Rodríguez-Bustamante, E. (2016). Functional and biochemical characterization of three recombinant *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase* mutants: Zacatecas, Vanua-Lava and Viangchan. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**: 787. <https://doi:10.3390/ijms17050787>.
- [48] Martínez-Rosas, V., Juárez-Cruz, M.V., Ramírez-Nava, E.J., Hernández-Ochoa, B., Morales-Luna, L., González-Valdez, A., Serrano-Posada, H., Cárdenas-Rodríguez, N., Ortiz-Ramírez, P., Centeno-Leija, S., Arreguin-Espinosa, R., Cuevas-Cruz, M., Ortega-Cuellar, D., Pérez de la Cruz, V., Rocha-Ramírez, L.M., Sierra-Palacios, E., Castillo-Rodríguez, R.A., Baeza-Ramírez, I., Marcial-Quino, J. & Gómez-Manzo S. (2020). Effects of single and double mutants in human *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase* variants present in the Mexican population: biochemical and structural analysis, *International Journal of Molecular Sciences*, **21**: 2732. <https://doi:10.3390/ijms21082732>.
- [49] Cortés-Morales, Y.Y., Vanoye-Carlo, A., Castillo-Rodríguez, R.A., Serrano-Posada, H., González-Valdez, A., Ortega-Cuellar, D., Hernández-Ochoa, B., Moreno-Vargas, L.M., Prada-Gracia, D., Sierra-Palacios, E., Pérez de la Cruz, V., Marcial-Quino, J. & S. Gómez-Manzo. (2018). Cloning and biochemical characterization of three glucose 6 phosphate dehydrogenase mutants presents in the Mexican population, *International Journal of Biological Macromolecules*, **119**: 926-936. <https://doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.08.025>.
- [50] Cook, W.J., Senkovich, O. & Chattopadhyay, D. (2009). An unexpected phosphate binding site in *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*: crystal structures of apo, holo and ternary complex of *Cryptosporidium parvum* enzyme. *BMC Structural Biology*, **9**: 9. <https://doi:10.1186/1472-6807-9-9>.
- [51] Webb, B. & Sali, A. (2016). Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. *Current Protocols in Bioinformatics*, **54**: 5.6.1- 5.6.37. <https://doi:10.1002/cpbi.3>.
- [52] Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. & Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera-A visualization system for exploratory

- research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, **25**: 1605-12. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- [53] Laskowski, R.A., Jabłońska, J., Pravda, L., Vařeková, R.S. & Thornton, J.M. (2018). PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein Science*, **27**: 129-134. <https://doi.org/10.1002/pro.3289>.
- [54] Huang, X.Y., Barrios, L.A.M., Von Khorporn, P., Honda, S., Albertson, D.G. & Hecht, R.M. (1989). Genomic organization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology*. **206**: 411-424. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90490-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90490-7).
- [55] Iddar, A., Serrano, A. & Soukri, A. (2002). A phosphate-stimulated NAD(P)⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letter*, **211**: 29-35. <https://doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11199.x>
- [56] Madureira, P., Baptista, M., Vieira, M., Magalhães, V., Camelo, A., Oliveira, L., Ribeiro, A., Tavares, D., Trieu-Cuot, P., Vilanova, M. & Ferreira, P. (2007). *Streptococcus agalactiae* GAPDH Is a Virulence-Associated Immunomodulatory Protein. *Journal of Immunology*, **178**: 1379-1387; <https://doi:10.4049/jimmunol.178.3.1379>.
- [57] Lu, G.T., Xie, J.R., Chen, L., Hu, J.R., An, S.Q., Su, H.Z., Feng, J.X., He, Y.Q., Jiang, B.L., Tang, D.J. & Tang, J.L. (2009). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required for extracellular polysaccharide production and full virulence. *Microbiology*. **155**: 1602-1612. <https://doi:10.1099/mic.0.023762-0>
- [58] Mardad, I., Baibai, T., Ammar, E. & Soukri, A. (2013). Purification and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from saline strain *Idiomarina loihiensis*. *Advances in Biological Chemistry (ABC)*. **3**: 170-176. <https://doi:10.4236/abc.2013.32022>
- [59] Schmalhausen, E.V., Shumkov, M.S., Muronetz, V.I. & Švedas, V.K. (2019). Expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *M. tuberculosis* in *E. coli*. Purification and characteristics of the untagged recombinant enzyme. *Protein Expression and Purification*, **157**: 28-35. <https://doi:10.1016/j.pep.2019.01.010>.
- [60] Tästensen, J.B. & Schönheit, P. (2018). Two Distinct glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenases in Glycolysis and Gluconeogenesis in the Archaeon *Haloferax Volcanii*, *FEBS Letters*, **592**: 1524-1534. <https://doi:10.1002/1873-3468.13037>.
- [61] Hannaert, V., Opperdoes, F.R. & Michaels, P.A. (1995). Glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*: expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of the enzymes, *Protein Expression and Purification*, **6**: 244-250. <https://doi:10.1006/pep.1995.1031>
- [62] Cheliski, J., Freitas, R.F., Wiggers, H.J., Rocha, J.R., de Araújo, A.P., Montanari, C.A. (2011). Expression, purification and kinetic characterization of His-tagged

