

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



---

---

UNIDAD IZTAPALAPA

EFFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN Y SILENCIAMIENTO GÉNICO DE  
LA TRIOSA FOSFATO ISOMERASA DE *Giardia lamblia* COMO  
BLANCO FARMACOLÓGICO PARA EL DISEÑO DE  
ANTIPARASITARIOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

ROJAS ALARCÓN MIRIAM ABIGAIL



POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA  
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

AGOSTO 2022

---

**LABORATORIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO:**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA (UAM-I). LABORATORIO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y METABOLITOS SECUNDARIOS. AVENIDA SAN RAFAEL ATLIXCO 186, COLONIA VICENTINA, C.P. 09340, IZTAPALAPA, CDMX**

**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA. TORRE DE INVESTIGACIÓN, LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y GENÉTICA, INSURGENTES SUR 3700 LETRA C, INSURGENTES CUICUILCO, C.P. 04530, CDMX.**

DIRECTOR

FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO

---

CODIRECTOR

JAIME MARCIAL QUINO

---

ASESOR

YENIZEY MERIT ÁLVAREZ CISNEROS

---

SUSTENTANTE:

MIRIAM ABIGAIL ROJAS ALARCÓN

---

## JURADO EVALUADOR

PRESIDENTE

DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ



SECRETARIO

DRA. CAROLINA CAMPOS MUÑOZ



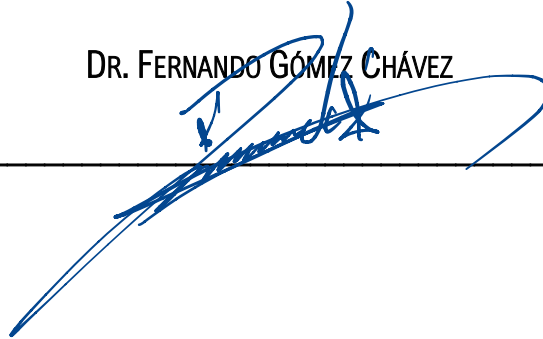
VOCAL

DRA. YENIZEY MERIT ÁLVAREZ CISNEROS



VOCAL

DR. FERNANDO GÓMEZ CHÁVEZ



“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 757331) y al proyecto CONACYT 259201 para la realización del presente trabajo.

*A mi familia y amigos por su amor, apoyo y preocupación a lo largo de los años.  
Hay un tiempo señalado para todo, y hay un tiempo para cada deleite bajo el cielo.*

*Eclesiastés 3:1*

# CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
1.1 Epidemiología de la giardiasis	6
1.2 Biología de <i>Giardia lamblia</i>	6
1.2.1 Ciclo biológico de <i>Giardia lamblia</i>	8
1.2.2 Metabolismo de <i>Giardia lamblia</i>	11
1.2.2.1 Glucólisis	12
1.2.2.2 Triosafosfato isomerasa	14
1.3 Diagnóstico de la giardiasis	16
1.4 Tratamiento contra la giardiasis	17
1.5 Biotecnología aplicada para la identificación y validación de nuevas dianas terapéuticas	18
1.5.1 Sobreexpresión génica	19
1.5.2 Silenciamiento génico	22
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>26</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>27</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
4.1 Objetivo general	28
4.2 Objetivos particulares	28
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>29</b>
5.1 Material biológico	30

<b>5.2 Desarrollo experimental: sobreexpresión</b>	<b>31</b>
5.2.1 Diseño de primers para la sobreexpresión del gen <i>GITpi</i>	31
5.2.2 Construcción del plásmido pTub-HisTEV-Tpi para la sobreexpresión del gen <i>GITpi</i>	32
5.2.3 Transfección y selección de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> con el vector pTub-HisTEV-Tpi.	34
5.2.4. Cuantificación celular	35
5.2.5 Extracción de ácidos nucleicos (DNA y RNA)	35
5.2.6 Síntesis de cDNA por RT-PCR	35
5.2.7 Cuantificación de la expresión génica de <i>GITpi</i> y otros genes por RT-qPCR	36
5.2.8 Inmunolocalización de la enzima TPI por microscopía confocal	37
5.2.9 Cuantificación de glucosa, piruvato y etanol	38
5.2.9.1 Cuantificación de la concentración de glucosa	38
5.2.9.2 Cuantificación de concentración de piruvato	38
5.2.9.3 Cuantificación de concentración de etanol	38
5.2.10 Determinación de la actividad enzimática de la enzima TPI	39
5.2.11 Determinación de la concentración de triptófano, piridoxina y riboflavina en trofozoítos por espectroscopía de fluorescencia.	39
5.2.12 Análisis estadístico: Sobreexpresión	40
<b>5.3 Desarrollo experimental: silenciamiento</b>	<b>41</b>
5.3.1 Diseño de primers para el silenciamiento del gen <i>GITpi</i>	41
5.3.2 Vector pTubGdh_eGFP-RNAi para el silenciamiento del gen <i>GITpi</i>	42
5.3.3 Transfección y selección de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> con el vector pTubGdh_eGFP-RNAi	45
5.3.4 Síntesis de cDNA por RT-PCR	45
5.3.5 Cuantificación de la expresión génica de <i>GITpi</i> por RT-qPCR	45
5.3.6 Determinación de la actividad enzimática de la enzima TPI	46
5.3.7 Análisis estadístico: Silenciamiento	46
<b>6. RESULTADOS Y ANÁLISIS</b>	<b>47</b>
<b>6.1 Sobreexpresión</b>	<b>47</b>
6.1.1 Análisis del vector pTub-HisTEV-Tpi para la sobreexpresión del gen <i>GITpi</i>	48

6.1.2 Efecto de la sobreexpresión del gen <i>GITpi</i> en el crecimiento de los trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	51
6.1.3 Efecto de la sobreexpresión en los transcritos del gen <i>GITpi</i> y otros genes implicados en la vía de la glucólisis	52
6.1.4 Efecto de la sobreexpresión del gen <i>GITpi</i> en la inmunolocalización de la enzima TPI en <i>Giardia lamblia</i>	56
6.1.5 Efecto de la sobreexpresión del gen <i>GITpi</i> en el metabolismo de la glucosa en <i>Giardia lamblia</i>	60
6.1.6 Efecto de la sobreexpresión del gen <i>GITpi</i> en el consumo de glucosa y producción de etanol	64
6.1.7 Efecto de la sobreexpresión del gen <i>GITpi</i> en metabolitos secundarios de <i>Giardia lamblia</i>	66
<b>6.2 Silenciamiento</b>	<b>72</b>
6.2.1 Análisis de la inserción del vector de silenciamiento pTubGdH-eGFR-RNAi en los trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	72
6.2.2 Efecto del silenciamiento del gen <i>GITpi</i> en el crecimiento de los trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	73
6.2.3 Efecto del silenciamiento del gen <i>GITpi</i> en los niveles de expresión	76
6.2.4 Efecto del silenciamiento del gen <i>GITpi</i> en la actividad enzimática de TPI	77
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>80</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	<b>81</b>
<b>9. REFERENCIAS</b>	<b>82</b>



# CONTENIDO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i> y mecanismo de infección. _____	9
<b>Figura 2.</b> Morfología del parásito <i>Giardia lamblia</i> en sus dos estadios, en forma de trofozoíto y quiste. ____	11
<b>Figura 3.</b> Glucólisis de <i>Giardia lamblia</i> . _____	13
<b>Figura 4.</b> Estructura de un homodímero de la triosafosfato isomerasa (TPI) de <i>Giardia lamblia</i> , representada en listones. _____	15
<b>Figura 5.</b> Mecanismos responsables de la sobreexpresión de fenotipos. _____	21
<b>Figura 6.</b> Formación y mecanismo de acción de los siRNA. _____	24
<b>Figura 7.</b> Metodología para la sobreexpresión y el silenciamiento del gen <i>GITpi</i> . _____	29
<b>Figura 8.</b> Estrategia utilizada para la construcción del plásmido para la expresión homóloga de genes en <i>G. lamblia</i> . _____	33
<b>Figura 9.</b> Vector para generar dsRNA del gen <i>GITpi</i> . _____	44
<b>Figura 10.</b> Plásmido construido para la sobreexpresión de genes en <i>Giardia lamblia</i> . _____	49
<b>Figura 11.</b> Valoración de transfección del plásmido en trofozoítos de <i>G. lamblia</i> . _____	50
<b>Figura 12.</b> Efecto de la sobreexpresión del gen <i>GITpi</i> en el crecimiento celular. _____	52
<b>Figura 13.</b> Integridad del RNA extraído mediante la técnica Trizol. _____	53
<b>Figura 14.</b> Cuantificación de la expresión génica de <i>GITpi</i> y de los genes implicados en la vía de la glucólisis mediante RT-qPCR. _____	55
<b>Figura 15.</b> Detección de la proteína TPI por microscopía confocal en diferentes tiempos de crecimiento. ____	59
<b>Figura 16.</b> Efectos producidos en el metabolismo de <i>G. lamblia</i> por la sobreexpresión del gen <i>GITpi</i> . ____	62
<b>Figura 17.</b> Efecto de la sobreexpresión del gen <i>GITpi</i> sobre la actividad enzimática de TPI. _____	64
<b>Figura 18.</b> Análisis del consumo de glucosa y producción de etanol a diferentes horas de cultivo. _____	66
<b>Figura 19.</b> Biosíntesis de metabolitos de la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato de <i>G. lamblia</i> . ____	67
<b>Figura 20.</b> Autofluorescencia determinada en trofozoítos transfectados de <i>G. lamblia</i> como indicador de productos del metabolismo de la glucosa. _____	70
<b>Figura 21.</b> Estrategia para generar RNA de doble cadena (dsRNA) a partir del gen <i>GITpi</i> . _____	73
<b>Figura 22.</b> Efecto del silenciamiento génico de <i>GITpi</i> en el crecimiento de <i>G. lamblia</i> . _____	75

---

**Figura 23.** Cuantificación de RNAm del gen *GITpi* en las diferentes cepas mediante RT-qPCR. \_\_\_\_\_ 77

**Figura 24.** Efecto del silenciamiento génico de *GITpi* sobre la actividad de la enzima TPI mediante espectrofotometría. \_\_\_\_\_ 78

## ***CONTENIDO DE TABLAS***

**Tabla 1.** *Primers para la sobreexpresión del gen GITpi.* \_\_\_\_\_ 31

**Tabla 2.** *Primers para el silenciamiento génico mediante RNAi de GITpi.* \_\_\_\_\_ 42

# ABREVIATURAS

Act	Actina
Ald	Aldolasa
$\alpha$ -tub	Alfa-tubulina
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DIC	Microscopía de interferencia diferencial
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA bicatenario
eGFP	Proteína verde fluorescente
GAP	Gliceraldehído-3-fosfato
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa
<i>GI<i>Tpi</i></i>	Gen de la triosafosfato isomerasa para <i>G. lamblia</i>
HSP90	Proteínas de choque térmico
i <i>Tpi</i> -R1	Cepa transfectada con vector de silenciamiento región 1
i <i>Tpi</i> -R2	Cepa transfectada con vector de silenciamiento región 2
i <i>Tpi</i> -R3	Cepa transfectada con vector de silenciamiento región 3
KEGG	Enciclopedia de genes y genomas de Kioto

---

LDH	Lactato deshidrogenasa
miRNA	Micro RNA de interferencia
MTZ	Metronidazol
NADH	$\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido reducido
OMS	Organización mundial de la salud
P $\alpha$ 2-tub	Promotor de alfa2-tubulina
PAC	Gen de resistencia puromicina N-acetil transferasa
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFOR	Piruvato:Ferredoxina oxidorreductasa
Pki / PkII	Piruvato cinasa I y II
ppdk	Piruvato fosfato dicinasa dependiente de pirofosfato
RdRP	RNA polimerasa dependiente de RNA replicasa
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNAi
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RNAm	RNA mensajero
RT-PCR	Transcriptasa reversa acoplada a PCR
RT-qPCR	Transcriptasa reversa acoplada a PCR en tiempo real

<b>Ru5P</b>	Ribulosa-5-fosfato
<b>SBF</b>	Suero bovino fetal
<b>shRNA</b>	RNA de horquilla corta
<b>siRNA</b>	RNA pequeños de interferencia
<b>T1048</b>	Cepa transfectada con vector de sobreexpresión
<b>TEV</b>	Gen de la enteroquinasa del virus del tabaco
<b>TPI</b>	Triosa fosfato isomerasa
<b>TRBP</b>	Proteína de unión de RNA del TAR
<b>VSP</b>	Proteína de almacenamiento vegetativo
<b>WtWB</b>	Cepa silvestre
<b>WtWB-iv</b>	Cepa silvestre con vector de silenciamiento sin gen
<b>WtWB-ov</b>	Cepa silvestre con vector de sobreexpresión sin gen

# RESUMEN

La giardiasis es una enfermedad endoparasitaria causada por el protozooario *Giardia lamblia*. El sistema nacional de vigilancia epidemiológica (SINAVE) consideró la giardiasis en 2020 entre las 10 principales enfermedades parasitarias, acumulando 5 794 casos nuevos. El tratamiento para esta enfermedad no es específico y el parásito genera resistencia a fármacos, por lo que hoy en día se continúa con la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas. La triosafosfato isomerasa (TPI) es una enzima que participa en la vía de la glucólisis; estudios anteriores han demostrado que algunos fármacos derivatizan las cisteínas presentes en la proteína recombinante TPI de *G. lamblia*, provocando una alteración en su estabilidad térmica y actividad catalítica. Para poder evaluar la importancia de esta proteína para *G. lamblia*, y encontrar nuevas estrategias farmacológicas, el objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la sobreexpresión y el silenciamiento por RNA de interferencia del gen *triosafosfato isomerasa* en el parásito *G. lamblia* (*GITpi*). Para la sobreexpresión se construyó el vector pTub-HisTEV-Tpi, para el silenciamiento se utilizó el vector pTubGdh\_eGFP-RNAi, que da origen a síntesis de dsRNA, con tres regiones diferentes del gen *GITpi*.

Se cultivaron trofozoítos de *G. lamblia* WB clona C6 en medio TYI-S-33. Para el análisis del efecto de la sobreexpresión se construyó el vector pTub-HisTEV-Tpi, los trofozoítos se transfectaron por electroporación y se seleccionaron con puromicina como antibiótico de selección. La cepa de los trofozoítos que albergaron el plásmido se denominó T1048, los cuales mostraron un aumento de tres veces en la expresión del RNAm de *GITp*, respecto a la cepa silvestre (WtWB). La proteína sobreexpresada se evaluó mediante ensayos de inmunofluorescencia, detectando la mayor parte de la proteína en la periferia de la cepa T1048. Además, la sobreexpresión de *GITpi* también provocó cambios en el metabolismo, ya que en la cepa T1048 se redujo la concentración de piruvato (1.4 veces), con un aumento de la tasa de producción de etanol (3.5 veces) y un aumento en el consumo de glucosa (3.5 veces) respecto a la cepa WtWB. Se analizaron otros metabolitos que también mostraron diferencias entre las cepas, especialmente cuando se midió la fluorescencia intrínseca del triptófano y la piridoxina. Los datos obtenidos mostraron que la

sobreexpresión del gen *GITpi* altera el metabolismo de *G. lamblia*, y estas cepas generadas pueden ser utilizadas como referencia para proponer nuevas dianas y evaluar nuevos fármacos.

Para el análisis del efecto del silenciamiento se utilizó el vector pTubGdh\_eGFP-RNAi. Se realizó una curva de crecimiento de trofozoítos silvestres (WtWB), transfectados con el vector sin el gen (WtWB-iv) y transfectados con el vector con diferentes regiones del gen (iTpi-R1, iTpi-R2 e iTpi-R3). Se cuantificó la expresión génica por RT-qPCR y se midió la actividad enzimática por espectrofotometría, a 24, 48, 72, y 96 h de cultivo. Los resultados mostraron que el silenciamiento con la región 2 del gen *GITpi* disminuyó el crecimiento de los trofozoítos hasta un 78% a las 48 h de cultivo; también disminuyó 0.75 veces la expresión relativa del gen *GITpi* a las 24 h, respecto a la cepa WtWB, y disminuyó tres veces la actividad enzimática de la proteína.

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión y el silenciamiento son buenas herramientas para el análisis de blancos farmacológicos. Además, se demostró que la proteína TPI de *G. lamblia* es una enzima importante para la viabilidad del parásito.

# ABSTRACT

Giardiasis is an endoparasitic disease caused by the protozoan *Giardia lamblia*. In 2020 the National Epidemiological Surveillance System (SINAVE) considered giardiasis among the top 10 parasitic diseases, accumulating 5 794 new cases. Treatment for this disease is not specific and the parasite generates drug resistance, therefore, the search for new therapeutic targets is still ongoing. Triosephosphate isomerase (TPI) is an enzyme that participates in the glycolysis pathway; previous studies have shown that some drugs derivatize the cysteines present in this enzyme, causing an alteration in its thermal stability and catalytic activity. To assess the importance of this enzyme for *G. lamblia*, and to find new pharmacological strategies, the aim of this work was to evaluate the effects of the overexpression and the silencing, by means of interfering RNA of the *G. lamblia* triosephosphate isomerase gene (*GITpi*). The pTub-HisTEV-Tpi vector was used for the overexpression and the pTubGdh\_eGFP-RNAi vector was used for silencing. The latter gives rise to dsRNA synthesis with three different regions of the *GITpi* gene.

Trophozoites of *G. lamblia* WB clone C6 were cultured in TYI-S-33 medium. For the overexpression assessment, the vector pTub-HisTEV-Tpi was constructed, and the trophozoites were transfected by means of electroporation and selected using puromycin as a selection antibiotic. The strain of trophozoites harboring the plasmid was named as T1048, which showed a 3-folded increase in *GITpi* mRNA expression relative to the wild-type strain (WtWB). The overexpressed protein was assessed by immunofluorescence assays, being most of it detected in the periphery of the strain T1048. Furthermore, *GITpi* overexpression also caused changes in metabolism, as the T1048 strain reduced pyruvate concentration (x1.4) and increased both the ethanol production rate (x3.5) and the glucose consumption (x3.5) with respect to WtWB. Other metabolites were also analyzed showing differences between strains, especially when intrinsic fluorescence of tryptophan and pyridoxine was measured. The data obtained showed that overexpression of *GITpi* alters the metabolism of *G. lamblia*, and these generated strains can be used as a reference to develop new targets and evaluate new drugs.