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Protein Expression and Purification*, **76**: 190-196. <https://doi:10.1016/j.pep.2010.11.013>

- [63] Zinsser, V.L., Hoey, E.M., Trudgett, A., Timson, D.J. (2014). Biochemical characterization of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1844**: 744-9. <https://doi:10.1016/j.bbapap.2014.02.008>.
- [64] Sangolgi, P.B., Balaji, C., Dutta, S., Jindal, N., Jarori, G.K. (2016). Cloning, Expression, Purification and Characterization of *Plasmodium spp.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Protein Expression and Purification*, **117**: 17-25. <https://doi:10.1016/j.pep.2015.08.028>
- [65] Nagarajan, R., Sankar, S., Ponnuraj, K. (2019). Crystal structure of GAPDH of *Streptococcus agalactiae* and characterization of its interaction with extracellular matrix molecules. *Microbial Pathogenesis*. **127**: 359-367. <https://doi:10.1016/j.micpath.2018.12.020>
- [66] Maurer, K.H., Pfeiffer, F., Zehender, H., Mecke, D. (1983). Characterization of two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes from the pentalenolactone producer *Streptomyces arenae*. *Journal of Bacteriology*. **153**: 930-936. <https://doi:10.1128/JB.153.2.930-936.1983>
- [67] Chetri, P.B., Shukla, R., Tripathi, T. (2019). Identification and characterization of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Fasciola gigantica*. *Parasitology Research*, **118**: 861–872. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06225-w>
- [68] Li, Y., Chen, Z., Zhou, Z., Yuan, Q. (2016). Expression, purification and characterization of GAPDH-ChSase ABC I from *Proteus vulgaris* in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, **128**: 36-41. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.08.004>
- [69] Mountassif, D., Baibai, T., Fourrat, L., Moutaouakkil, A., Iddar, A., El Kebbij, M.S., Soukri, A. (2009). Immunoaffinity purification and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*, **41**: 399-406. <https://doi:10.1093/abbs/gmp026>
- [70] Matta, S.K., Agarwal, S., Bhatnagar, R. (2010). Surface localized and extracellular Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Bacillus anthracis* is a plasminogen binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1804**: 2111-2120. <https://doi:10.1016/j.bbapap.2010.08.004>
- [71] Lambeir, A.M., Loiseau, A.M., Kuntz, D.A., Vellieux, F.M., Michels, P.A., Opperdoes, F.R. (1991). The cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei*. Kinetic properties and comparison with homologous enzymes. *European Journal of Biochemistry*, **198**: 429-435. <https://doi:10.1111/j.1432-1033.1991.tb16032.x>.

- [72] Pancholi, V., Fischetti, V.A. (1992). A Major Surface Protein on Group-a *Streptococci* is a Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase with Multiple Binding-Activity. *Journal of Experimental Medicine*, **176**: 415-426. [https://doi: 10.1084/jem.176.2.415](https://doi.org/10.1084/jem.176.2.415)
- [73] Hafid, N., Valverde, F., Villalobo, E., Elkebbaj, M.S., Torres, A., Soukri, A. Serrano, A. (1998). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Tetrahymena pyriformis*: enzyme purification and characterization of a gapC gene with primitive eukaryotic features. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, **119**: 493-503. [https://doi:10.1016/s0305-0491\(98\)00010-8](https://doi.org/10.1016/s0305-0491(98)00010-8)
- [74] Rehaber, V., Jaenicke, R. (1993). The low-temperature folding intermediate of hyperthermophilic D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermotoga maritima* shows a native-like cooperative unfolding transition. *FEBS Letters*, **317**: 163-166. [https://doi:10.1016/0014-5793\(93\)81514-z](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81514-z)
- [75] Patel, D.K., Shah, K.R., Pappachan, A. Gupta, S. Singh, D.D. (2016). Cloning, expression and characterization of a mucin-binding GAPDH from *Lactobacillus acidophilus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **91**: 338-346. [https://doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.041](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.041).
- [76] West, S.M., Gise, A.D. & Chaudhuri, J.B. (1996). A Comparison of the Denaturants Urea and Guanidine Hydrochloride on Protein Refolding. *Food and Bioprocess Technology*, **75**: 50-56. [https://doi:10.1205/096030897531360](https://doi.org/10.1205/096030897531360).
- [77] Xie, G.-F., & Tsou, C.-L. (1987). Conformational and activity changes during guanidine denaturation of d-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **911**: 19–24. [https://doi:10.1016/0167-4838\(87\)90265-2](https://doi.org/10.1016/0167-4838(87)90265-2)
- [78] Cook, W.J., Senkovich, O. & Chattopadhyay, D. (2009). An unexpected phosphate binding site in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: crystal structures of apo, holo and ternary complex of *Cryptosporidium parvum* enzyme. *BMC Structural Biology*, **9**: 9. [https://doi:10.1186/1472-6807-9-9](https://doi.org/10.1186/1472-6807-9-9)
- [79] Moras, D., Olsen, KW., Sabesan, MN., Buehner, M., Ford, GC. & Rossmann MG. Studies of asymmetry in the three-dimensional structure of lobster D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, **250**: 9137-9162. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)40703-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)40703-5).
- [80] Shen, Y.Q., Li, J., Song, S.Y. & Lin, Z.J. (2000). Structure of apo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Palinurus versicolor*. *Journal of Structural Biology*, **130**: 1-9. [https://doi:10.1006/jsbi.2000.4220](https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4220)
- [81] Ismail, S.A. & Park, H.W. (2005). Structural analysis of human liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **61**: 1508-1513. [https://doi:10.1107/S0907444905026740](https://doi.org/10.1107/S0907444905026740)
- [82] Baker, B.Y., Shi, W., Wang, B. & Palczewski, K. (2014). High-resolution crystal structures of the photoreceptor glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH) with three and four-bound NAD molecules. *Protein Science*, **23**: 1629-1639. <https://doi:10.1002/pro.2543>