For the silencing analysis, the pTubGdh\_eGFP-RNAi vector was used. A growth curve of wild-type trophozoites (WtWB), transfected with the vector without the gene (WtWB-iv) and transfected with the vector containing different regions of the gene (iTpi-R1, iTpi-R2 and iTpi-R3) was performed. Gene expression was quantified by RT-qPCR and enzyme activity was measured spectrophotometrically at 24, 48, 72, and 96 culture hours. The results obtained indicate that silencing using region 2 of the *GITpi* gene decreased the trophozoite growth by 78% at 48 culture hours. Additionally, it decreases the relative expression of the *GITpi* gene by a factor of 0.75 at 24 h compared to the WtWB strain and decreases the enzymatic activity of the protein by three times.

These results suggest that overexpression and silencing are good and feasible tools for drug targeting analysis. In addition to this, it was also shown that the TPI protein of *G. lamblia* is an important enzyme for parasite viability.

# 1. INTRODUCCIÓN

El parasitismo es una asociación entre organismos de diferentes especies, en la que el parásito obtiene beneficio y vive a expensas del hospedero, causando daño, generalmente con aparición de manifestaciones clínicas muy leves o pudiendo ocasionar incluso la muerte. En la actualidad, las enfermedades parasitarias tienen un impacto global muy importante. Los factores climáticos y socioeconómicos determinan la distribución geográfica de estas enfermedades, siendo las primeras causas de morbilidad en países en vías de desarrollo, con escasos recursos económicos y con deficientes condiciones higiénico-sanitarias. Sin embargo, debido al turismo internacional a zonas tropicales y subtropicales y a la inmigración procedente de estos países, estas enfermedades se han convertido en un problema de salud pública global (Olalla y Tercero, 2011).

Los factores que determinan la patogenicidad del parásito son: la dosis infectante, la capacidad de multiplicación, la localización anatómica, el estado fisiológico/inmunitario del hospedero, la edad y la susceptibilidad individual. La transmisión de estas enfermedades se da por consumo de alimentos o agua contaminados, por un vector o por contacto directo (Olalla y Tercero, 2011).

Las enfermedades parasitarias se clasifican en endoparasitosis y ectoparasitosis, dependiendo de la localización del parásito en el organismo del hospedero. La endoparasitosis es producida por protozoarios entéricos y es una de las enfermedades parasitarias más comunes. Causan síntomas graves en pacientes con inmunidad deficiente o deteriorada, como pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida y pacientes que reciben terapias inmunosupresoras (Theel y Pritt, 2016). Este trabajo se enfocará a una de las enfermedades endoparasitarias con mayor impacto a nivel mundial: la giardiasis, una enfermedad parasitaria causada por el protozoario *Giardia lamblia*, también conocido como *Giardia intestinalis* o *Giardia duodenalis*, que parasita el intestino delgado de humanos, mamíferos, reptiles y aves (Olalla y Tercero, 2011; Secretaría de Salud, 2012).

## 1.1 Epidemiología de la giardiasis

La giardiasis representa un problema de salud pública desde los años 70's del siglo pasado, y está incluida en la Iniciativa de Enfermedades Descuidadas de la Organización Mundial de la Salud (OMS). A nivel mundial se ha estimado una incidencia de 200 millones de individuos infectados, de los cuales 500 000 sufren la enfermedad (Savioli *et al.*, 2006). Esta patología tiene dos patrones epidemiológicos principales:

1) La infección es endémica, en regiones con bajos recursos, climas cálidos y saneamiento deficiente, donde la infección se transmite por contacto de persona a persona. La inmunidad clínica se desarrolla con el tiempo, por la exposición continua, y principalmente se presenta en la población infantil, con una prevalencia del 2-30%.

2) La infección es esporádica, en entornos ricos en recursos y con buenas prácticas de saneamiento, donde las personas contraen esta enfermedad a través del consumo de alimentos o agua contaminados, en viajes o excursiones a países en vías de desarrollo, contacto con animales infectados, o por transmisión sexual.

Con esto se concluye que la patología puede transmitirse mediante tres mecanismos: a través del agua, mediante alimentos contaminados y mediante transmisión fecal-oral directa (Wolfe, 1979; AMSE, 2016; Minetti *et al.*, 2016; Theel y Pritt, 2016).

A nivel mundial, la giardiasis tiene una prevalencia del 2-7%. En México el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) consideró a la giardiasis entre las 10 principales enfermedades parasitarias en 2020, debido a la acumulación de 5 794 nuevos casos en ese año. Los estados con mayor frecuencia de casos nuevos y con graves implicaciones en el estado nutricional de la población infantil son Veracruz, Guerrero, Chiapas, Oaxaca, Sinaloa, Tamaulipas, Tabasco y Ciudad de México (SINAVE, 2020).

## 1.2 Biología de *Giardia lamblia*

*G. lamblia* es el parásito protozoario entérico más frecuente en el mundo, tanto en humanos como en los animales domésticos (Secretaría de Salud, 2012). Es un parásito flagelado, que fue

descubierto por van Leeuwenhoek en 1681 en sus propias muestras de heces, aunque Lambl no lo describió hasta 1859 (Shore, 2007).

*G. lamblia* pertenece al Filo: Metamonada, Orden: *Giardiida* y Familia: *Giardiidae*, Clase: *Trepomonadea*, Subclase: *Diplozoa Dangeard*, Superclase: *Eopharyngia*. El Filo Metamonada tiene la característica de contener organismos multinucleados, flagelados, y que carecen de mitocondrias típicas, presentando otros organelos como mitosomas (Solter *et al.*, 2012; Abeywardena *et al.*, 2015). Este parásito se reproduce asexualmente (fisión binaria longitudinal), aunque algunos estudios han sugerido que puede reproducirse sexualmente (Abeywardena *et al.*, 2015).

Actualmente, con el avance de técnicas moleculares, se han detectado diversas secuencias del genoma disponibles para la cepa *G. lamblia* denominados ensamblajes. Se ha encontrado un complejo de al menos ocho ensamblajes diferentes de *Giardia* catalogados de la letra A a la H. Entre estos ensamblajes no existe una diferencia morfológica, sin embargo, existe una diversidad genética. Se ha observado que cada ensamblaje es un linaje genéticamente aislado, esto permitió establecer a cada ensamblaje como especie diferente: *G. lamblia* para el ensamblaje A, *G. entérica* para el ensamblaje B, *G. canis* para el ensamblaje C y D, *G. cati* para el ensamblaje F, *G. simondi* para el ensamblaje G y *G. bovis* para el ensamblaje E (Xu *et al.*, 2012). Se considera que cada uno de estos ensamblajes tienen la capacidad de infectar a diferentes hospederos, el ensamblaje A y B se han encontrado en humanos y mamíferos. Los ensamblajes C y D se encuentran comúnmente en perros, el ensamblaje E en animales con pezuña hendida, el F infecta a gatos, el G a roedores y finalmente el H aparece en vertebrados marinos (Thompson y Monis, 2012; Abeywardena *et al.*, 2015).

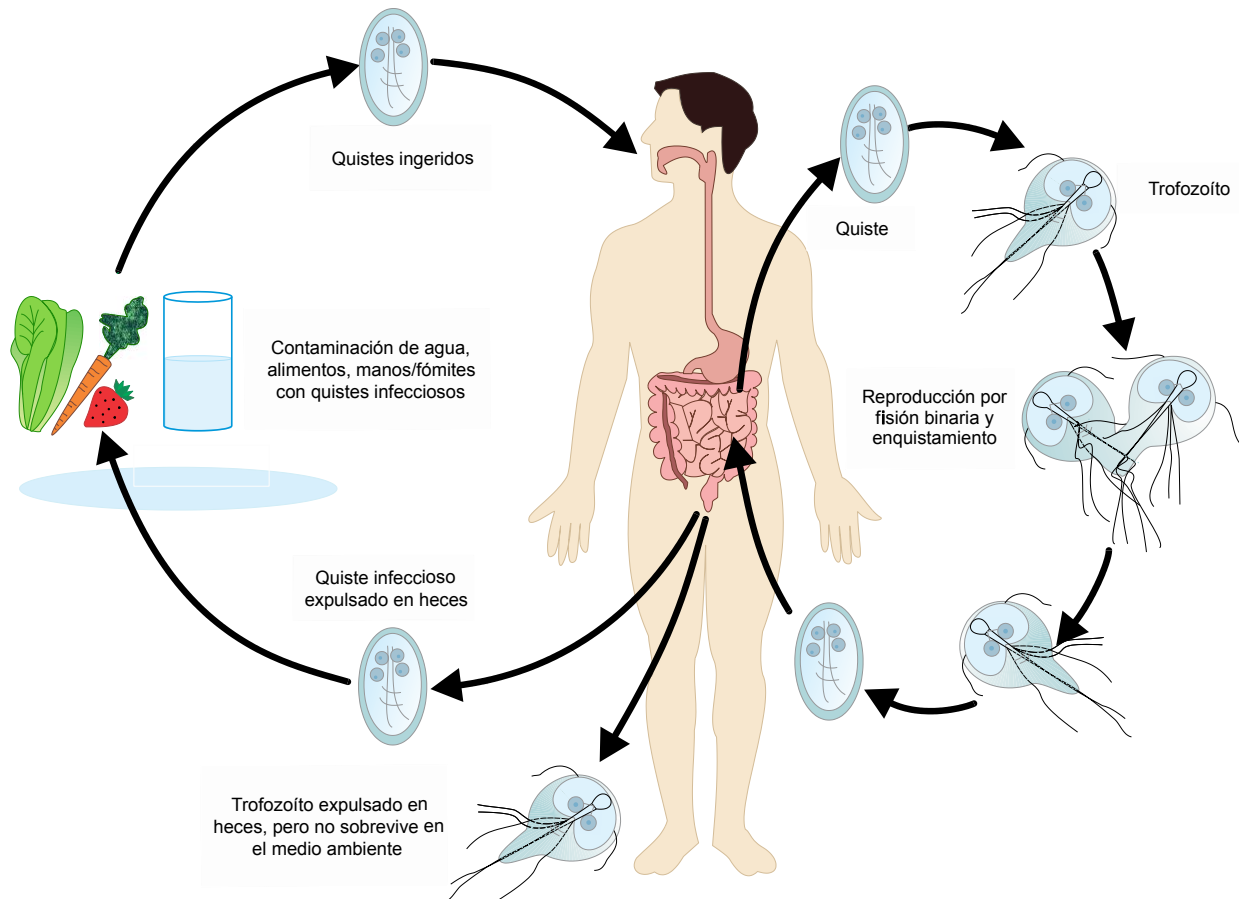
Diversos estudios en humanos han mostrado que las manifestaciones clínicas de la giardiasis están asociadas al ensamblaje B y los casos asintomáticos al ensamblaje A; además, han mostrado que el ensamblaje B tiene una mayor prevalencia en niños menores de 12 años, y el ensamblaje A en adultos (Puebla *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). Sin embargo, El-Basha y colaboradores en 2016 observaron que el ensamblaje A fue más frecuente en niños con edades entre los 2 y 8 años, y el ensamblaje B en niños con edades entre los 6 y los 16 años, los pacientes infectados con el ensamblaje A presentaron síntomas más graves que los pacientes infectados con el ensamblaje B (El-Basha *et al.*, 2016).

Se han logrado obtener exitosamente dos aislados de *G. lamblia*, la cepa WB con el ensamblaje A, y la cepa GS con el ensamblaje B (Franzén *et al.*, 2009). El aislado mejor caracterizado es el WB, aislado de un paciente con giardiasis sintomática crónica; el genoma de esta cepa está secuenciado por completo de la clona C6 (American Type Culture Collection #50803; <http://www.giardiadb.org>). Por otra parte, la cepa WB se considera de referencia y no tiene endosimbiontes ni virus de ARN de doble cadena, que pueden asociarse con otros aislados de *Giardia* (McArthur *et al.*, 2000, Cacció y Ryan, 2008).

### 1.2.1 Ciclo biológico de *Giardia lamblia*

*G. lamblia* se puede encontrar en dos estadios en su ciclo de vida: trofozoíto y quiste. La patología de esta enfermedad se debe principalmente a que el trofozoíto de *G. lamblia* se adhiere y se fija, por medio de discos suctores, a las vellosidades intestinales de la primera parte del epitelio del intestino delgado (duodeno), produciendo una alteración de las microvellosidades que conlleva a la aparición de diarreas mucosas, dolor abdominal, falta de apetito, hinchazón, calambres abdominales, flatulencias, vómito y, en casos más graves, puede producir el síndrome de malabsorción. Estos síntomas aparecen en un periodo de 1-3 semanas de incubación del parásito, sin inmunidad preexistente; la enfermedad sintomática ocurre en niños y adultos, con más de 15 000 casos anuales. Sin embargo, la mayoría de las personas infectadas (>50%) son asintomáticas o sólo tienen una enfermedad leve y autolimitante (Olalla y Tercero, 2011; Theel y Pritt, 2016).

Una vez que el trofozoíto infecta, el parásito se reproduce y empieza su proceso de deshidratación: el trofozoíto se enquista, pierde flagelos y forma quistes que son expulsados con las heces. Los quistes son la principal forma infecciosa, y son ingeridos por un nuevo hospedador a través de alimento o agua contaminada. Al llegar al duodeno, la pared quística se rompe para dar lugar a dos trofozoítos binucleados, empezando de nuevo el ciclo (Figura 1) (Olalla y Tercero, 2011).

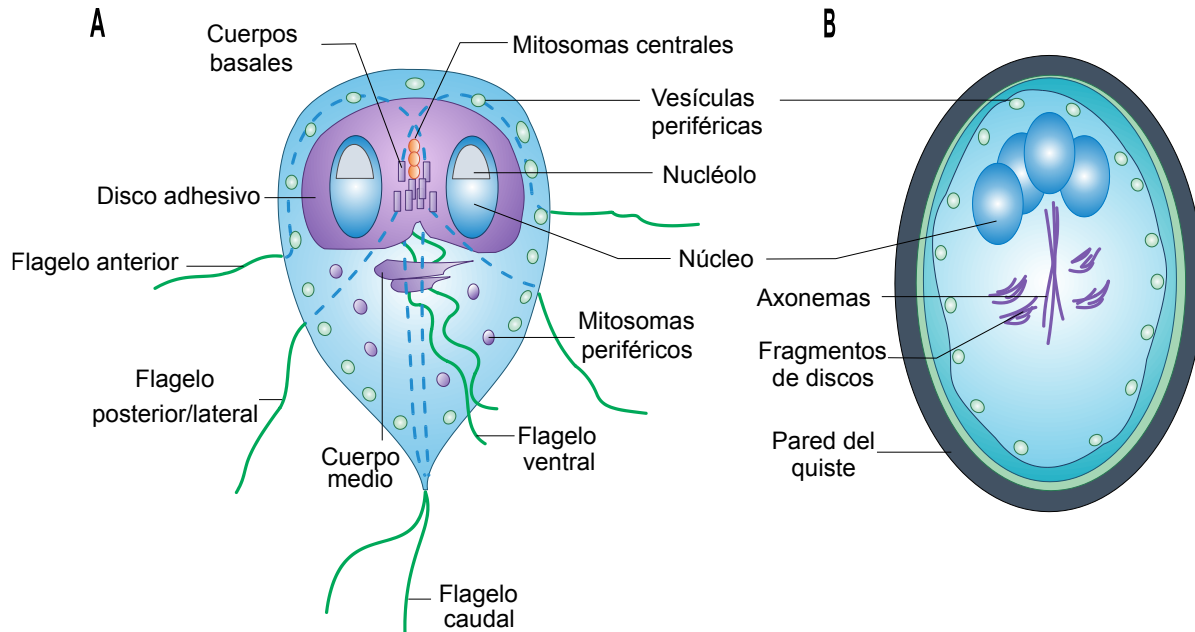


**Figura 1.** Ciclo de vida de *Giardia lamblia* y mecanismo de infección. Los quistes de *Giardia* desprendidos en las heces son infecciosos. La infección se produce tras la ingestión de quistes, a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados. Los quistes son resistentes al medio ambiente y pueden persistir durante meses en el suelo o el agua. Los trofozoítos permanecen libres en el lumen intestinal o adheridos a los enterocitos de las vellosidades, lo que provoca signos clínicos. Los trofozoítos se enquistan al desplazarse hacia el colon, convirtiéndose en quistes infecciosos, que se eliminan en las heces (tomado y modificado de Esch y Petersen, 2013).

Los trofozoítos tienen simetría bilateral y forma de “cometa”, miden de 12 a 15  $\mu\text{m}$  de longitud, 5-9  $\mu\text{m}$  de ancho y 1-2  $\mu\text{m}$  de espesor. La superficie dorsal es convexa, mientras que la superficie ventral suele ser cóncava, está formada por un disco adhesivo binucleado con un núcleo en el centro de cada lado con su respectiva membrana nuclear, cada núcleo contiene un nucléolo. El borde de los discos adhesivos está soportado por microtúbulos y microfilamentos, conocidos como cuerpos basales, los cuales dan origen a ocho flagelos organizados en cuatro pares : el flagelo anterior, el flagelo ventral, el flagelo posterior/lateral y el flagelo caudal. Carece de

mitocondrias; no obstante, contiene mitosomas periféricos y centrales, y vesículas periféricas similares a lisosomas que se encuentran debajo de la membrana plasmática en toda la célula (Figura 2A) (Bogitsh *et al.*, 2013; Theel y Pritt, 2016).

Los quistes son ovales, miden de 8 a 12  $\mu\text{m}$  de largo y de 7 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho. En su interior el quiste contiene dos trofozoítos que culminaron la cariocinesis sin realizar la citocinesis, por lo que presenta cuatro núcleos, además contiene otras estructuras como axonemas, fragmentos del disco adhesivo y vesículas periféricas. La pared exterior del quiste tiene un grosor de 0.3-0.5  $\mu\text{m}$  y está compuesta por una red de filamentos de 7-20 nm de diámetro, y principalmente por N-acetilgalactosamina y tres proteínas diferentes llamadas proteínas de la pared del quiste 1, 2 y 3, proteínas quísticas invariables, y proteínas quísticas similares al factor de crecimiento epidermal. También contiene una capa interna formada por dos membranas que están separadas por un espacio peritrófico (Figura 2B). Los quistes presentan una actividad metabólica baja, que corresponde con entre el 10 y 20% de la observada en los trofozoítos (Bogitsh *et al.*, 2013; Theel y Pritt, 2016).



**Figura 2.** Morfología del parásito *Giardia lamblia* en sus dos estadios, en forma de trofozoito y quiste. **A)** El trofozoito de *Giardia lamblia*. El disco adhesivo contiene dos núcleos, separados por mitosomas centrales y cuerpos basales, los cuales dan origen a cuatro pares de flagelos. El citoplasma contiene mitosomas y vesículas periféricas. **B)** Los quistes de *Giardia* tienen forma ovalada, cuatro núcleos, vesículas periféricas, axonemas y fragmentos de discos (tomado y modificado de Ankarklev *et al.*, 2010).

### 1.2.2 Metabolismo de *Giardia lamblia*

Se ha reportado que los mitosomas de *G. lamblia* no contienen genoma y han perdido la capacidad de generar energía a través de fosforilación oxidativa, por lo que obtiene su energía por fosforilación a nivel de sustrato (Einarsson *et al.*, 2016). Se sabe que este parásito tiene una capacidad mínima para la biosíntesis *de novo* de lípidos, purinas y pirimidinas, lo que obliga al parásito a captar estos elementos de su hospedero y proliferar con vías de recuperación. Los trofozoitos utilizan la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato y la vía de la arginina dihidrolasa para obtener energía por fosforilación a nivel de sustrato. El metabolismo predominante en *G. lamblia* es fermentativo, y su principal metabolito para la producción de energía es la glucosa. La mayoría de las enzimas que llevan a cabo el metabolismo se encuentran solubles en el citoplasma, y los productos finales de la fermentación de la glucosa son acetato, alanina, dióxido de carbono, etanol, e hidrógeno. Cuando el parásito está enquistado disminuye el catabolismo de la glucosa para

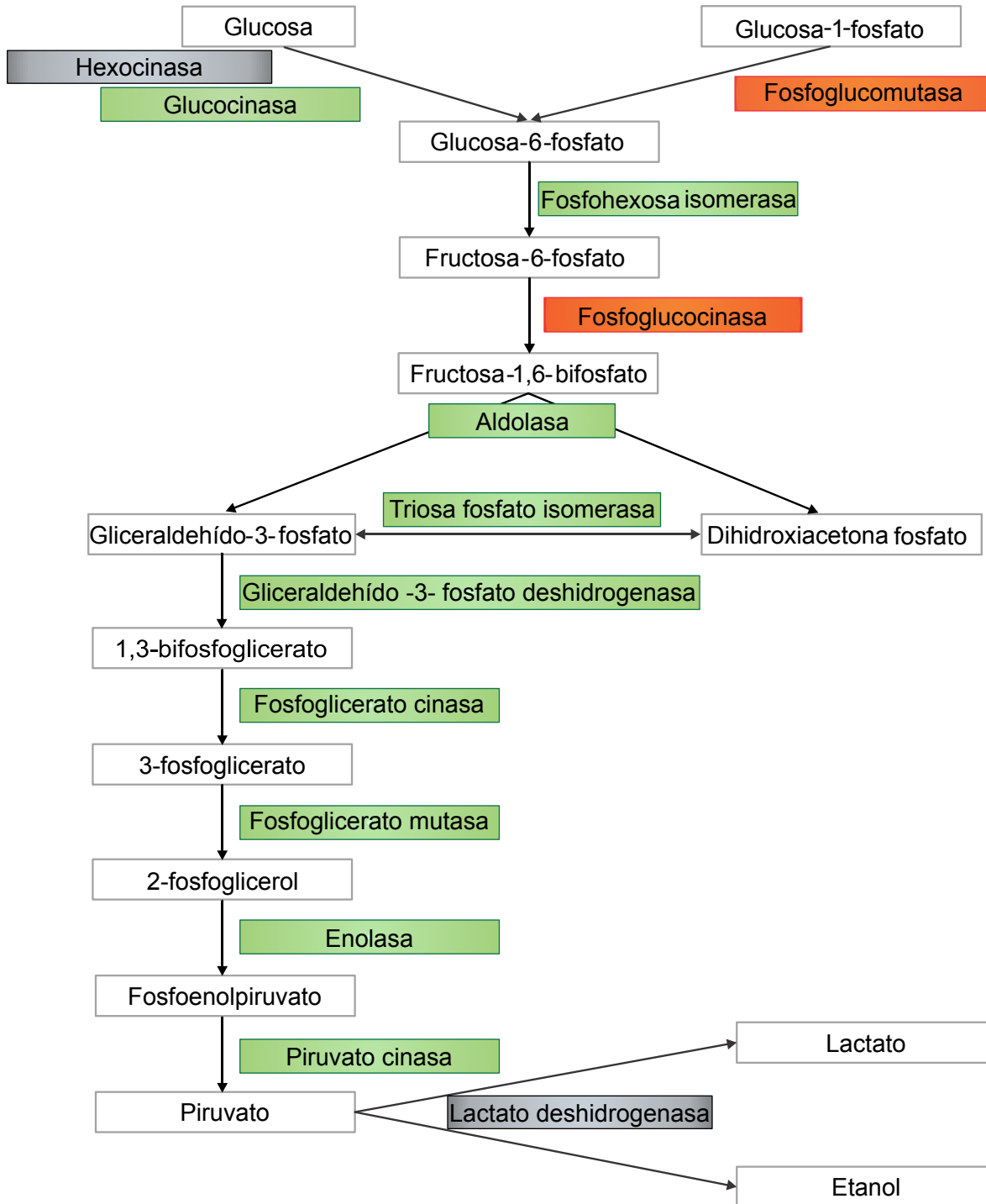


obtener energía, y durante el enquistamiento convierte la glucosa en N-acetilgalactosamina. Por otro lado, los trofozoítos aumentan el catabolismo de arginina para compensar la energía necesaria (Luján y Svärfd, 2011; Karnkowska *et al.*, 2016).

### 1.2.2.1 Glucólisis

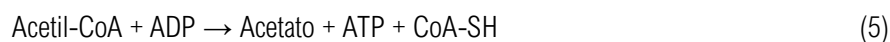
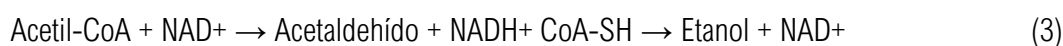
La vía de la glucólisis es la primera etapa de la oxidación de la glucosa en la mayoría de los eucariontes y procariontes. Se lleva a cabo por la vía anaerobia Embden-Meyerhof-Parnas, que consta de 10 reacciones enzimáticas para la conversión de glucosa en dos moléculas de piruvato y dos moléculas de ATP mediante la fosforilación a nivel de sustrato. Estas reacciones enzimáticas están reguladas por ciertas enzimas claves (Karp, 2011).

*G. lamblia* es un organismo que obtiene su energía metabólica principalmente de la glucólisis anaerobia dependiente de pirofosfato, es decir, utiliza el pirofosfato (PPi) como donador de grupos fosfato. Se han identificado dos enzimas que convierten el fosfoenolpiruvato en piruvato, la enzima piruvato quinasa (PK) y la enzima piruvato fosfato diquinasa dependiente de pirofosfato (PPDK), que cataliza la generación de dos moléculas de ATP, lo que resulta en una ganancia neta de 5 moléculas de ATP (Feng *et al.*, 2008). Para *G. lamblia* aún no está definida la regulación de esta vía metabólica; sin embargo, se han identificado las enzimas que participan en la vía de la glucólisis y se ha observado que algunas enzimas parecen más similares a la de las bacterias y a otros protistas (Figura 3) (Han y Collins, 2012).



**Figura 3.** Glucólisis de *Giardia lamblia*. Las enzimas identificadas en la base de datos de enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG, por sus siglas en inglés) están marcadas en verde; las enzimas identificadas por Han y Collins están marcadas en naranja; las enzimas que no están presentes con respecto a la vía clásica están marcadas en gris (tomado y modificado de Han y Collins, 2012).

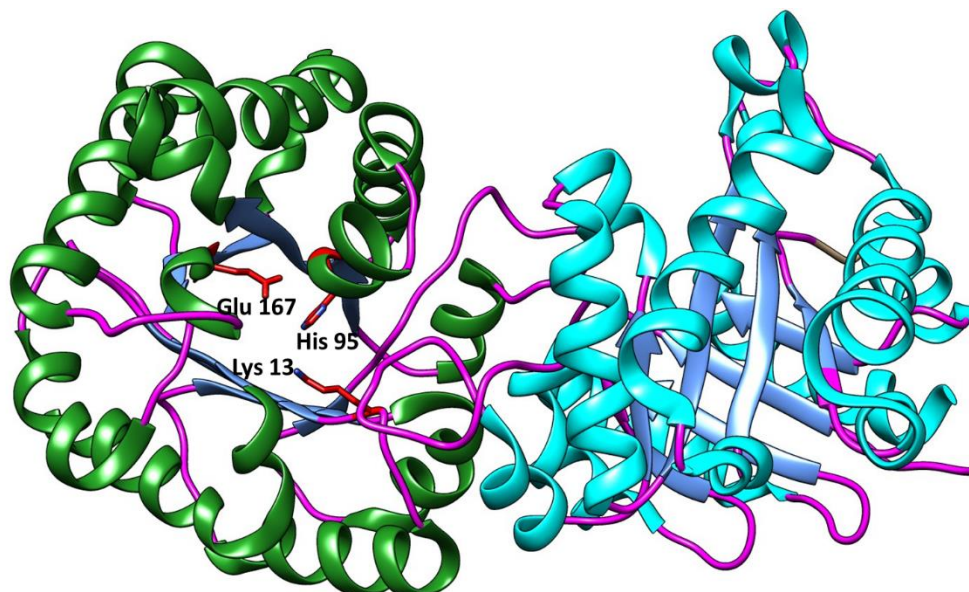
El metabolismo de los trofozoítos es afectado por cambios en la concentración de oxígeno. El piruvato obtenido de la glucólisis se reduce a etanol en ausencia de oxígeno, como se muestra en las ecuaciones (1)-(3); en condiciones aerobias como se representa en la ecuación (4), el piruvato se reduce a alanina mediante una reacción de transaminación, o en acetato mediante la enzima acetil-CoA sintetasa, ecuación (5) (Han y Collins, 2012).



#### 1.2.2.2 Triosafosfato isomerasa

Uno de los pasos clave para la eficiencia de la vía glucolítica es la isomerización de los intermediarios gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP) catalizada por la enzima triosafosfato isomerasa (TPI); esto es debido a que el GAP es el único que continúa la vía hasta sus productos finales (Figura 3) (Han y Collins, 2012).

Esta enzima glucolítica tiene una eficiencia catalítica del orden  $10^9$ , de tal manera que su actividad sólo se limita por la difusión del sustrato en el medio (Wierenga *et al.*, 2010). Estructuralmente, la TPI de *G. lamblia* es un homodímero constituido aproximadamente por 257 residuos de aminoácidos por monómero; cada subunidad tiene una masa molecular de 27.9 kDa, aproximadamente, posee ocho hélices  $\alpha$  unidas por bucles que rodean a ocho láminas  $\beta$  paralelas, formando un motivo estructural barril  $\alpha/\beta$ . Cada subunidad tiene un sitio activo cuyos residuos catalíticos son la lisina 13, histidina 95 y el ácido glutámico 167, los cuales están situados en la región central del barril, y se han conservado entre diferentes especies (Figura 4) (Richard *et al.*, 2014). También se ha identificado otra región importante de la TPI relacionada con la catálisis, conocida como asa catalítica debido a que se cierra sobre el sitio activo para mantener un núcleo hidrofóbico para el sustrato durante la isomerización (Enríquez-Flores, 2011).



**Figura 4.** Estructura de un homodímero de la triosafosfato isomerasa (TPI) de *Giardia lamblia*, representada en listones. Cada monómero, marcados en verde y azul, está constituido por 257 aminoácidos, conformados por ocho  $\alpha$ -hélices y ocho láminas  $\beta$ . En el monómero verde se representan los aminoácidos (Lys 13, His 95 y Glu 167) correspondientes al sitio activo. Imagen creada por el programa UCSF Chimera versión 1.15.

En 2008, Enríquez-Flores y colaboradores, estudiaron compuestos que derivatizan las cisteínas presentes en la enzima recombinante TPI de *G. lamblia*, concluyendo que la cisteína 222 promueve la inactivación total de la enzima, también demostraron que la TPI de *G. lamblia* es 200 veces más sensible a la inactivación que la TPI de humano. En 2011, Enríquez-Flores y colaboradores, observaron que la derivatización de las cisteínas provoca una alteración en la estabilidad térmica y una disminución de la actividad catalítica de la enzima. De esta manera se propuso que la enzima TPI podría ser un buen blanco farmacológico (Enríquez-Flores *et al.*, 2008; 2011).

En 2008, Desai y Miller sugirieron que la ganancia neta de ATP se ve comprometida por la inactivación y eliminación de TPI, lo que resulta en un déficit energético que afectaría a la sobrevivencia del parásito (Desai y Miller, 2008).

Otros estudios (Reyes-Vivas *et al.*, 2014; López-Velazquez *et al.*, 2019) han demostrado que el omeprazol inhibe la enzima recombinante TPI de *G. lamblia*, sin inhibir la proteína recombinante

TPI de humano. Evaluaron también la efectividad del omeprazol *in vitro* e *in situ* en mutantes TPI cuyos resultados mostraron que el mecanismo de inhibición de la TPI es por la unión del omeprazol a la cisteína 222 de TPI. La contribución más importante de estos estudios fue que la inhibición selectiva de la TPI propone a esta enzima como un potencial blanco de estudio para el desarrollo de nuevos fármacos. Sin embargo, aún no se ha estudiado el efecto del omeprazol en otras enzimas de *G. lamblia* (Reyes-Vivas *et al.*, 2014; López-Velázquez *et al.*, 2019).

### 1.3 Diagnóstico de la giardiasis

El diagnóstico clínico de *G. lamblia* se basa principalmente en la detección de la presencia del parásito en muestras fecales. Una vez que se obtiene la muestra de heces se aísla al parásito por método directo o por concentración. El método directo consiste en la suspensión de la muestra en solución salina fisiológica (0.9% NaCl), este método requiere dos o más muestras en días consecutivos, debido a que el número de quistes puede ser bajo. El proceso por concentración fecal es el más recomendable y se puede realizar por el método de flotación o por el método de sedimentación. Para la identificación de quistes en muestras de agua se utiliza el método de filtración o separación inmunomagnética. Una vez aislado el parásito se puede identificar mediante examen microscópico, detección de antígenos en heces o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Luján y Svärfd, 2011).

El examen microscópico es útil para identificar trofozoítos y quistes de *G. lamblia* a través de un frotis fecal, algunas técnicas de tinción se usan para teñir los trofozoítos o quistes de *G. lamblia*, la detección de quistes en muestras de agua se detecta mediante microscopía de interferencia diferencial (DIC) (Luján y Svärfd, 2011; Hooshyar *et al.*, 2019).

La detección de antígenos en heces se realiza mediante inmunoensayos enzimáticos o ensayos de fluorescencia, este ensayo se realiza cuando el diagnóstico por microscopía es incongruente. Esto se debe a que tienen una mayor sensibilidad, además de poseer una alta especificidad analítica (Theel y Pritt, 2016).

Finalmente, la técnica de PCR se utiliza principalmente para la identificación de diferentes especies y genotipos de *G. lamblia*, sobre todo para investigaciones taxonómicas y epidemiológicas (Luján y Svärfd, 2011).

## 1.4 Tratamiento contra la giardiasis

El tratamiento de la giardiasis inició con compuestos químicos como la quinacrina, con una eficiencia mayor al 90%. El mecanismo de acción de este fármaco consistía en la inhibición de la síntesis del ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés), produciendo una reducción en la viabilidad del quiste. Se observaron algunos efectos secundarios como náuseas, vómito, malestar general, daños dérmicos y trastornos psiquiátricos. Debido a esto fue reemplazada por fármacos de la familia de los 5-nitromidazoles, los cuales en la actualidad son los más usados para el tratamiento de la giardiasis debido a su eficiencia, bajo costo y disponibilidad. Dentro de esta familia se incluyen al metronidazol (MTZ), tinidazol, ornidazol y secnidazol (Gardner y Hill, 2001).

El MTZ es el tratamiento de primera línea para la giardiasis, ya que otras opciones de tratamiento disponibles son más costosas, menos eficientes o tienen efectos adversos más severos. Su mecanismo de acción, que lleva a la muerte del parásito, consiste en la activación del MTZ por las proteínas piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) y la ferredoxina de *G. lamblia*. Estas reacciones generan un radical aniónico nitro del fármaco que causa estrés oxidativo, dañando a la estructura helicoidal del DNA y a las proteínas del parásito. Otras proteínas que también activan al MTZ son la nitrorreductasa-1 y la tiorredoxina reductasa. La toxicidad selectiva del MTZ se consigue porque sólo el parásito tiene PFOR, y esta enzima es más estable que la misma enzima de otros protozoos (Leitsch *et al.*, 2011). Sin embargo, el tratamiento con MTZ fracasa en aproximadamente el 20% de los pacientes, además de que sólo atacan al parásito en forma de trofozoíto y no al quiste, inhibiendo parcialmente la presencia del parásito. También se ha observado que provoca efectos secundarios indeseables, incluyendo dolor general, náuseas, vómito, toxicidad en el sistema nervioso, sabor metálico en la boca y, principalmente, puede generarse resistencia al MTZ (Lau *et al.*, 1992; Upcroft y Upcroft, 2001; Lopes-Oliveira *et al.*, 2020).

Otra familia de fármacos utilizados es la de los bencimidazoles. Dentro de estos antiparasitarios se encuentran el albendazol y el mebendazol. El efecto tóxico de estos fármacos se da al unirse a la alfa-tubulina ( $\alpha$ -tub) del citoesqueleto del parásito para inhibir la polimerización. Esto ocasiona un cambio estructural importante que lleva a la pérdida de integridad del trofozoíto, finalizando en muerte celular. Sin embargo, también presentan efectos secundarios, como dolor

abdominal, daño hepático, daños nutricionales, alopecia y tienen la desventaja adicional de tener un costo elevado (Katiyar *et al.*, 1994).

Otros fármacos también usados son nitazoxanida, paramomicina, furazolidona, auranofina y bacitracina de zinc. Todos ellos tienen en particular que muestran efectos secundarios y no todos están bien estudiados (Vivancos *et al.*, 2018).

La principal falla farmacológica de todos estos tratamientos es la inducción de resistencia a los mismos. En algunos casos de giardiasis la combinación de estos fármacos era necesaria para tratar esta enfermedad, y así disminuir la resistencia a los fármacos.

El mecanismo de resistencia de *G. lamblia* más conocido es la disminución de la capacidad del parásito para activar radicales libres que evitan la activación del fármaco. La inactivación reductora del grupo nitro al derivado 5-amino es un mecanismo de resistencia que se propone que ocurra a través de las nitrorreductasas insensibles al oxígeno y los genes con resistencia a nitroimidazoles, haciendo que el metronidazol no sea tóxico. La supresión de la PFOR, conduce a resistencia al MTZ; cambios en la expresión de los genes implicados en las respuestas a estrés conducen también a resistencia al MTZ y nitazoxanida; mutaciones en la  $\beta$ -tubulina producen resistencia a los benzimidazoles (Vivancos *et al.*, 2018).