- [83] Didierjean, C., Corbier, C., Fatih, M., Favier, F., Boschi-Muller, S., Branlant, G. & Aubry, A. (2003). Crystal structure of two ternary complexes of phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* with NAD⁺ and D-glyceraldehyde 3-phosphate. *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 12968-12976. <https://doi:10.1074/jbc.M211040200>
- [84] Pérez-Casal, J. & Potter, A.A. (2016). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a suitable vaccine candidate for protection against bacterial and parasitic diseases. *Vaccine*, **34**: 1012-1017. <https://doi:10.1016/j.vaccine.2015.11.072>.
- [85] Callens, M. & Hannaert, V. (1995). The rational design of trypanocidal drugs: selective inhibition of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Trypanosomatidae*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, **89**: 23-30. <https://doi:10.1080/00034983.1995.11813011>
- [86] Ondarza, R.N. (2007). Drug targets from human pathogenic amoebas: *Entamoeba histolytica*, *Acanthamoeba polyphaga* and *Naegleria fowleri*. *Infectious Disorders - Drug Targets*, **7**: 266–280. <https://doi:10.2174/187152607782110059>.
- [87] Gómez-Puyou A., Saavedra-Lira E., Becker I., Zubillaga RA., Rojo-Domínguez A. & Pérez-Montfort R. (1995). Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action--studies with triosephosphate isomerase. *Chemistry & Biology*, **2**: 847-55. [https://doi:10.1016/1074-5521\(95\)90091-8](https://doi:10.1016/1074-5521(95)90091-8).
- [88] Qu L., Zhou Q., Xu Y., Guo Y., Chen X., Yao D., Han GW., Liu ZJ., Stevens RC., Zhong G., Wu D. & Zhao S. (2019). Structural Basis of the Diversity of Adrenergic Receptors. *Cell Reports*, **29**: 2929-2935. <https://doi:10.1016/j.celrep.2019.10.088>.

11 ANEXOS

Anexo A

Medios de cultivo

Medio de cultivo para *Giardia lamblia* ATCC 50803.

Tabla 8. Formulación del medio de cultivo TYI-S-33 para *Giardia lamblia* ATCC 50803.

Medio TYI-S-33 (g/L)	
Bilis	0.5
Trypticasa	20
Extracto de levadura	10
Dextrosa	10
Cloruro de sodio NaCl	2
L-cisteína	2
Ácido ascórbico	0.1
Citrato férrico amoniacal	0.023
Fosfato monobásico	0.6
Fosfato dibásico	1

Nota: Se suplementó con suero bovino fetal al 10% (GIBCO Lifetechnologies).

Caldo Luria Bertani (LB) para *Escherichia coli*.

Tabla 9. Formulación del caldo de cultivo Luria Bertani.

Caldo Luria Bertani (LB) (g/L)	
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Cloruro sódico	10

El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C.

Nota: Se adicionó una solución de ampicilina con una concentración de [100 µg/mL].

Medio sólido Luria Bertani (ampicilina/IPTG/X-Gal) para *Escherichia coli*.

Tabla 10. Formulación del medio sólido Luria Bertani.

Caldo Luria Bertani (LB) (g/L)	
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Cloruro sódico	10
Agar	15

El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C.

Nota: Se adicionó ampicilina con una concentración de [100 µg/mL], IPTG [0.1 M], X-Gal [50 mg/mL].

Anexo 1-B.

Modelado de homología la proteína GIGAPDH-I.

The screenshot shows the NCBI BLAST web interface. At the top, it says "U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information" and "BLAST® - blastp suite". The "Standard Protein BLAST" section is active. In the "Enter Query Sequence" section, the "Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)" field contains the sequence: "MPRLGNGFGRGRMALASLNDGVVANDFFTDCEYMEYLAJYDVMYGRFDDGTAHSEDSITVHGNOSVFKSMQFEESPVYKTVQVWLECTGRFTTHQDAELHTGSGKRNII". The "Job Title" field contains "GIGAPDH-I". In the "Choose Search Set" section, the "Database" is set to "Protein Data Bank proteins (pdb)". The "Program Selection" section shows "blastp (protein-protein BLAST)" selected. A "BLAST" button is at the bottom left.

Ilustración 31. Secuencia de la proteína GIGAPDH-I de *G. lamblia* en la herramienta BLAST de NCBI para identificar homólogos empleando el algoritmo Blastp.

Anexo 2-B.

The screenshot shows the "Algorithm parameters" section of the NCBI BLAST web interface. A note at the top says "Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow and marked with a sign". The "General Parameters" section includes: "Max target sequences" set to 100, "Short queries" checked, "Expect threshold" set to 0.05, "Word size" set to 3 (highlighted in yellow), and "Max matches in a query range" set to 0. The "Scoring Parameters" section includes: "Matrix" set to BLOSUM62, "Gap Costs" set to Existence: 11 Extension: 1, and "Compositional adjustments" set to Conditional compositional score matrix adjustment. The "Filters and Masking" section includes: "Filter" unchecked, "Mask" unchecked, and "Mask lower case letters" unchecked. A "BLAST" button is at the bottom left.