## 1.5 Biotecnología aplicada para la identificación y validación de nuevas dianas terapéuticas

El descubrimiento y el desarrollo de nuevas terapias es importante para prevenir, controlar y erradicar la giardiasis. Dado que *G. lamblia* es un parásito con una diversidad metabólica limitada, es importante comprender mejor sus vías metabólicas para descubrir nuevos fármacos. Por ello, es necesario tener una comprensión de la fisiología de *G. lamblia* y la respuesta del organismo, esto requiere un enfoque multimodal de la fisiología del parásito, donde es necesario el uso de una serie de técnicas que incluyan el análisis genético y bioquímico de las vías y las enzimas reguladoras clave. Este enfoque también es crucial para identificar objetivos farmacológicos dirigidos a procesos vitales de *G. lamblia* (Han y Collins, 2012).

Debido a los efectos secundarios de los fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiasis, se continúa en la búsqueda de fármacos que sean más específicos y menos dañinos. El desarrollo de nuevos fármacos es un proceso largo que se divide en una serie de fases, la primera fase consiste en la identificación, caracterización y validación de la diana terapéutica. La segunda fase consiste en la selección y optimización de compuestos farmacológicos. La última fase consiste en el desarrollo y optimización del fármaco en la fase preclínica y fase clínica (Hughes *et al.*, 2011; Vamathevan *et al.*, 2019). En las enfermedades parasitarias como la giardiasis, las dianas localizadas pueden tener su equivalente en el hospedador, de manera que la búsqueda de nuevos fármacos se basa principalmente en las diferencias estructurales entre la diana del parásito y el hospedador. Algunas herramientas moleculares para la validación de dianas terapéuticas son: sobreexpresión génica y silenciamiento por ácido ribonucleico de interferencia (RNAi, por sus siglas en inglés).

### 1.5.1 Sobreexpresión génica

Para explorar las vías biológicas, el enfoque genético clásico suele empezar por identificar las mutaciones que causan un fenotipo de interés. Tanto la sobreexpresión como el silenciamiento génico pueden causar fenotipos mutantes.

La sobreexpresión comenzó a explotarse como herramienta de detección de genes después del desarrollo de técnicas de transformación de la levadura (Hinnen *et al.*, 1978) y la construcción de bibliotecas genómicas (Nasmyth y Reed, 1980) en vectores derivados de un plásmido endógeno, que se mantienen en un número de 10-30 copias por célula (Rose y Broach, 1990). La transformación de una cepa de levadura con estas bibliotecas da como resultado un grupo de transformantes, cada uno de los cuales contiene un plásmido con un alto número de copias que tiene un promedio de solo cinco o seis genes, con un nivel de expresión para la mayoría de los genes aproximadamente proporcional al número de copias. En 1983, Rine y colaboradores intentaron identificar dianas farmacológicas describiendo proyecciones para identificar genes sobreexpresados que invertían los efectos inhibidores del crecimiento del organismo por la tunicamicina, la compactina/mevastatina y la etionina (Rine *et al.*, 1983). Esto permitió avances importantes en las bibliotecas de sobreexpresión, que pueden usarse para identificar los blancos farmacológicos y pueden ser útiles para identificar, independientemente, fenotipos en células



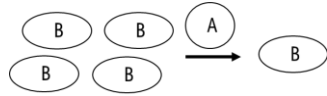
silvestres. Una vez establecida la viabilidad de las pruebas de sobreexpresión, se consolidó su aplicación para cualquier proceso biológico (Prelich, 2012).

Con el paso del tiempo se ha tenido una comprensión más concreta de cómo la sobreexpresión puede causar la inhibición o activación de una proteína, un complejo o una vía por diferentes mecanismos moleculares (Figura 5). Una forma en la que la sobreexpresión puede inhibir otra proteína es simplemente reduciendo la concentración de esa proteína. Los niveles de estado estacionario pueden reducirse afectando a cualquier nivel de expresión del gen, incluyendo la inhibición de su transcripción o traducción, o aumentando su tasa de degradación, como se observa de la figura 5, A-E. La activación de la sobreexpresión consiste en vías de señalización en las que la expresión de un paso de regulación clave puede desencadenar la vía (Figura 5, F-J) (Prelich, 2012).

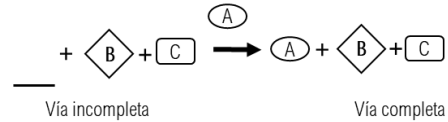
**INHIBICIÓN**

**ACTIVACIÓN**

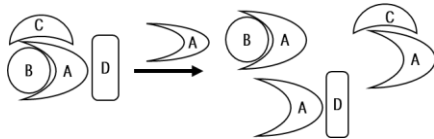
**A** Reducción de los niveles en estado estacionario: (SMURF2-KLF5; Du *et al.*, 2011)



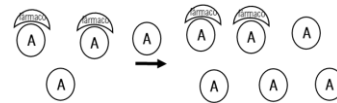
**F** Expresando un gen inactivo: (*eyeless*; Halder *et al.*, 1995)



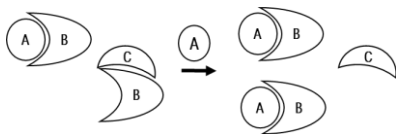
**B** Rompiendo un complejo estequiométrico: (histonas; Meeks-Wagner y Hartwell, 1986)



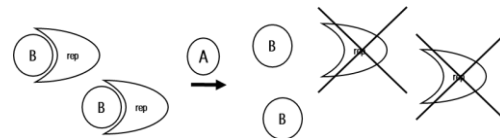
**G** Aumentando el nivel de una proteína limitante: (dianas farmacológicas; Rine *et al.*, 1983)



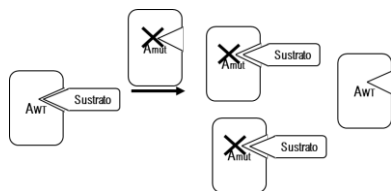
**C** Compitiendo por una subunidad compartida de dos complejos: (Est2-PinX1, Est2-TLC1; Lin y Blackburn, 2004)



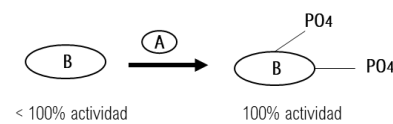
**H** Contrarrestando un represor: (Gal3/Gal80; Nogi *et al.*, 1984; Suzuki-Fujimoto *et al.*, 1996)



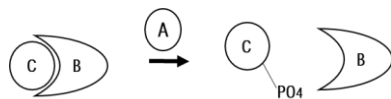
**D** Secuestrando una proteína (proteínas dominantes negativas; Hersowitz, 1987)



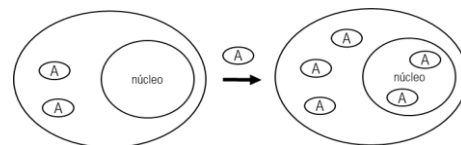
**I** Estimular la actividad específica: (MAPK-ER; Kato *et al.*, 1995)



**E** Inactivación funcional (Srk1-Cdc25; López-Aviles *et al.*, 2005)



**J** Activando una vía no relacionada: (neomorfos; Sopko *et al.*, 2006)



**Figura 5.** Mecanismos responsables de la sobreexpresión de fenotipos. Los mecanismos de sobreexpresión se pueden clasificar en dos amplias categorías que pueden inhibir (columna izquierda) o activar (columna derecha) proteínas, con mecanismos específicos que se describen a continuación. Para cada variación, se proporciona entre paréntesis un ejemplo representativo. **A)** La sobreexpresión puede simplemente reducir los niveles en estado estacionario de otras

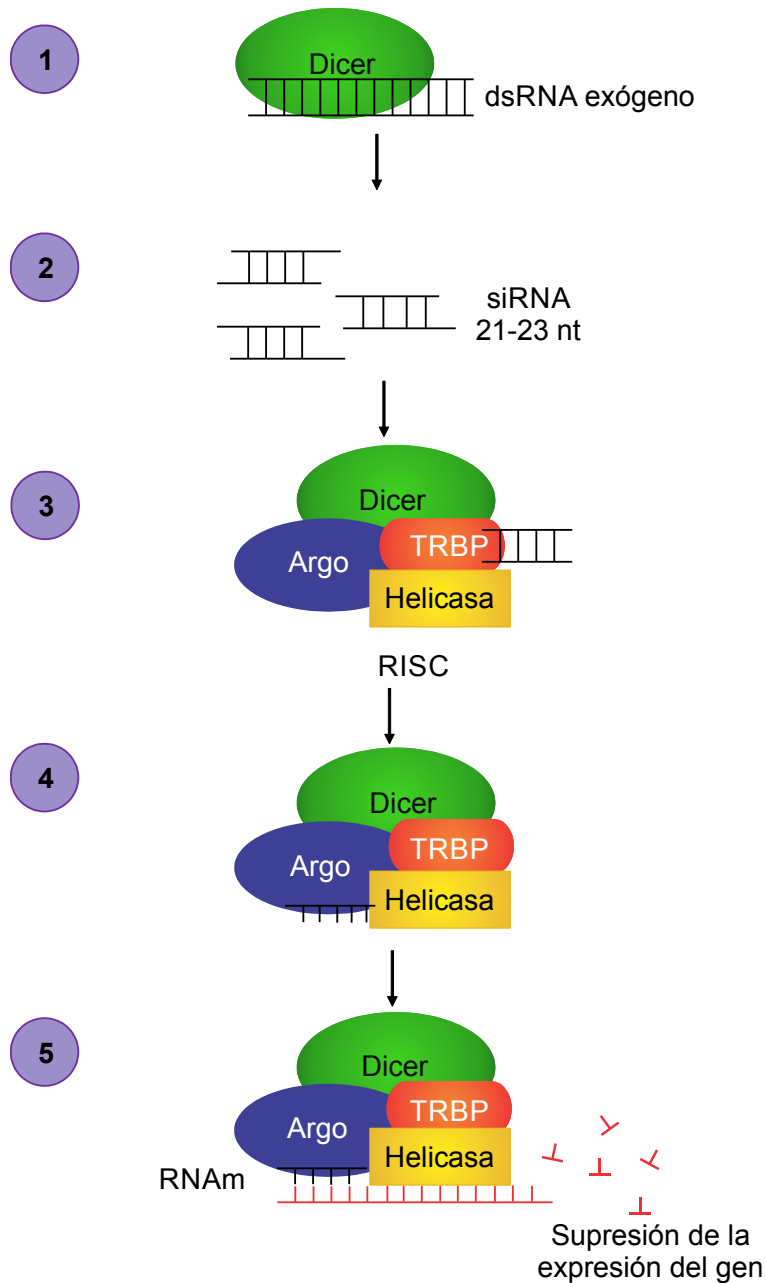
proteínas, al afectar su transcripción, traducción o su tasa de degradación. **B)** La sobreexpresión de la subunidad A que hace múltiples contactos dentro de un complejo multiproteico puede dar como resultado subensamblajes AB, AD o AC parciales, lo que reduce la cantidad del complejo ABCD funcional intacto. **C)** Si la proteína B participa en dos complejos AB y AC separados, la sobreexpresión de la subunidad A no compartida podría competir efectivamente por cantidades limitantes de proteína B, reduciendo la cantidad de complejos BC funcionales. **D)** La sobreexpresión de una enzima A mutante que aún puede unirse a su sustrato compite con ese sustrato de la enzima A de tipo salvaje mediante un mecanismo antimórfico o negativo dominante clásico. **E)** La sobreexpresión puede inactivar funcionalmente las proteínas independientemente de los mecanismos basados en la competencia. Representada aquí, la modificación postraduccional de una subunidad interrumpe una interacción proteína-proteína. **F)** La expresión de un gen normalmente silencioso en una condición en la que el resto de una vía está intacta puede activar su vía. **G)** La sobreexpresión de un gen en una condición en la que se expresa, pero de forma limitada, podría aumentar la actividad total y estimular la producción. **H)** La sobreexpresión contrarresta un represor por cualquier número de mecanismos, incluida la degradación del represor, su inactivación por modificación postraduccional o por competencia directa podría activar una vía. En este ejemplo, la sobreexpresión del gen A da como resultado la degradación de un represor (rep.), liberando la proteína B activa. **I)** La sobreexpresión puede aumentar la actividad específica de otras proteínas. El mecanismo más común es probablemente a través de modificaciones postraduccionales. **J)** La sobreexpresión puede activar nuevas vías a través de efectos neomórficos. Aquí, la sobreexpresión de la proteína A normalmente citoplásmica da como resultado la acumulación de una subpoblación en el núcleo, lo que provoca un nuevo fenotipo (tomada y modificada de: Prelich, 2012).

Para poder discernir el mecanismo responsable de generar el fenotipo mutante se emplea otra herramienta genética que ayude a distinguir entre las diferentes posibilidades, como puede ser el silenciamiento génico.

### 1.5.2 Silenciamiento génico

En 1998, Fire y colaboradores acuñaron el término RNAi, describiéndolo como una herramienta con la que se puede manipular la expresión génica mediante la hibridación del RNA insertado en una secuencia específica de RNA mensajero (RNAm, por sus siglas en inglés), a través de RNA bicatenario (dsRNA). Esto reduce la transcripción, desestabiliza los RNAm o inhibe la traducción del mensajero, siendo así un mecanismo de silenciamiento génico a nivel post transcripcional (Fire *et al.*, 1998; Fischer, 2015).

El silenciamiento por RNAi se basa en la degradación de una secuencia específica de RNA, debida a la formación de dsRNA homólogo en secuencia con el gen blanco. Este método permite silenciar uno o varios genes (Fu *et al.*, 2007). El mecanismo de silenciamiento por RNAi comienza con la transcripción de un gen por una RNA polimerasa II, que da como resultado un RNA precursor con una estructura secundaria en forma de tallo-asa. Los precursores son reconocidos y procesados en pequeños RNAi de doble cadena por enzimas tipo Dicer (Figura 6). Las proteínas Dicer forman parte de la familia de RNAasas clase III. Estas actúan mediante mecanismos distintos, es decir, el mecanismo de silenciamiento puede ser mediado por RNA pequeños de interferencia (siRNA) o micro RNA de interferencia (miRNA) de diferentes longitudes. La enzima Dicer corta la secuencia y genera siRNA de doble cadena de 21-23 nucleótidos que se unen al complejo de silenciamiento inducido por RNAi (RISC, por sus iniciales en inglés) conformado por Dicer, siRNA de doble cadena previamente cortado, proteína argonauta, helicasas de RNA y proteína de unión de RNA del TAR (TRBP). TRBP es una proteína de unión al siRNA de doble cadena, que orienta y posiciona la cadena correcta para que la proteína argonauta, que se encuentra en conformación abierta por su interacción con las proteínas de choque térmico (HSP90), se una a la hebra de siRNA monocatenaria y por reconocimiento de pares de bases, se asocie al RNAm correspondiente. Al ser éste reconocido, se realiza un corte en medio de la región homóloga y el RNAm es degradado. En el caso de RNAi sintético, como los RNA de horquilla corta (shRNA), éstos son procesados de igual manera: la enzima Dicer corta y forma siRNA de doble cadena (Mocellin y Provenzano, 2004; Fischer, 2015).



**Figura 6.** Formación y mecanismo de acción de los siRNA. En el paso 1, la endonucleasa Dicer corta ambas cadenas de un RNA bicatenario para formar un siRNA pequeño (21 a 23 nucleótidos) que tiene extremos salientes (paso 2). En el paso 3, el siRNA se relaciona con un complejo proteínico, un pre-RISC, que contiene una proteína Argonauta capaz de dividir y retirar la cadena pasajera del dsRNA doble (paso 4). En el paso 5, el RNA guía de cadena sencilla, junto con proteínas del complejo RISC, se une con un RNA blanco que tiene secuencia complementaria. El RNA blanco podría ser mRNA. El RNA blanco se divide en un sitio específico por efecto de la proteína Argonauta y luego se degrada (Karp, 2011).

Para poder comprender la regulación transcripcional y la caracterización de la función génica es importante analizar los niveles de transcripción de genes específicos. Marcial-Quino y colaboradores, (2016b) identificaron con la técnica de transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) algunos de los genes que están involucrados en la vía de la glucólisis, metabolismo de aminoácidos, formación del citoesqueleto y estrés oxidativo en tres cepas de *G. lamblia*: cepa silvestre WB (WtWB), resistente a nitroimidazol y resistente a MTZ. La expresión de cada gen de referencia fue variable en diferentes condiciones, en la WtWB los genes  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido reducido (*nadh*) oxidasa y aldolasa (*ald*) fueron más estables y el gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*) fue inestable. Finalmente, se sugirieron a los genes de *ald*, *nadh*, *actina* (*act*) y glutamato deshidrogenasa (*gdh*) como genes de referencia óptimos para normalizar y cuantificar la expresión de genes de la cepa WB (Marcial-Quino *et al.*, 2016b).

En 2017, este mismo grupo de investigación evaluó el efecto del silenciamiento génico mediado por RNAi del gen *nadh oxidasa*. La expresión se cuantificó en células transfectadas que expresaban dsRNA, utilizando la técnica de RT-qPCR. Los autores observaron en los trofozoítos transfectados una disminución del 30% de NADH oxidasa a nivel de RNAm, una disminución de la actividad enzimática y una reducción en el número de trofozoítos, llegando a la conclusión de que la NADH oxidasa es una enzima importante para el metabolismo del parásito (Marcial-Quino *et al.*, 2017).

## 2. JUSTIFICACIÓN

En México, la giardiasis es un problema descuidado de salud pública y se incluyó en la iniciativa de enfermedades olvidadas. El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), en el 2020 consideró a la giardiasis entre las 10 principales enfermedades parasitarias, acumulando 5 794 casos nuevos de enfermedad por *G. lamblia*, que afectaron principalmente a niños y personas inmunodeprimidas. Desafortunadamente, el tratamiento para esta enfermedad no es específico y el parásito genera resistencia, por lo que continúa la búsqueda de nuevas alternativas que ayuden a contrarrestar los efectos secundarios ya mencionados. En la búsqueda de nuevas dianas para el diseño de fármacos durante varios años se han propuesto a las proteínas como potenciales objetivos, debido a su importancia biológica; estas proteínas deben presentar una actividad esencial en la supervivencia del parásito y presentar baja similitud en secuencia y estructura con la proteína del hospedero. Dado que *Giardia lamblia* es un parásito con limitadas vías metabólicas, es importante comprender mejor las mismas para descubrir nuevas dianas terapéuticas y así desarrollar nuevos fármacos. En el presente trabajo se analizó la sobreexpresión y silenciamiento del gen que codifica para la enzima TPI de *G. lamblia*, el cual participa en la vía de la glucólisis, con la finalidad de evaluar la relevancia de la enzima en su metabolismo y sus efectos fisiológicos en el parásito, para poder considerar dicha enzima como un posible blanco farmacológico para el tratamiento de la giardiasis.

### 3. HIPÓTESIS

La enzima TPI es esencial en el metabolismo de *G. lamblia*. La sobreexpresión del gen que codifica esta enzima en *G. lamblia* (*GITpi*) aumentará la concentración de la enzima TPI, activando el metabolismo de la glucosa y el crecimiento del parásito.

El silenciamiento del gen *GITpi* disminuirá la concentración de la enzima TPI y por consiguiente la isomerización de GAP y DHAP, produciendo un efecto negativo en el metabolismo celular y en el crecimiento de *G. lamblia*.



## 4. OBJETIVOS

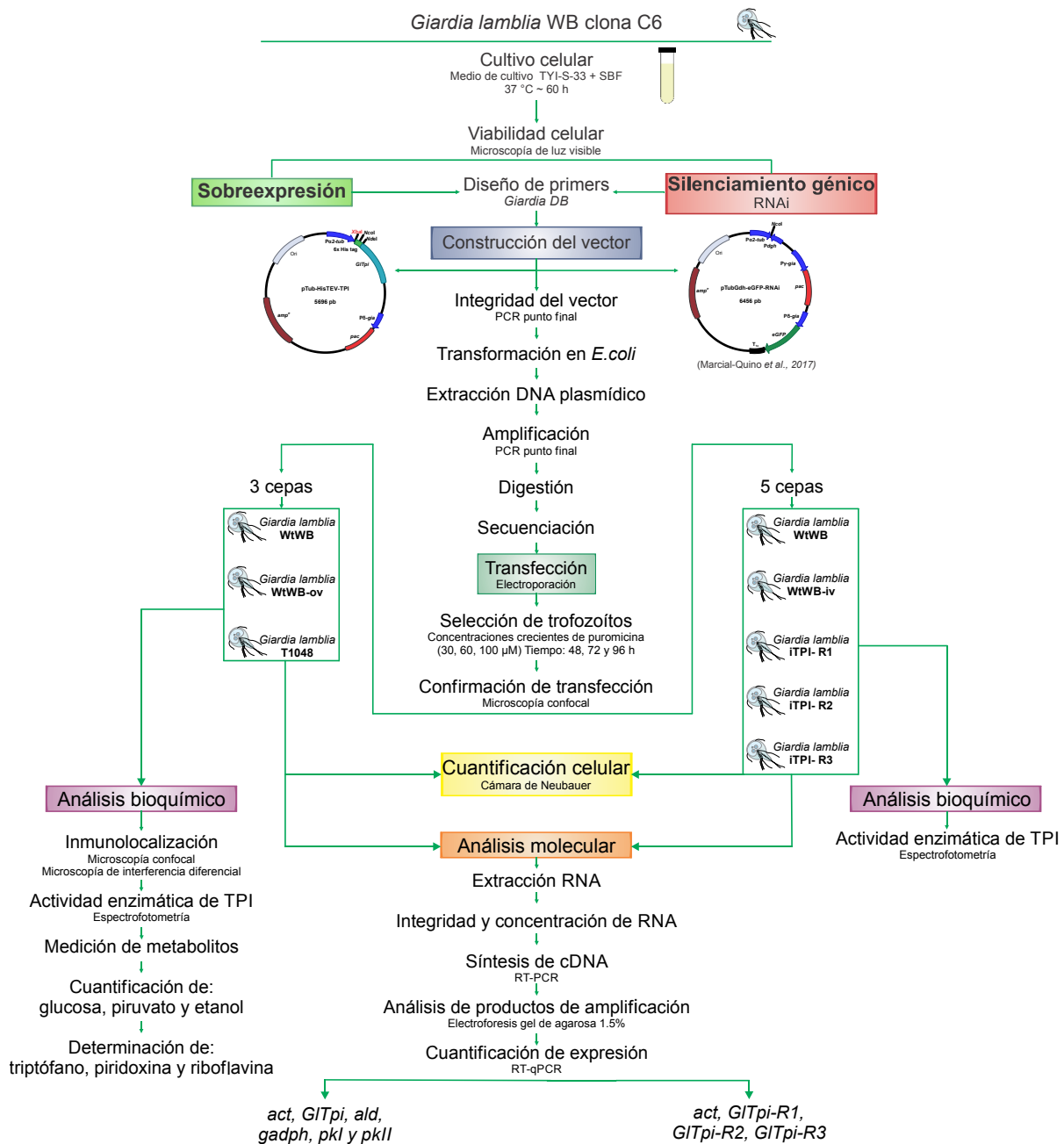
### 4.1 Objetivo general

Evaluar los cambios fisiológicos, genéticos y bioquímicos producidos por la sobreexpresión y el silenciamiento del gen *GITpi* en el parásito *G. lamblia*, para evidenciar su potencial como diana farmacológica anti giardiasis.

### 4.2 Objetivos particulares

1. Construir vectores para la sobreexpresión y silenciamiento del gen *GITpi*.
2. Evaluar la sobreexpresión y silenciamiento génico por RNAi de *GITpi* en el crecimiento de *G. lamblia*.
3. Determinar la expresión de los genes involucrados en la glucólisis después de sobreexpresar y silenciar el gen *GITpi*.
4. Evaluar los cambios metabólicos en *G. lamblia* después de la sobreexpresión y silenciamiento génico de *GITpi*.

# 5. METODOLOGÍA



Los experimentos se realizaron a las 24, 48, 72 y 96 h

**Figura 7.** Metodología para la sobreexpresión y el silenciamiento del gen *GITpi*. La primera fase consiste en establecer las condiciones de cultivo celular, diseño los primers y construcción de los vectores. Los trofozoítos fueron transfectados, se seleccionaron los trofozoítos que presentaron resistencia a puromicina y finalmente se realizó la

confirmación de transfección por microscopía confocal. Para la sobreexpresión se trabajó con 3 cepas: la cepa silvestre (WtWB), la cepa con el vector sin el gen (WtWB-ov) y la cepa sobreexpresada (T1048). Para el silenciamiento se trabajó con 5 cepas: la cepa silvestre (WtWB), la cepa con el vector sin el gen (WtWB-iv), y las cepas con las tres regiones diferentes del gen *GITpi* (iTPI-R1, iTPI-R2 e iTPI-R3). La segunda fase en la cuantificación celular. La tercera fase en el análisis molecular de la sobreexpresión y silenciamiento, donde se realizó extracción de RNA, síntesis de cDNA y cuantificación de la expresión de diferentes genes *triosafosfato isomerasa (GITpi)*, *aldolasa (ald)*, *gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa (gadh)*, *piruvato cinasa isoforma I (pkI)* y *piruvato cinasa isoforma II (pkII)*, tomando como control el gen de referencia el gen de *actina (act)*. En la cuarta fase se analiza el cambio metabólico producido por la sobreexpresión y silenciamiento del gen *GITpi*, se realizó la inmunolocalización de la enzima TPI, y se cuantificaron diferentes metabolitos: glucosa, piruvato, etanol y triptófano, piridoxina y riboflavina. Cada medición se realizó a las 24, 48, 72 y 96 h de crecimiento.

En este proyecto se establecieron las condiciones de cultivo para la cepa *G. lamblia* WB clona C6, posteriormente se dividió en dos secciones: la sobreexpresión y el silenciamiento génico de *GITpi*. Cada sección se divide en 4 fases: la construcción del vector, la cuantificación celular, el análisis molecular y el análisis bioquímico (Figura 7).

## 5.1 Material biológico

Los trofozoítos WT de la cepa *G. lamblia* WB clona C6 (WtWB), se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC 50803, Rockville, USA). Los trofozoítos WtWB y los transfectados se cultivaron axénicamente en condiciones de esterilidad en medio TYI-S-33 (ATCC® medio 2695) suplementado con suero bovino fetal (SBF) y antibióticos (ampicilina, cefalotina y anfotericina) en concentraciones de 10, 10 y 5 µg/mL, respectivamente. Los trofozoítos se mantuvieron en tubos que contenían 9 mL de medio y se incubaron a 37 °C. Al alcanzar una monocapa confluyente (~60 h), las células se colocaron en hielo durante 15 min y se recolectaron por centrifugación a 1534 × *g* durante 15 min a 4 °C; el botón celular resultante se lavó dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con un pH de 7.4.

## 5.2 Desarrollo experimental: sobreexpresión

### 5.2.1 Diseño de primers para la sobreexpresión del gen *GITpi*

Las secuencias de los primers utilizados se obtuvieron de la página GiardiaDB (GiardiaDB, 2022) donde se encuentra el genoma de *G. lamblia*. Los primers utilizados se muestran en la Tabla 1. La síntesis de primers y la secuenciación de fragmentos se realizó en la Unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM (Cuernavaca, México). El gen *Pa2-tub* (GL50803\_103676) y el gen *GITpi* (GL50803\_93938), así como la mutagénesis dirigida para eliminar los sitios de restricción *Ndel* se realizaron sobre el promotor y el plásmido (pTub-HisTEV-Tpi).

Tabla 1. Primers para la sobreexpresión del gen *GITpi*.

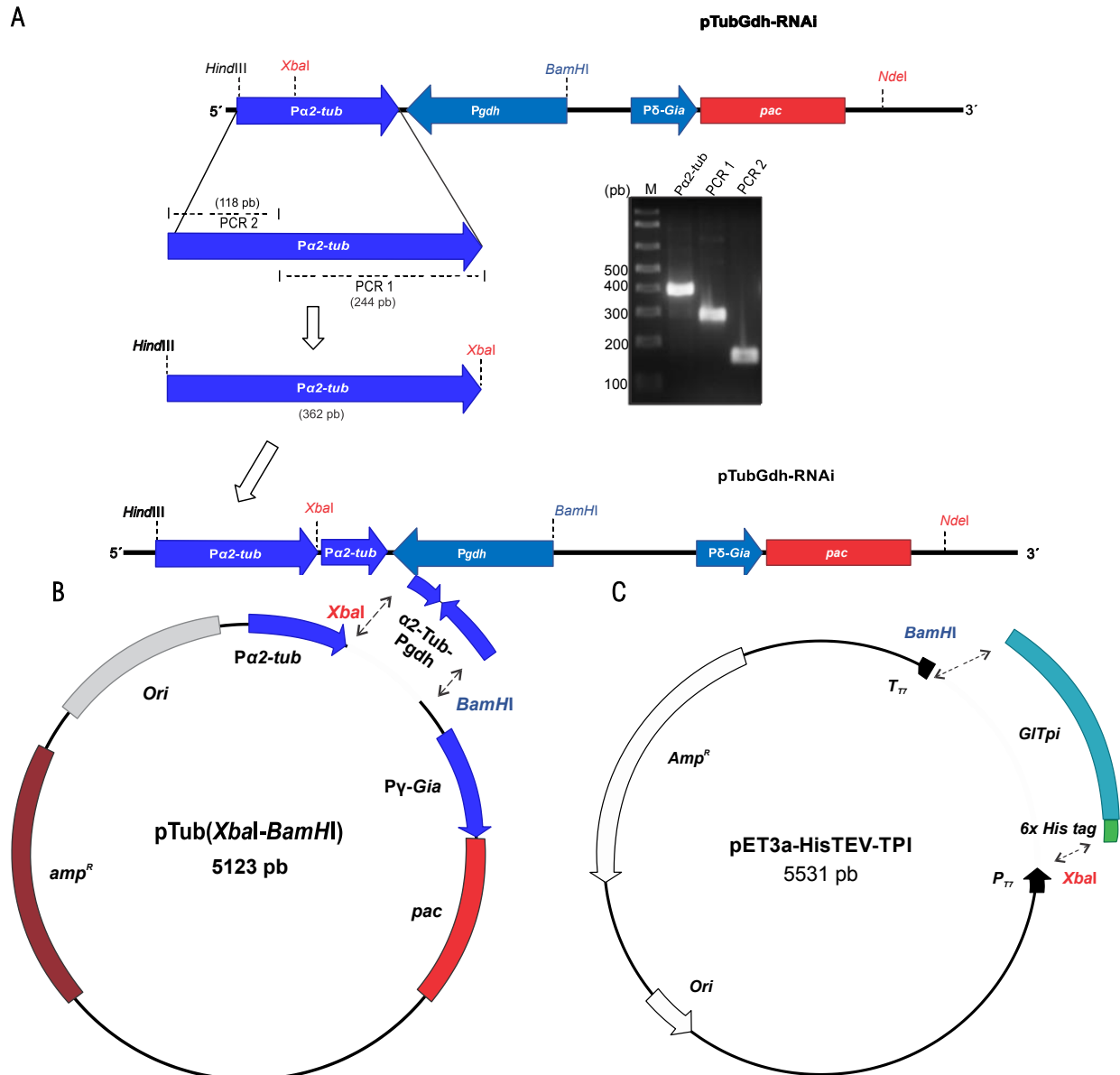
Primer	Secuencia (5'- 3')
Fw-Tub	ACTCAAGCTTCGCAGACGC
Rv-Tub	ATTATCTAGATTTTATTTCCGCCCG
Fw-Tub mut	GTCACTGATCATTITAGAATGCAATG
Rv-Tub mut	CATTGCATTCTAAATGATCAGTGAC
Fw-pMut <i>Ndel</i>	ATTTACACCCGCAATGGTGCCTCTCA
Rv-pMut <i>Ndel</i>	TGAGAGTGCACCATITGCGGTGTGAAAT
Fw-qAct	TTGCCGTACCTGCCTTCTAT
Rv-qAct	GCCCGGAAGTGTAGAGAGC
Fw-qTpi	AGGAGCTCGGAGAGTCCAA
Rv-qTpi	ACACGGGCTCGTAAGCAAT
Fw-Gdh	CACAGGCAAGAACGTCAA
Rv-Gdh	CCCGTTGGAGTCTGAGAA
Fw-pJET	CCCGTTGGAGTCTGAGAA

Nota: Los sitios de restricción en los primers están marcados en negrita. Los nucleótidos subrayados y en negrita indican el cambio de la base para eliminar los sitios de restricción *Xba*l y *Ndel* por mutagénesis. Fw: sentido, Rv: antisentido.

### 5.2.2 Construcción del plásmido pTub-HisTEV-Tpi para la sobreexpresión del gen *GITpi*

Para la construcción del vector de sobreexpresión del gen *GITpi* se usó como base el plásmido pTubGdh-RNAi (Marcial-Quino *et al.*, 2017), el cual contiene los promotores *Pa2-tub* y *Pgdh*, el gen de resistencia a puromicina N-acetil transferasa (*pac*) mediado por *Pγ-Gia*. El promotor *Pa2-tub* es un promotor de expresión constitutivo (Elmendorf *et al.*, 2001), por lo que se utilizó para regular la expresión del gen *GITpi*. A este promotor se le realizó mutagénesis dirigida para eliminar un sitio de restricción *XbaI* (Figura 8A) y dar origen al vector pTub (*XbaI-BamHI*) (Figura 8B). En la Tabla 1 se muestran los primers Tub mut sentido (Fw) y antisentido (Rv) usados en la mutagénesis sitio dirigida.

A partir del vector pET3a-HisTEV-Tpi (Figura 8C), se obtuvo el gen *GITpi* por digestión con las enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI*; además el gen contiene en el extremo 5' una secuencia de nucleótidos que codifica seis histidinas (etiqueta 6x His) y una región del gen de la enterocinasa del virus del tabaco (*tev*) para la eliminación de la etiqueta 6x His. El casete obtenido HisTEV::*GITpi* se ligó al plásmido pTub (*XbaI-BamHI*)\_Pac digerido con *XbaI* y *BamHI*, para obtener el vector pTub-HisTEV-Tpi (Figura 10A). Es importante mencionar que este plásmido puede ser utilizado para la clonación de otros genes de interés de *G. lamblia*.



**Figura 8.** Estrategia utilizada para la construcción del plásmido para la expresión homóloga de genes en *G. lamblia*. **A)** Mapa lineal del plásmido pTubGdh-RNAi con dos promotores diferentes (*Pα2-tub* y *Pgdh*) y mutagénesis dirigida realizada en el *Pα2-tub* para eliminar sitio de restricción *XbaI**XbaI*. El plásmido pTubGdh-RNAi contiene dos promotores continuos *Pα2-tub* en la misma dirección, región completa e incompleta (362 y 251 pb, respectivamente), pero ambos sin sitio de restricción para *XbaI* en su secuencia interna. Aunque el propósito fue eliminar posteriormente la región de 251 pb por digestión con *XbaI*-*Bam*HI para dar lugar al vector pTub (*XbaI*-*Bam*HI). **B)** Mapa del plásmido pTub (*XbaI*-*Bam*HI), al que se eliminó el promotor *Pgdh* con las enzimas de restricción *XbaI*-*Bam*HI para la inserción del gen *GITpi*. **C)** El plásmido pET3a-HisTEV-Tpi, donde el gen *GITpi* se une al HisTEV-Tpi y se aisló por digestión con las enzimas *XbaI* y *Bam*HI.

*Escherichia coli* TOP10F' (Invitrogen) fue transformada con el plásmido construido pTub-HisTEV-Tpi, y cultivada a 37 °C durante 12 h en placas de agar Luria-Bertani (LB) con 100 µg de ampicilina. El DNA plasmídico se extrajo usando el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El plásmido construido se verificó mediante PCR, digestión y secuenciación.

Para verificar el plásmido mediante PCR punto final en las células transformantes se realizó la amplificación utilizando la enzima DNA polimerasa Phusion (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) bajo las siguientes condiciones:

- Fase de desnaturalización previa: 3 min a 98 °C
- PCR 30 ciclos: 20 s a 98 °C, 10 s en el gradiente (60-70 °C), 20 s a 72 °C.
- Fase de extensión final: 5 min a 72 °C.

Los productos de PCR obtenidos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v), se tiñeron con GelRed (Nucleic Acid Gel, Biotium; Hayward, CA, USA) y se visualizaron en el equipo MultiDoc-it (UVP; Upland, CA, USA).