Ilustración 32. Matriz BLOSUM62.

Anexo 3-B.

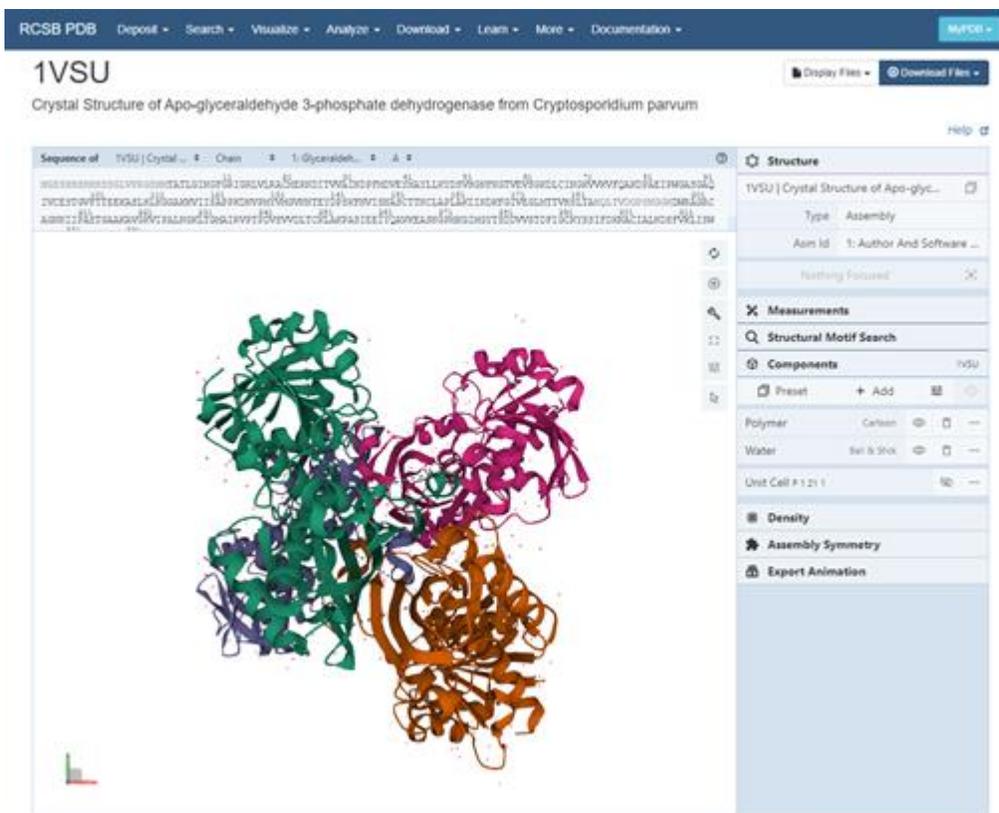


Ilustración 33. Estructura cristalina de la GAPDH de *Cryptosporidium parvum*.

Anexo C.

BLAST de la secuencia enviada por el IBT- UNAM del plásmido pET3a-GIGAPDH-I que codifica para GIGAPDH-I.

Sequences producing significant alignments Download **New** Select columns Show 10

select all 0 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results **New** MSA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	Giardia intestinalis Glycerlaldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GL50803_006687), partial mRNA	Giardia intestinalis	1748	1748	88%	0.0	97.64%	1011	XM_001704990.1
<input type="checkbox"/>	Giardia intestinalis glycerlaldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gap1) gene, complete cds	Giardia intestinalis	1738	1738	88%	0.0	97.45%	1178	M88062.1
<input type="checkbox"/>	Giardia intestinalis strain WB glycerlaldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene, partial cds	Giardia intestinalis	841	841	42%	0.0	97.35%	490	KR297227.1
<input type="checkbox"/>	Auxenochlorella protothecoides hypothetical protein, partial mRNA	Auxenochlorella ...	171	171	27%	2e-37	76.19%	450	XM_011397729.1
<input type="checkbox"/>	Auxenochlorella protothecoides Glycerlaldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic, partial mRNA	Auxenochlorella ...	171	171	26%	2e-37	76.59%	2067	XM_011397728.1