### 5.2.3 Transfección y selección de trofozoítos de *G. lamblia* con el vector pTub-HisTEV-Tpi.

Después de cultivar los trofozoítos en medio de cultivo TYI-S-33 durante 60 h, se recolectaron enfriando los tubos de cultivo en hielo durante 15 min y se centrifugaron a 1534 × *g* durante 15 min a 4 °C. Posteriormente, se añadió un volumen de 300 µL de una suspensión de trofozoítos que contenía 1 × 10<sup>7</sup> células a una cubeta de electroporación previamente enfriada (0.4 cm de espacio) con 50 µg de DNA plasmídico, la mezcla se incubó en hielo durante 5 min. Las condiciones de electroporación fueron las siguientes: 350 V, 1000 µF y 700 Ω en un GenePulser Xcell (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Después de la electroporación, la cubeta se colocó en hielo durante 15 min y las células se transfirieron a 7 mL de medio TYI-S-33 en un tubo de vidrio con rosca (Yee y Nash, 1995; Marcial-Quino *et al.*, 2017). Los trofozoítos transfectados fueron seleccionados por resistencia a puromicina, incrementando la concentración de puromicina cada 24 h; para lo cual, los trofozoítos se incubaron en medio de cultivo TYI-S-33 durante 24 h a 37 °C sin puromicina; posteriormente, a las 48 h se incubaron con 30 µM de puromicina, a las 72 h fueron cambiados a

medio fresco con 60  $\mu\text{M}$  de puromicina y finalmente, a las 96 h fueron suspendidos en medio fresco con 100  $\mu\text{M}$  de puromicina (Davis-Hayman y Nash, 2002; Su *et al.*, 2007). Los trofozoítos transfectados y seleccionados con puromicina se conservaron en medio de cultivo con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y se almacenaron en nitrógeno líquido. Todos los experimentos analíticos y moleculares de los trofozoítos transfectados se realizaron en presencia de puromicina (100  $\mu\text{M}$ ). La confirmación de que las células fueron transfectadas se realizó por microscopía confocal.

#### 5.2.4. Cuantificación celular

Los trofozoítos se recolectaron como se menciona en la sección 5.1 y se cuantificaron de forma tradicional en una cámara de Neubauer (GMBH, Alemania), se determinó su viabilidad mediante microscopía de luz visible. Se consideraron como células viables aquellas que mostraron una forma de “gota”, que reflejaron luz y presentaron movimiento flagelar en forma de espiral.

#### 5.2.5 Extracción de ácidos nucleicos (DNA y RNA)

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de un inóculo de  $1 \times 10^7$  trofozoítos de *G. lamblia* siguiendo el protocolo del reactivo DNAzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Este método también se utilizó en las cepas transfectadas de *G. lamblia* para determinar la integración de los vectores genómicos. El DNA total se utilizó como molde para amplificar el promotor de  $\alpha 2$ -tubulina (*Pa2-tub*) y la región del gen *GITpi*.

La extracción de RNA total se realizó mediante el protocolo del Reactivo TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), después de la extracción se trató 1  $\mu\text{g}$  de RNA con 1 U de DNasa I (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) para realizar los ensayos de RT-PCR y RT-qPCR. Se determinó la concentración e integridad del RNA ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) con el equipo NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). La integridad fue verificada en gel de agarosa al 0.8% (m/v).

#### 5.2.6 Síntesis de cDNA por RT-PCR

La síntesis de cDNA se realizó mediante el ensayo de RT-PCR. Se mezclaron 100 ng de RNA total tratado con 1 unidad de DNasa I en 1X DNase buffer y se mezcló con 0.5  $\mu\text{g}$  de oligo-(dT)18 (Thermo Scientific), mezcla de 10 mM de dNTPs y la transcriptasa RevertAid (Thermo Scientific), en un volumen final de reacción de 20  $\mu\text{L}$ . La mezcla se incubó durante 30 min a 16 °C, seguido



de 60 min a 42 °C, y posteriormente se detuvo la reacción calentando a 70 °C durante 10 min. El cDNA se almacenó a -20 °C hasta su uso. La amplificación del fragmento génico a partir del cDNA sintetizado se realizó mediante PCR de punto final, usando primers específicos y la enzima DNA polimerasa Phusion (Thermo Scientific) en un volumen final de 25 µL. Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

- Fase de desnaturalización previa: 2 min a 98 °C
- PCR 30 ciclos: 10 s a 98 °C, 10 s a 62 °C, 20 s a 72 °C.
- Fase de extensión final: 2 min a 72 °C.

Todos los productos de amplificación obtenidos a partir del cDNA se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con GelRed (Nucleic Acid Gel).

### 5.2.7 Cuantificación de la expresión génica de *GITpi* y otros genes por RT-qPCR

La amplificación y cuantificación de expresión del gen *GITpi* y otros genes como *ald*, *gadph*, *pkI* y *pkII* y *ppdk*, se realizó empleando el sistema de PCR en tiempo real StepOne™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Para este ensayo, se utilizaron 200 ng de cDNA y se mezclaron con el kit Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) utilizando las siguientes condiciones:

- Fase de desnaturalización previa: 95 °C durante 30 s.
- PCR 30 ciclos: 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min.
- Fase de extensión final: 60 °C durante 30 s.

La cuantificación de la expresión para los genes de *GITpi*, *Ald*, *Gapdh*, *PKI* y *PKII* se determinó mediante el método  $\Delta\Delta Ct$  (Ct: umbral de ciclo), de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\Delta Ct. = Ct. (\text{objetivo}) - Ct. (\text{normalizado}) \quad (6)$$

$$\Delta\Delta Ct. = \Delta Ct. (\text{experimental}) - \Delta Ct. (\text{control}) \quad (7)$$

El nivel de expresión relativo se determinó por el valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . (Marcial-Quino *et al.*, 2016a). El nivel de expresión del gen *act* se empleó como gen de referencia en todos los

experimentos y se realizaron cinco réplicas por cada reacción para analizar la expresión de los genes. El análisis de los datos fue realizado usando la versión 2.3 del software StepOnee.

El análisis densitométrico de los geles de agarosa al 2% se realizó utilizando ImageJ 1.50i (desarrollado por Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA)

### 5.2.8 Inmunolocalización de la enzima TPI por microscopía confocal

Para realizar la inmunolocalización por microscopía confocal, los trofozoítos se cultivaron, fijaron y se tiñeron directamente en un cubreobjetos (Neuvitro, Vancouver, WA, EUA), dentro de cada pozo de una placa de cultivo celular de fondo plano de 12 pozos (Corning, NY, EUA). A cada pozo se le adicionó un volumen final de 2 mL de medio TYI-S-33 con los trofozoítos suspendidos. Una vez que los trofozoítos se adhirieron al cubreobjetos, se quitó el medio de cultivo y las células se lavaron suavemente cinco veces con PBS.

Posteriormente, las células se cubrieron hasta una profundidad de 2 a 3 mm con metanol durante 15 min a temperatura ambiente. Después de la fijación, los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS durante 5 minutos cada uno. Las células se permeabilizaron con Tritón X-100 (0,1% en PBS) durante 10 min y se enjuagaron tres veces durante 5 min cada una con PBS. Las muestras se bloquearon con albúmina de suero bovino al 5%, suero de cabra normal al 2%, Triton X-100 al 0,1% y Tween-20 al 0,05% en PBS.

Las células se incubaron durante la noche a 4 °C con un anticuerpo primario de conejo, la disolución utilizada fue de 1:1000 para anti-*GITpi* en solución de bloqueo. Las muestras se lavaron con PBS-T (0.1% Tween-20) tres veces durante 5 min cada una, se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con fluorocromo Alexa 488 (Invitrogen, A11034 y A21424) y se diluyó en solución de bloqueo (1:500) durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células se contra tiñeron con yoduro de propidio y DAPI (1 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) Se lavaron tres veces durante 10 min cada una con PBS-T antes de montar con Dako.

El anticuerpo sonda-His (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) fue incubado a diluciones de 1:2000 y 1:1000 (v/v) durante 1 h a temperatura ambiente, posteriormente se lavó y se incubó durante 90 min con el anticuerpo secundario F(ab')<sub>2</sub> conjugado de cabra anti-conejo-

Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) utilizando una dilución 1:1000 (v/v). Posteriormente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio, se examinaron las células y se obtuvieron imágenes de fluorescencia utilizando ampliaciones 60 y 100X (microscopio Olympus FV1000, Japón).

Las longitudes de onda utilizadas en la microscopía para obtener las imágenes de inmunofluorescencia con anti *GITpi* fueron excitación (488 nm) y emisión (entre 495 y 507 nm). Las imágenes se procesaron usando Adobe Photoshop, las intensidades de fluorescencia se determinaron usando ImageJ (NIH) y los valores se graficaron usando GraphPad PRISM.

## 5.2.9 Cuantificación de glucosa, piruvato y etanol

### 5.2.9.1 Cuantificación de la concentración de glucosa

Se determinó la concentración de glucosa presente en el medio a diferentes tiempos de cultivo de los trofozoítos de *G. lamblia*. El consumo de glucosa se cuantificó mediante la técnica de azúcares reductores utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959).

### 5.2.9.2 Cuantificación de concentración de piruvato

La concentración de piruvato intracelular en los trofozoítos de *G. lamblia* ( $1 \times 10^7$  células/mL) se determinó mediante un ensayo enzimático utilizando la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) comercial. Los trofozoítos se incubaron en HClO<sub>4</sub> al 3%/EDTA 20 mM preparado al instante y se lisaron mediante sonicación. El lisado celular se centrifugó a  $10\,000 \times g$  durante 30 min a 4 °C, y el sobrenadante resultante se neutralizó con KOH 4 N y se usó inmediatamente para medir la actividad LDH en solución amortiguadora de trietanolamina 0.5 M/EDTA 5 mM, pH 7.6 con 6 mM de NADH más 3 unidades de enzima LDH. La reacción se inició con 150 µL de muestra (sobrenadante neutralizado) y la actividad enzimática se midió en un espectrofotómetro a 25 °C, monitoreando la oxidación de NADH a 340 nm (Bergmeyer, 1974).

### 5.2.9.3 Cuantificación de concentración de etanol

La producción de etanol se midió según el método de Beutler (Bergmeyer y Beutler, 1984). Los trofozoítos se cultivaron durante 96 h, durante este tiempo, se tomaron muestras en diferentes tiempos de cultivo (cada 6 h). Para separar los trofozoítos del medio de cultivo, se centrifugaron a

10.000 × *g* durante 30 min a 4 °C, y el sobrenadante resultante de la centrifugación se utilizó inmediatamente para medir la producción de etanol. El etanol se midió en solución amortiguadora de pirofosfato de sodio 100 mM, pH 8.8, con 8 mM de NAD y 5 unidades de la enzima alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD. La reacción se inició con 150 µL de muestra (sobrenadante neutralizado) y la actividad enzimática se midió en un espectrofotómetro a 25 °C, monitoreando la reducción de NAD a 340 nm.

#### 5.2.10 Determinación de la actividad enzimática de la enzima TPI

La actividad enzimática de TPI de los trofozoítos transfectados se analizó mediante espectrofotometría. Un inóculo de  $1 \times 10^7$  células se centrifugó a 1800 × *g* durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en Tris 50 mM pH 8. A continuación, las células se sonicaron durante 6 ciclos de 15 s a 4 °C en el mismo tampón complementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). La muestra se centrifugó a 12.300 × *g* durante 20 min a 4 °C y se colectó el sobrenadante. A continuación, se añadió una muestra de 4 µL a un 1 mL de mezcla de reacción que contenía 50 mM de Tris pH 8 y NADH 0.2 mM. La actividad se midió a 25 °C, siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 340 nm durante los primeros 3 min de lectura; los datos se expresaron como µmol de TPI \* min<sup>-1</sup> ×  $1 \times 10^7$  células; este procedimiento fue repetido tres veces (Castillo-Villanueva, 2016).

#### 5.2.11 Determinación de la concentración de triptófano, piridoxina y riboflavina en trofozoítos por espectroscopía de fluorescencia.

Se determinó la concentración de triptófano, piridoxina y riboflavina en los trofozoítos de *G. lamblia* en ausencia y presencia del vector de sobreexpresión. Para realizar este experimento, se recolectaron trofozoítos cultivados en fase logarítmica mediante centrifugación. Posteriormente, los trofozoítos fueron lavados dos veces con PBS estéril (pH 7.4), las células se suspendieron en la misma solución amortiguadora y se cuantificaron en una cámara de Neubauer. Se utilizó una concentración final de  $1 \times 10^7$  células/mL para el análisis en el espectrofluorómetro (Perkin Elmer, Wellesley, MA, EUA.). Los espectros de fluorescencia fueron obtenidos de acuerdo con lo previamente reportado (Podrazký *et al.*, 2003; Maslanka *et al.*, 2018). El contenido de triptófano, piridoxina y riboflavina fue estimado en las longitudes de onda de  $\lambda_{ex} = 290$  nm y  $\lambda_{em} = 325$  nm;

$\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$  y  $\lambda_{em} = 385 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{ex} = 460 \text{ nm}$  y  $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$ , respectivamente. Los valores se expresaron en unidades arbitrarias (UA).

### 5.2.12 Análisis estadístico: Sobreexpresión

Los resultados del crecimiento celular (N=4), cuantificación de la expresión relativa del gen *GITpi* y los genes involucrados en la glucólisis (N=5), detección de la proteína TPI por inmunofluorescencia (N=3), cuantificación de la glucosa, piruvato y etanol (N=6), actividad enzimática (N=3), consumo de glucosa y producción de etanol (N=3), se expresaron como el valor de la media  $\pm$  desviación estándar. Todos los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía para identificar las diferencias entre los grupos en los tiempos estudiados. Cuando el ANOVA mostró diferencias significativas, se realizó la prueba de Tukey-Kramer. Se utilizó el software estadístico SPSS y GraphPad Prism versión 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Se consideró estadísticamente significativo aquellos resultados con valores de  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ .

## 5.3 Desarrollo experimental: silenciamiento

### 5.3.1 Diseño de primers para el silenciamiento del gen *GITpi*

Para realizar el silenciamiento del gen *GITpi* se realizó el diseño de los primers utilizados en este trabajo como se describen en la Tabla 2. Las secuencias para el diseño de los primers se obtuvieron de la página GiardiaDB (GiardiaDB, 2022) del gen *GITpi* (GL50803\_93938). Los pares de primers se diseñaron a partir de secuencias de DNA para promotores y RNAm para el gen *GITpi*, utilizando el sitio web Primer3Plus (Primer3Plus, s.f.). En el diseño de los primers se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: longitud de 18-22 pares de bases (pb), contenido de GC de 45 a 55%, Tm  $60 \pm 2$  °C, tamaño del producto de 60 a 250 pb, y se evitó que los primers formaran estructuras secundarias y dímeros. Además, la especificidad de todos los primers se validó mediante PCR de punto final, se utilizó cDNA como molde y la enzima Q5TM High-Fidelity DNA polymerase (New England BioLabs) bajo las siguientes condiciones de amplificación:

- Fase de desnaturalización previa: 98 °C durante 30 s.
- PCR 30 ciclos: 98 °C durante 10 s, 60 °C durante 30 s, y 72 °C durante 30 s.
- Fase de extensión final: 72 °C durante 2 min.

Los productos de PCR amplificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (m/v) y se tiñeron con GelRed (Nucleic Acid Gel, Biotium) y fueron documentados con el equipo MultiDoc-It (UVP).

**Tabla 2.** Primers para el silenciamiento génico mediante RNAi de *GITpi*.

Primer	Secuencia (5'- 3')
Fw- <i>Tpi</i> región 1	AACT <b>CCATGG</b> ATGCCTGCTCGTC
Rv- <i>Tpi</i> región 1	CGCG <b>CCATGG</b> TCTAGGTACACATTC
Fw- <i>Tpi</i> región 2	CACT <b>CCATGG</b> CGGTAACCTCAAG
Rv- <i>Tpi</i> región 2	ATT <b>CCATGGA</b> ATGATACGGATATGCTGT
Fw- <i>Tpi</i> región 3	AATT <b>CCATGG</b> CTCCGAAAGTGGT
Rv- <i>Tpi</i> región 3	CACT <b>CCATGG</b> CTATGTACGGGTCTT
Fw- <i>qAct</i>	TTGCCGTACCTGCCTTCTAT
Rv- <i>qAct</i>	GCCCGGAACTGTAGAGAGC
Fw- <i>eGFP</i>	TTAATCTAGAAAGGAGGTGATCATATG
Rv- <i>eGFP</i>	TAATCTGCAGAGCTCTTTATTATTTTAAAG

Nota: Los sitios de restricción *Nco*I están marcados en negrita.

### 5.3.2 Vector pTubGdh\_eGFP-RNAi para el silenciamiento del gen *GITpi*

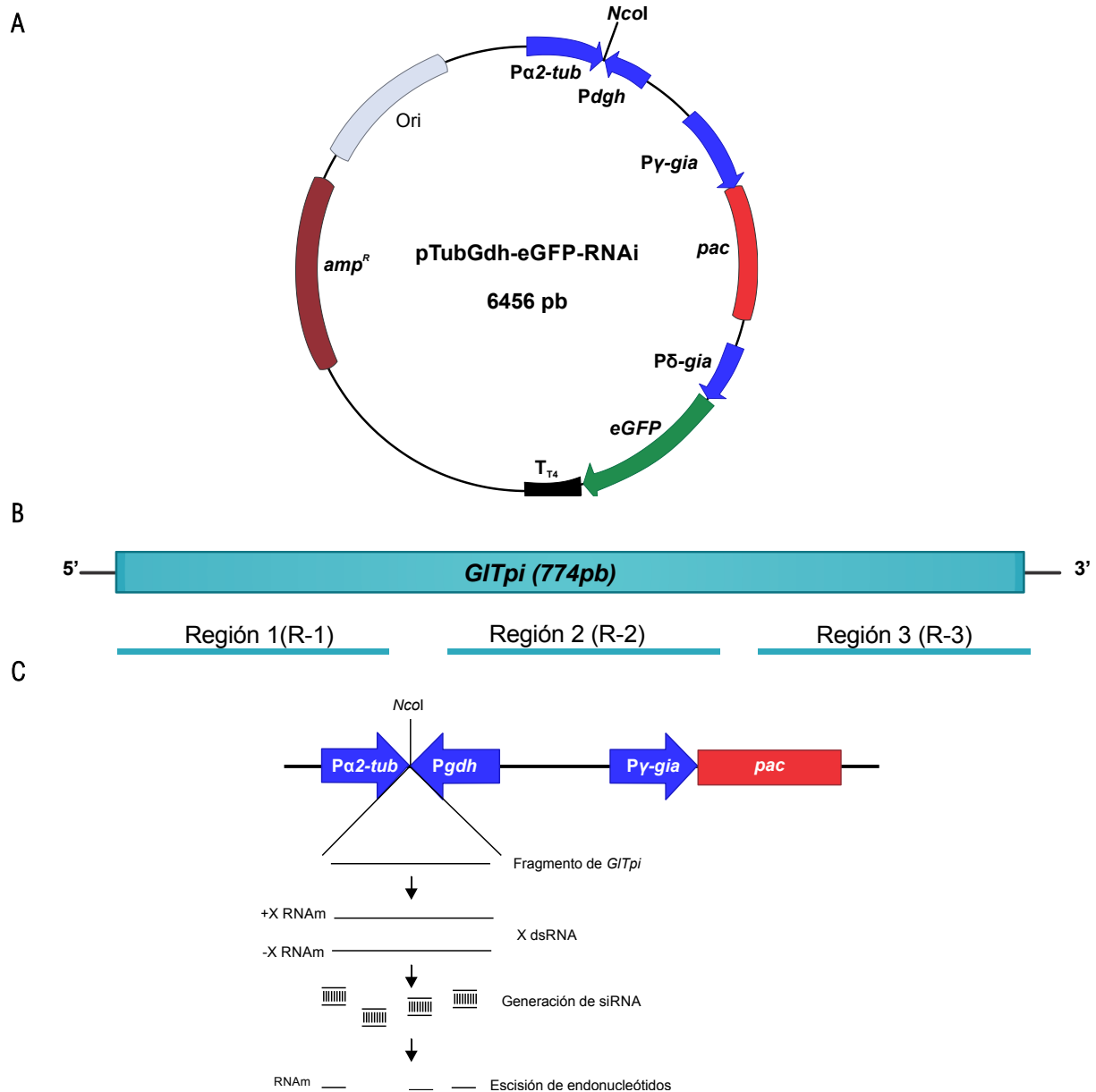
Se usó el vector pTubGdh\_eGFP-RNAi para la síntesis de dsRNA, previamente reportado por Marcial *et al.* (2017). Este vector contiene, como se muestra en la figura 9A, el gen reportero de la proteína verde fluorescente (*eGFP*), una región *pac* y una región de *Pa2-tub* y *gdh* colocados uno frente al otro y separados por un sitio de restricción *Nco*I. Esta región se denominó casete  $\alpha 2$ -*tub::gdh*; el sitio de restricción *Nco*I se utilizó para la clonación de los fragmentos de tres fragmentos del gen *GITpi*, de aproximadamente 200 pb (Figura 9A). Los fragmentos del gen *GITpi* se amplificaron por PCR con primers que contenían sitios *Nco*I en el extremo 5' (Tabla 2) en las siguientes condiciones:

- Fase de desnaturalización previa: 94 °C durante 4 min.
- PCR 30 ciclos: 94 °C durante 30 s, 60°C durante 10 s y 72 °C durante 60 s.
- Fase de extensión final: 72 °C durante 7 min

Posteriormente, los amplicones se digirieron con *Nco*I y se ligaron al vector. Todas las regiones amplificadas del gen *GITpi* se muestran en la Figura 9B. Los vectores que contienen los diferentes fragmentos se denominaron pTubGdh\_eGFP-RNAireg1, pTubGdh\_eGFP-RNAireg2, y pTubGdh\_eGFP-RNAireg3.

Todas las construcciones de los plásmidos se propagaron utilizando *Escherichia coli* Top 10F' (Invitrogen). Posteriormente, el DNA plasmídico se extrajo utilizando el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA). Para el aislamiento de niveles más altos de DNA plasmídico se usó el kit PureLink™ HiPure Expi Plasmid Megaprep (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA). Todas las construcciones se secuenciaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT, UNAM para confirmar su fidelidad.





**Figura 9.** Vector para generar dsRNA del gen *GITpi*. **A)** Vector pTubGdh-RNAi de 6456 pb, muestra la posición de los promotores  $\alpha 2$ -*tub* y *gdh* con el sitio de restricción *NcoI*. El gen *pac* que confiere la resistencia a puomicina como marcador selectivo para la transfección, y *eGFP* como gen reportero. **B)** Posición de los fragmentos utilizados para el silenciamiento del gen *GITpi*. **C)** Detalle del casete  $\alpha 2$ -*Tub*::*gdh*, mostrando el resultado esperado tras la inserción de los fragmentos del gen *GITpi* en el sitio de restricción *NcoI*, con la generación de dsRNA a partir del fragmento correspondiente y el posterior silenciamiento de la expresión del gen *GITpi* a través de la vía del RNAi.

### 5.3.3 Transfección y selección de trofozoítos de *G. lamblia* con el vector pTubGdh\_eGFP-RNAi

Los trofozoítos de *G. lamblia* se transfectaron como se realizó en el ensayo de sobreexpresión del gen *GITpi* (sección 5.2.3).

### 5.3.4 Síntesis de cDNA por RT-PCR

Para la RT-PCR, se mezclaron 100 ng de RNA total purificado de los trofozoítos de *G. lamblia* con 0.5 µg de oligo-(dT)18 (Thermo Scientific) y 15 µL de agua tratada DEPC (Invitrogen); la mezcla se incubó a 70 °C durante 5 min para desnaturalizar el RNA. Para la síntesis de cDNA se utilizó la transcriptasa inversa Revertaid (Thermo Scientific). La amplificación de los fragmentos del gen a partir del cDNA se realizó utilizando primers específicos y una DNA polimerasa de alta fidelidad en un volumen final de 25 µL. Las condiciones de PCR fueron:

- Fase de desnaturalización inicial: 5 min a 94 °C
- Fase del alineamiento 30 ciclos: 30 s a 94 °C, 60 s a 62 °C y 30 s a 72 °C
- Fase de extensión final: 7 min a 72 °C.

Todos los productos de amplificación obtenidos a partir de cDNA se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y se tiñeron con GelRed (Nucleid Acid Gel, Biotium) y se visualizaron en el equipo MultiDoc-It (UVP; Upland, CA, EUA).

### 5.3.5 Cuantificación de la expresión génica de *GITpi* por RT-qPCR

La expresión génica de *GITpi* se cuantificó mediante RT-qPCR utilizando un sistema de PCR en tiempo real StepOne™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) y el kit Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Los primers se diseñaron utilizando la secuencia del gen *GITpi* (GL50803\_93938) GiardiaDB (GiardiaDB, 2022) (Tabla 2), y fueron diseñados fuera de la región elegida para generar los dsRNAs. Se utilizó el gen constitutivo de *act* (ID del GenBank: XM\_001704601) como control de expresión constante (GiardiaDB, 2022). La cuantificación de la expresión del RNAm de los genes *GITpi* y *act* se determinó por el método  $\Delta\Delta C_t$  (Ec. 6 y 7, sección 5.2.7).

### 5.3.6 Determinación de la actividad enzimática de la enzima TPI

La actividad enzimática de TPI de los trofozoítos transfectados se analizó mediante espectrofotometría, de la misma manera como se realizó en el ensayo de sobreexpresión del gen *GITpi* (sección 5.2.10).

### 5.3.7 Análisis estadístico: Silenciamiento

Los resultados del crecimiento celular (N=25), cuantificación de la expresión relativa del gen *GITpi* glucólisis (N=15), y actividad enzimática (N=3), se expresaron como el valor de la media  $\pm$  desviación estándar. Todos los resultados fueron analizados por ANOVA de dos vías para identificar las diferencias entre los grupos en los tiempos estudiados. Cuando el ANOVA mostró diferencias significativas, se realizó la prueba de Bonferroni. Se utilizó el software GraphPad Prism versión 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Se consideró estadísticamente significativo aquellos resultados con valores de  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ .

# 6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

## 6.1 Sobreexpresión

La sobreexpresión de genes es una alternativa que se ha utilizado para analizar la expresión de un gen en un tipo de célula, etapa de desarrollo o condición en la que normalmente no se expresa (Prelich, 2012). Esta metodología se utiliza predominantemente en organismos unicelulares, condición que se ha aprovechado en varios protozoos, entre ellos *G. lamblia*. Sin embargo, existen otras condiciones en este parásito que han limitado una mejor comprensión de los procesos moleculares, bioquímicos y metabólicos, como su estado tetraploide y binucleado (Bernander *et al.*, 2001; Wierenga *et al.*, 2010).

Adicionalmente, no todos los plásmidos utilizados son funcionales, y existe un pequeño repertorio de marcadores de resistencia utilizados para la selección de las células transfectantes (Yu *et al.*, 1996; Davis-Hayman y Nash, 2002). A pesar de ello, se han diseñado algunos vectores con casetes específicos para ser utilizados en *Giardia* para el análisis de genes reporteros, con el propósito de caracterizar regiones promotoras (Singer *et al.*, 1998; Sun y Tai, 2000; Yee *et al.*, 2000), de entender el papel biológico de expresar proteínas recombinantes (Gourguechon y Cande, 2010; Jerlström-Hultqvist *et al.*, 2012) o de analizar proteínas de relevancia metabólica para proponerlas como nuevos blancos para el desarrollo de fármacos (Prelich, 2012; Miyamoto y Eckmann, 2015).

En vista de esto, se diseñó una construcción de expresión basada en plásmidos que acoplaran el gen *GITpi* al promotor constitutivo *Pa2-tub* (Elmendorf *et al.*, 2001). La enzima TPI cataliza la interconversión reversible de DHAP a GAP en la glucólisis, reacción que permite continuar el flujo de la vía de la glucólisis hacia la formación de piruvato acompañada de la generación de NADH y ATP, principal componente energético (Wierenga *et al.*, 2010). Aunque se sabe que la producción más alta de ATP (hasta ocho moléculas) se genera a partir de la vía de la arginina (Schofield *et al.*, 1992; Karnkowska *et al.*, 2016) y que tiene otras implicaciones metabólicas importantes en *G. lamblia* (Touz *et al.*, 2008), también es de nuestro interés analizar

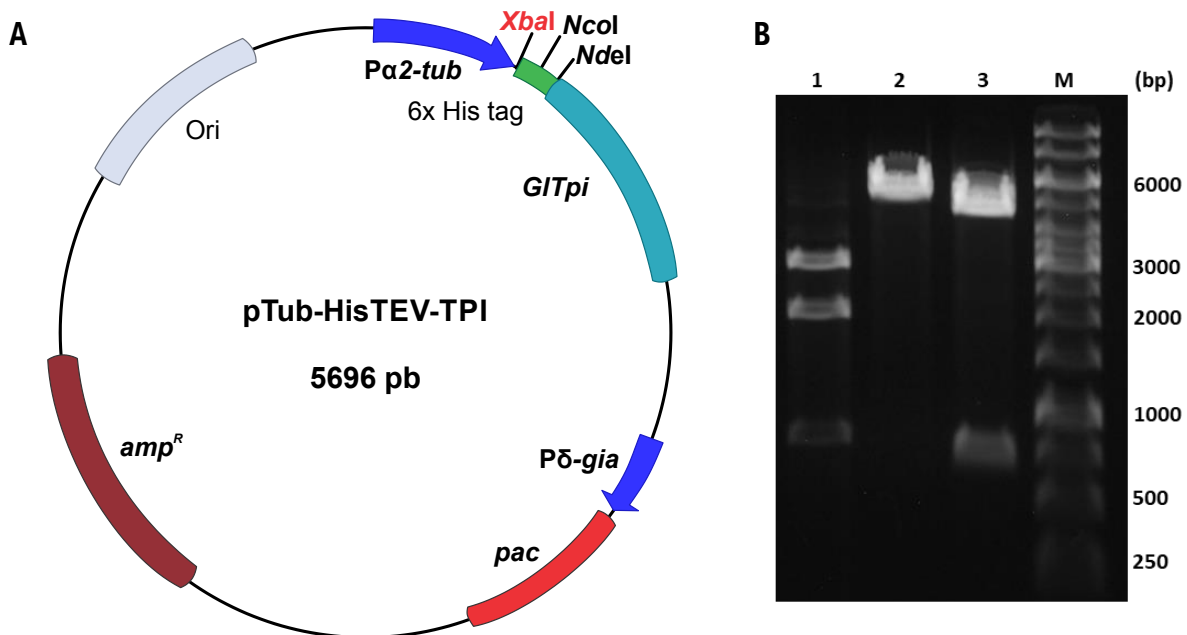
la expresión homóloga de la enzima TPI, para observar los efectos moleculares y metabólicos provocados por una mayor expresión de esta enzima en los trofozoítos de *G. lamblia*.

### 6.1.1 Análisis del vector pTub-HisTEV-Tpi para la sobreexpresión del gen *GITpi*

Para conocer el efecto de la sobreexpresión del gen *GITpi* en los trofozoítos de *G. lamblia*, se construyó un vector pTub-HisTEV-Tpi que contiene el marco de lectura abierto del gen *GITpi* unido a una secuencia de 6x His y una región TEV (sitio de corte de reconocimiento de la proteasa del virus del tabaco) regulada bajo el promotor  $P_{\alpha 2-tub}$ . Además, este plásmido contiene el gen *pac* regulado bajo el promotor  $P_{\gamma-Gia}$ , el cual será indispensable para la selección de los trofozoítos transfectados con puromicina (Figura 10A). Es importante mencionar que a pesar de que el plásmido no contiene un sitio de clonación múltiple se diseñó un sitio de clonación múltiple con el propósito de clonar diferentes genes de interés de *G. lamblia*, mediante la utilización de los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI* para la clonación, los cuales están localizados cerca de una región de nucleótidos que codifica para HisTEV (Figura 10A). Incluso si no se desea la región de HisTEV, los genes se pueden clonar con las enzimas *NcoI* y *BamHI*.

Para corroborar los sitios de restricción presentes en el plásmido se analizaron mediante restricción, la cual se realizó con tres muestras diferentes. La primera muestra corresponde al plásmido pTub-HisTEV-Tpi el cual fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *NdeI*. En la segunda muestra, el plásmido pTub-HisTEV-Tpi que contiene la mutagénesis dirigida para la eliminación de un sitio de restricción *NdeI* del gen *GITpi*, fue digerido únicamente con la enzima *NdeI*. Finalmente, la tercera muestra fue el plásmido pTub-HisTEV-Tpi con mutagénesis dirigida digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *NdeI*. Los productos de digestión de cada una de las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1%. (Figura 10B). En el primer carril de la figura 10B se muestra la digestión del plásmido con *BamHI* y *NdeI*, antes de la mutagénesis dirigida del gen *GITpi*, lo cual generó 3 bandas debido a la presencia de 2 sitios *NdeI*, una del vector y otra del gen *GITpi*. En el carril 2 se observa una banda de aproximadamente 5 696 pb que proviene de la digestión del vector conteniendo la mutagénesis dirigida del gen *GITpi* con *NdeI*, de esta manera se comprueba la eliminación de un sitio de restricción *NdeI* por mutagénesis dirigida. En el carril 3

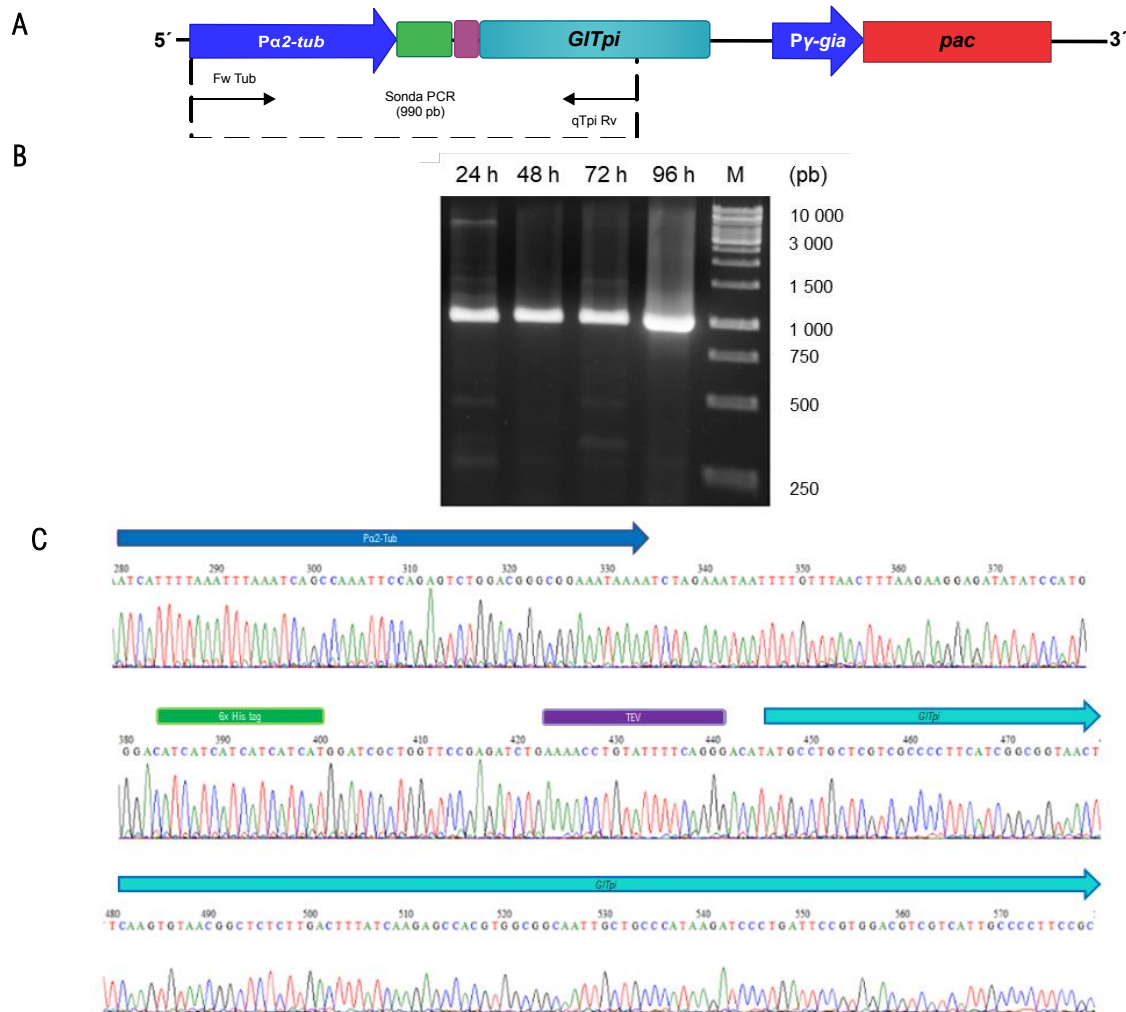
se observan dos bandas, una de aproximadamente 5 000 pb que corresponden al vector sin el gen *GITpi*. Esto corrobora la eliminación de *NdeI* digiriendo el vector con *Bam*HI y *NdeI* para mostrar la liberación del gen *GITpi* (774 pb). El plásmido pTub-HisTEV-Tpi con mutagénesis dirigida fue utilizado para electroporar los trofozoítos de *G. lamblia* y los trofozoítos transfectados se seleccionaron en presencia de puromicina. A los trofozoítos seleccionados se les nombró T1048.