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Giardia intestinalis Glycerlaldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GL50803_006687), partial mRNA
 Sequence ID: [XM_001704990.1](#) Length: 1011 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1011 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1748 bits(946)	0.0	993/1017(98%)	11/1017(1%)	Plus/Plus

```

Query 112 ATGCCATTTCGCCTCGGAATCAACGGGTTTCGGCCGCATCGGCAGGATGGCCCTGAGGGCG 171
          |||
Sbjct 1   ATGCCATTTCGCCTCGGAATCAACGGGTTTCGGCCGCATCGGCAGGATGGCCCTGAGGGCG 60

Query 172 TCTCTGAACATCGACGGCGTCCAGGTTGTCGCGATCAACGACCCCTTCACGGACTGTGAG 231
          |||
Sbjct 61  TCTCTGAACATCGACGGCGTCCAGGTTGTCGCGATCAACGACCCCTTCACGGACTGTGAG 120

Query 232 TACATGGAGTACATGCTCAAGTACGATACGGTGCACGGGCGCTTTGACGGCACCMTCGCC 291
          |||
Sbjct 121 TACATGGAGTACATGCTCAAGTACGATACGGTGCACGGGCGCTTTGACGGCACCATCGCC 180

Query 292 CACTCTGAAGACTCCATAACGGTCAATGGGAACAAGATCTCTGTCTTCAAGTCTATGAAG 351
          |||
Sbjct 181 CACTCTGAAGACTCCATAACGGTCAATGGGAACAAGATCTCTGTCTTCAAGTCTATGAAG 240

Query 352 CCCGAGGAGATCCCATGGGGCAAGACCCAGGTGGACATTGTGCTCGAGGTACAGGTCCG 411
          |||
Sbjct 241 CCCGAGGAGATCCCATGGGGCAAGACCCAGGTGGACATTGTGCTCGAGGTACAGGTCCG 300

Query 412 TTTACAACGAAGAAGGATGCTGAGCTCCATATCACCGGCGGCTGCAAGCGTGTATCATC 471
          |||
Sbjct 301 TTTACAACGAAGAAGGATGCTGAGCTCCATATCACCGGCGGCTGCAAGCGTGTATCATC 360
  
```

Ilustración 34. BLAST del plásmido pET3a-HisTEV que codifica para GIGAPDH-I.

Anexo D.

Masa molecular y punto isoeléctrico teóricos de la proteína GIGAPDH-I, calculados con la herramienta Expasy®.

Expasy

Compute pI/Mw

A8BSP4_GIAIC (A8BSP4)

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)
Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) (Giardia lamblia)

The computation has been carried out on the complete sequence (**336** amino acids).

Molecular weight (Da): 36335.84 (average mass), 36312.14 (monoisotopic mass)

Theoretical pI: 6.88

Ilustración 35. Peso molecular (DA) y punto isoeléctrico teórico de GIGAPDH-I, Expasy®.

Anexo E

Vmax y Km de G3P obtenida del programa Origin 8.0®.

Origin 8 - C:\Users\lei_\Desktop\G3P - /Folder1/ - [Book1]

File Edit View Plot Column Worksheet Analysis Statistics Image Tools Format Window Help

Default: A 0 B I U x² x₂ x₁ α β A A

Folder1

NL Fit (Hill) (16/06/2021 17:51:59)

Notes

Description	NL Fit	
User Name	lei_I	
Operation Time	16/06/2021 17:51:59	
Model	Hill	
Equation	y=Vmax*x^n/(k^n+x^n)	
Report Status	New Analysis Report	

Input Data

Parameters

	Value	Standard Error
V0	Vmax	16.26455
	k	0.41316
	n	1
		0

Iterations Performed = 6
Total Iterations in Session = 6
Fit converged - tolerance criterion satisfied.
Some parameter values were fixed.