**Figura 10.** Plásmido construido para la sobreexpresión de genes en *Giardia lamblia*. **A)** Plásmido pTub-HisTEV-Tpi, que contiene el gen *GITpi* regulado por *Pa2-tub*, con dos sitios de restricción en el extremo 5', *NcoI* y *NdeI*, para clonar genes. Además, de una etiqueta de 6 histidinas y un marcador de selección para puromicina (*pac*). **B)** Gel de agarosa al 1% para la verificación del vector construido por patrón de restricción con las enzimas *NdeI* y *Bam*HI. Carril 1: vector sin mutagénesis digerido con las enzimas *NdeI* y *Bam*HI; carril 2: vector con mutagénesis dirigida digerido con la enzima *NdeI*; Carril 3: vector con mutagénesis digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *Bam*HI; M: Marcador de peso molecular de DNA de 1kb GeneRuler (Thermo Scientific).

Después de la transfección del plásmido en los trofozoítos de *G. lamblia*, se realizó una prueba de PCR punto final para determinar la inserción del plásmido. Para ello se extrajo el DNA genómico de los trofozoítos T1048 cultivados a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 h), se determinó la presencia del plásmido mediante primers específicos del vector (Tub forward y qTpi reverse) ubicados en el promotor *Pa2-tub* y en la región del gen *GITpi* (Figura 11A). El resultado de la amplificación se analizó mediante un gel de agarosa al 1%, donde se reveló una banda de 990 pb

(Figura 11B), lo cual corresponde con el tamaño esperado de 990 pb que abarca el promotor, la región HisTEV y 628 pb del gen *GITpi*. Finalmente, otra forma de corroborar la presencia del plásmido en los trofozoítos de *G. lamblia*, fue mediante la obtención de su secuencia. Como se observa en la Figura 11C, la secuencia obtenida permitió corroborar e identificar cada una de las regiones del plásmido pTub-HisTEV-Tpi presente en las células transfectadas de trofozoítos de *G. lamblia* (Figura 11C).



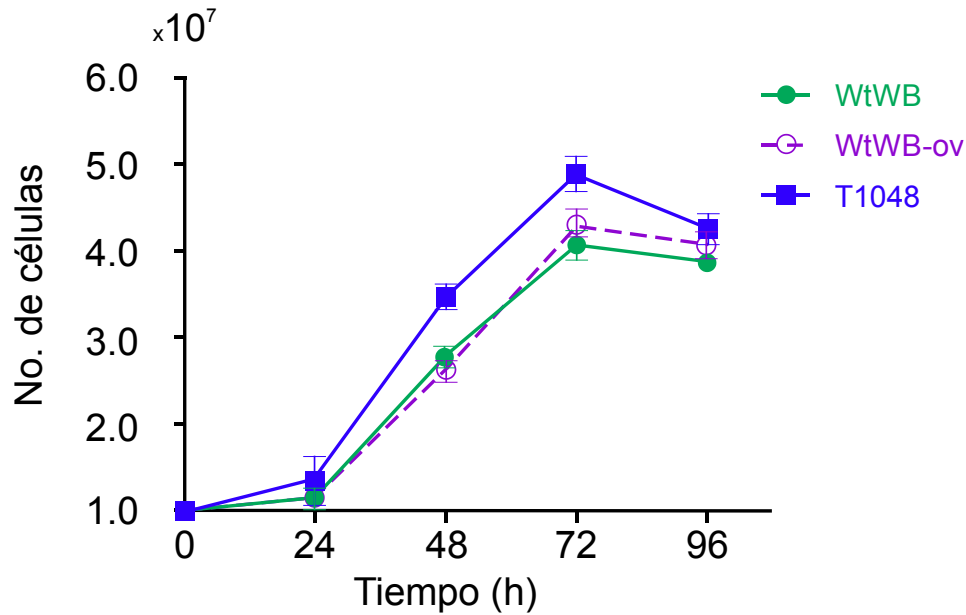
**Figura 11.** Valoración de transfección del plásmido en trofozoítos de *G. lamblia*. **A)** Mapa lineal del plásmido pTub-HisTEV-Tpi para determinar la presencia del plásmido con los primers específicos Fw-tub y qTpi Rv. **B)** Gel de agarosa al 1% para la amplificación de la región HisTEV y 628 pb del gen *GITpi* por PCR punto final a diferentes tiempos 24, 48, 72 y 96 h. M: Marcador de DNA GeneRuler de 1kb (Thermo Scientific). **C)** Electroferograma obtenido de la región amplificada.

### 6.1.2 Efecto de la sobreexpresión del gen *GITpi* en el crecimiento de los trofozoítos de *Giardia lamblia*

Para analizar el efecto de la sobreexpresión del gen *GITpi* sobre el crecimiento de *G. lamblia*, se realizaron cinéticas de crecimiento de las cepas WtWB, WtWB-ov (cepa control con el vector de sobreexpresión sin el gen *GITpi*) y T1048. Los trofozoítos transfectados con el plásmido pTub-HisTEV-Tpi se seleccionaron con medio TYI-S-33 suplementado con puromicina (100 µg/mL) y se sometieron a análisis.

La curva de crecimiento *in vitro* de los trofozoítos WtWB, WtWB-ov y T1048 muestra una fase de adaptación durante las primeras 24 h en donde no hay un aumento en el número de células. Después de este tiempo comienza la fase logarítmica donde el crecimiento del parásito tiene un pico máximo a las 72 h, mientras que las últimas 24 h corresponden a la fase estacionaria (Figura 12). Durante la fase logarítmica la cepa T1048 tiende a un mayor crecimiento celular que las cepas WtWB y WtWB-ov. La densidad celular promedio a las 48 h de la cepa T1048 fue de  $3.5 \times 10^7$  células, mientras que para las cepas WtWB y WtWB-ov fue de  $2.5 \times 10^7$  células, a las 72 h las células T1048 alcanzaron un crecimiento máximo de  $5.0 \times 10^7$  células, y las cepas WtWB y WtWB-ov de  $4.0 \times 10^7$  células (Figura 12). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión del gen *GITpi* tiene un efecto en las vías metabólicas como la glucólisis, favoreciendo la tasa de crecimiento del parásito, esto corresponde a lo reportado por Prelich, quienes observaron que la sobreexpresión del gen *GITpi* es un mecanismo de activación en el parásito (Prelich, 2012).

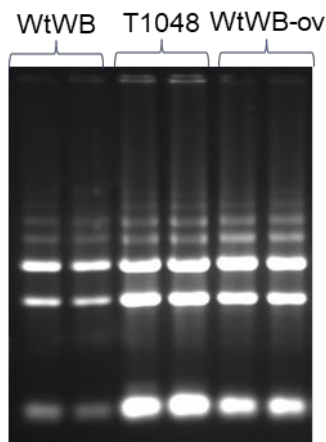




**Figura 12.** Efecto de la sobreexpresión del gen *GITpi* en el crecimiento celular. La cuantificación celular de las cepas WtWB, WtWB-ov y T1048, se determinó cada 24 h usando una Cámara de Neubauer. Las barras de error indica la media de 4 mediciones  $\pm$  desviación estándar.

### 6.1.3 Efecto de la sobreexpresión en los transcritos del gen *GITpi* y otros genes implicados en la vía de la glucólisis

Para poder medir el nivel de expresión del gen *GITpi*, se extrajo el RNA total de las células control WtWB, de la cepa transfectada T1048, y de la cepa control WtWB-ov. La concentración y pureza del RNA total se determinó con el equipo NanoDrop ND-1000, la concentración obtenida fue entre 1800 y 2000 ng/ $\mu$ L, con valores promedio de 260/280 de 2.01 y 260/230 de 2.09. Las relaciones 260/280 y 260/230 fueron cercanas a 2, lo que indica que el RNA total obtenido se encontraba puro. La figura 13 muestra el RNA total analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Los primeros dos carriles corresponden a la cepa WtWB, los siguientes dos carriles a la cepa T1048 y los últimos dos carriles corresponden a la cepa WtWB-ov. En todas las muestras analizadas se resaltan las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28s y 18s, lo que indica que el RNA total extraído en cada una de las cepas fue íntegro y no presentó un patrón de degradación.

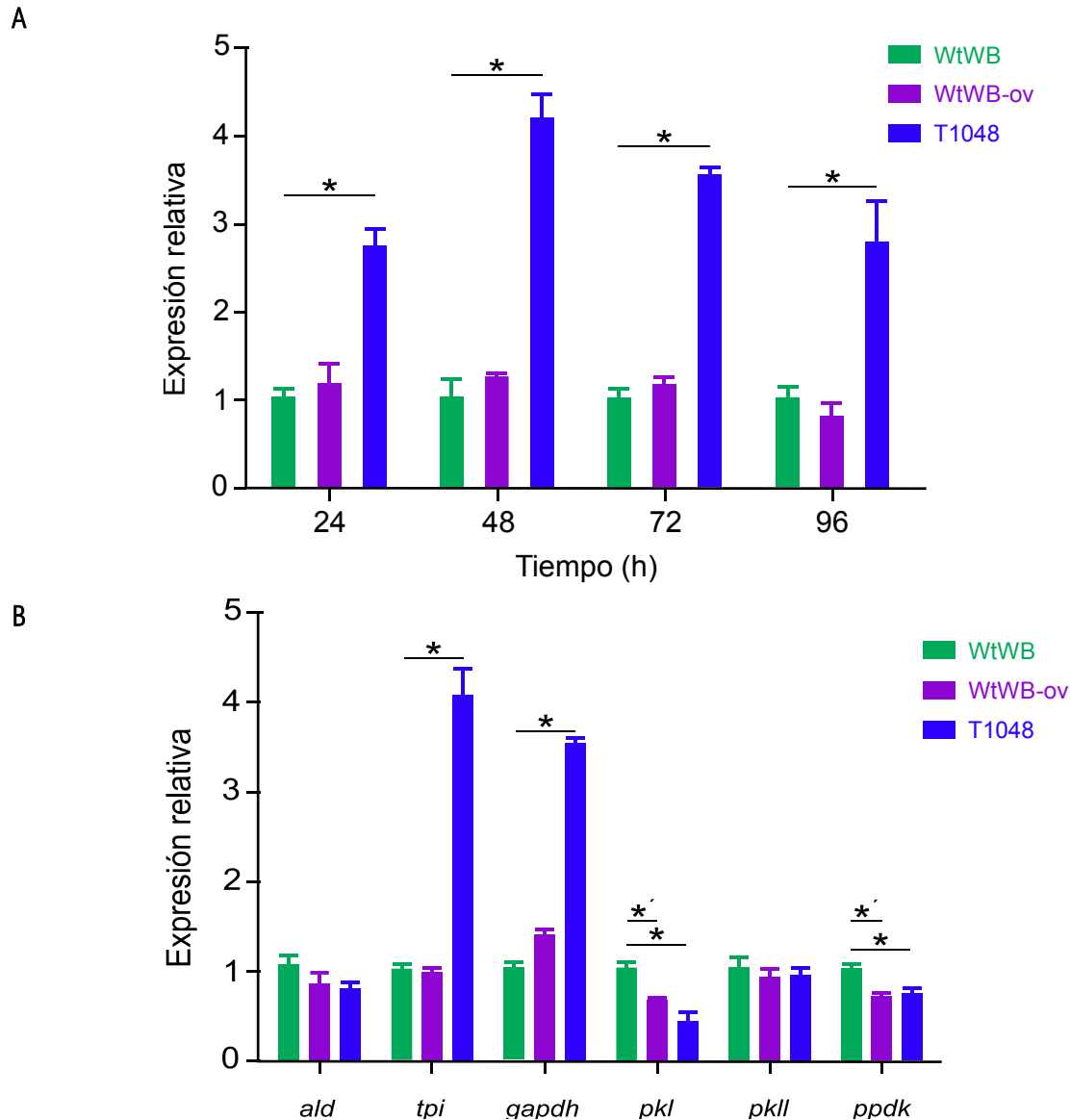


**Figura 13.** Integridad del RNA extraído mediante la técnica Trizol. Carril 1 y 2: RNA total de cepa WtWB. Carril 3 y 4: RNA total de la cepa T1048; los carriles 5 y 6: RNA total de la cepa WtWB-ov. Se muestra la integridad de las subunidades 28 y 18 s del RNA en gel de agarosa al 0.8% teñido con Gel-Red.

Posteriormente, para saber si hay un cambio en la expresión del gen *GITpi*. Se cuantificaron los niveles de expresión del gen *GITpi* en las cepas WtWB, WtWB-ov y T1048, se usó el gen de *act* como gen de referencia para la cuantificación de la expresión del gen *GITpi*. Los niveles de RNAm se cuantificaron mediante RT-qPCR, a partir de las muestras de RNA total previamente obtenidas a diferentes tiempos de cultivo 24, 48, 72 y 96 h.

Al cuantificar los transcritos del gen *GITpi* (Figura 14A) se observó que los niveles de expresión de las cepas control WtWB y WtWB-ov no se vieron alterados en el transcurso del tiempo, a su vez entre estas dos cepas no hubo diferencia significativa para los diferentes tiempos de cultivo ( $p > 0.05$ ). Esto indica que el vector sin el gen *GITpi* en la cepa WtWB-ov no tiene efecto sobre los niveles de expresión del gen en los trofozoítos de *G. lamblia*. La expresión relativa de la cepa T1048 fue de 2.7, 4.2, 3.4 y 2.5 a las 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente. Al hacer una comparación en los niveles de expresión entre la cepa T1048 y las cepas WtWB y WtWB-ov, se observó que la expresión relativa de la cepa transfectada (T1048) fue de 1.8, 3.1, 2.4, y 1.5 veces mayor que las cepas control a las 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente. El incremento en los niveles de expresión del gen *GITpi* en la cepa T1048 respecto a las cepas control WtWB y WtWB-ov en los diferentes tiempos de cultivo fue significativo ( $p < 0.05$ ).

Los datos anteriores indican que los niveles de expresión de la cepa T1048 están relacionados con el crecimiento del parásito. En la curva de crecimiento mostrada en la figura 12, se observó que la fase de adaptación del parásito termina a las 24 h y comienza la fase logarítmica, al medir los niveles de expresión en este tiempo de la cepa T1048 se observó un aumento significativo en la expresión de *GITpi* respecto a las cepas control. Durante la fase logarítmica se alcanza el mayor nivel de expresión con un valor de 4.2 a las 48 h, el punto máximo de la fase logarítmica se alcanzó a las 72 h de cultivo donde los niveles de expresión comienzan a disminuir a 3.4. Finalmente, durante la fase estacionaria (96 h) la expresión relativa de 2.5 se aproxima a la expresión relativa inicial de 2.7 de la fase logarítmica (24 h).



**Figura 14.** Cuantificación de la expresión génica de *GltIpi* y de los genes implicados en la vía de la glucólisis mediante RT-qPCR. **A)** Determinación de la expresión del gen *GltIpi* cada 24 h. **B)** Análisis de expresión de diferentes RNAm de los genes: *aldolasa (ald)*, *tpi*, *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gapdh)*, *Piruvato quinasa* isoforma I y II (*pkl* y *pkII*) y *piruvato fosfato dicinasa dependiente de pirofosfato (ppdk)* involucrados en la glucólisis. Los niveles de expresión se cuantificaron a partir de cinco repeticiones, a partir de las cuales se obtuvieron los valores de desviación estándar, se usó el gen *actina (act)* como gen de referencia. El \* indica una diferencia significativa en la expresión relativa entre las cepas WtWB y WtWB-ov con la cepa T1048 ( $p < 0.05$ ); el \*' indica una diferencia significativa en la expresión relativa entre la cepa WtWB y la cepa WtWB-ov ( $p < 0.05$ ).

Tomando como referencia los análisis transcriptómicos llevados a cabo en *G. lamblia* a partir de cultivos axénicos, en los que se desregula (hacia arriba y hacia abajo) la expresión de los genes

implicados en el metabolismo del parásito, se cuantificó la expresión de los genes *ald*, *gapdh*, *pk1* y *pk11* implicados en la vía de la glucólisis. Además, se determinó el nivel de expresión del gen *ppdk* que participa en la formación de ATP para *G. lamblia* (Figura 14B). Se utilizó el gen *act* como referencia.

El cambio en la expresión de los genes involucrados en la vía de la glucólisis se midió a las 48 h en las diferentes cepas WtWB, WtWB-ov y T1048 (Figura 14B). Para el gen *ald* los niveles de expresión no cambiaron significativamente entre las cepas ( $p > 0.05$ ), aunque la cepa T1048 tiende a disminuir. La expresión relativa del gen *tpi* no cambió significativamente para las cepas control, mientras que la cepa T1048 mostró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de 4.2 en los niveles de expresión, esto se relaciona con los resultados obtenidos en la figura 14A a las 48 h de cultivo. La expresión relativa del gen subsecuente de *tpi* en la glucólisis: *gapdh*, aumentó significativamente 2.5 veces en la cepa T1048 respecto a las cepas control. Los niveles de expresión de los genes que codifican para la enzima piruvato cinasa: *pk1* y *ppdk* disminuyeron significativamente para la cepa T1048 y WtWB-ov respecto a la cepa WtWB, mientras que la expresión relativa del gen *pk11* no se vio afectada en las diferentes cepas.

Al comparar estos datos con los resultados obtenidos en el transcriptoma de *G. lamblia* el gen *GITpi* fue uno de los cinco genes con mayor expresión durante las fases de crecimiento logarítmico, estacionario y decreciente (Ansell et al., 2015). Por otra parte, estos resultados proponen que la sobreexpresión del gen *GITpi* no solo aumenta la transcripción del gen *GITpi*, sino también interfiere en la expresión de otros genes involucrados en la glucólisis, principalmente el aumento en la expresión del gen *gapd*. Las proteínas codificadas por estos genes podrían modificar el metabolismo del parásito, favoreciendo su crecimiento como lo observado en la curva de crecimiento.

#### 6.1.4 Efecto de la sobreexpresión del gen *GITpi* en la inmunolocalización de la enzima TPI en *Giardia lamblia*

Para determinar la localización de la proteína TPI en los trofozoítos de *G. lamblia*, se realizó un ensayo de inmunolocalización por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Con el uso de esta técnica se logró detectar la distribución citoplasmática de la proteína TPI en la cepa control WtWB

y en la cepa T1048 en presencia del anticuerpo policlonal anti-TPI en los diferentes tiempos de cultivo (24, 48, 72 y 96 h) (Figura 15A, fila 1 y 2). Para distinguir la proteína endógena y la proteína recombinante (sobreexpresada) en los trofozoítos transfectados T1048, se utilizó el anticuerpo anti-His (Figura 15A, fila 3). Para identificar las características morfológicas de *G. lamblia* en los diferentes tiempos de cultivo se realizó la técnica de contraste de fases DIC (Figura 15A, fila 4).