Statistics

	V0
Number of Points	8
Degrees of Freedom	6
Reduced Chi-Sqr	0.38894
Residual Sum of Squares	2.33364
Adj. R-Square	0.97186
Fit Status	Succeeded(100)

Fit Status Code :
100 : Fit converged

Name	T..	\	M...	C...	D...
Book1	W.	↑	16...	1...	3
Graph1	G..	↑	16...	1...	0
Table1	W.	↑	16...	1...	0

Ilustración 36. Vmax y Km de G3P, Origin 8.0®.

Anexo 1-F

La gráfica de energía calculada con UCSFChimera de los residuos de aminoácidos del modelo seleccionado para GIGAPDH-I.

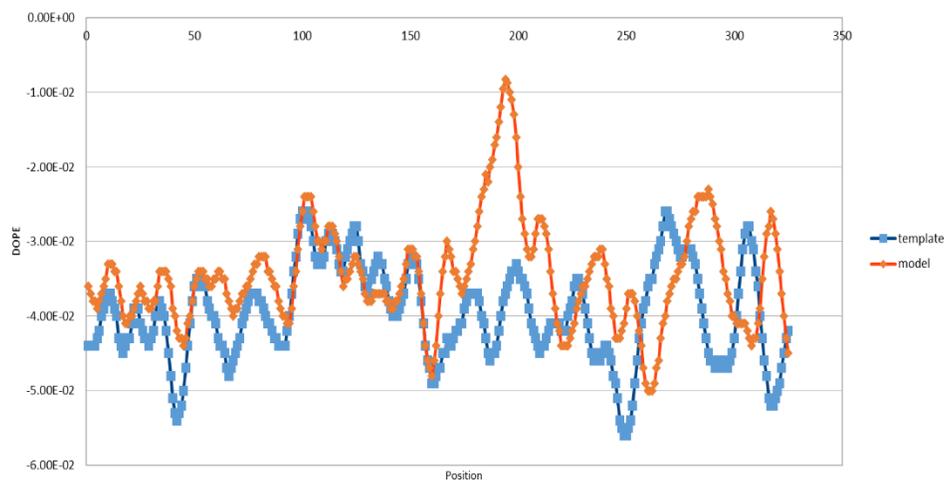


Ilustración 38. Gráfica de energía de los residuos de aa, Energía proteica optimizada discreta (DOPE) vs Posición.

Anexo 2-F

Estadísticas de Ramachandran.

		No. of residues	%-Tage
		-----	-----
Most favoured regions	[A,B,L]	264	90.4%
Additional allowed regions	[a,b,l,p]	22	7.5%
Generously allowed regions	[~a,~b,~l,~p]	4	1.4%
Disallowed regions	[XX]	2	0.7%*
		----	-----
Non-glycine and non-proline residues		292	100.0%

Ilustración 39. Estadísticas de Ramachandran.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00292

Matrícula: 2192802290

Expresión heteróloga y caracterización bioquímica de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de Giardia lamblia como posible candidata para el diseño de fármacos contra la giardiasis



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México, se presentaron a las 12:30 horas del día 26 del mes de octubre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

- DRA. CAROLINA CAMPOS MUÑIZ
- DRA. ALBA MONICA MONTIEL GONZALEZ
- DR. FERNANDO GOMEZ CHAVEZ
- DRA. YENIZEY MERIT ALVAREZ CISNEROS

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: LEILANY MARTINEZ RAMIREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

LEILANY MARTINEZ RAMIREZ
ALUMNA

REVISÓ
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. CAROLINA CAMPOS MUÑIZ

VOCAL

DRA. ALBA MONICA MONTIEL GONZALEZ

VOCAL

DR. FERNANDO GOMEZ CHAVEZ

SECRETARIA

DRA. YENIZEY MERIT ALVAREZ CISNEROS

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella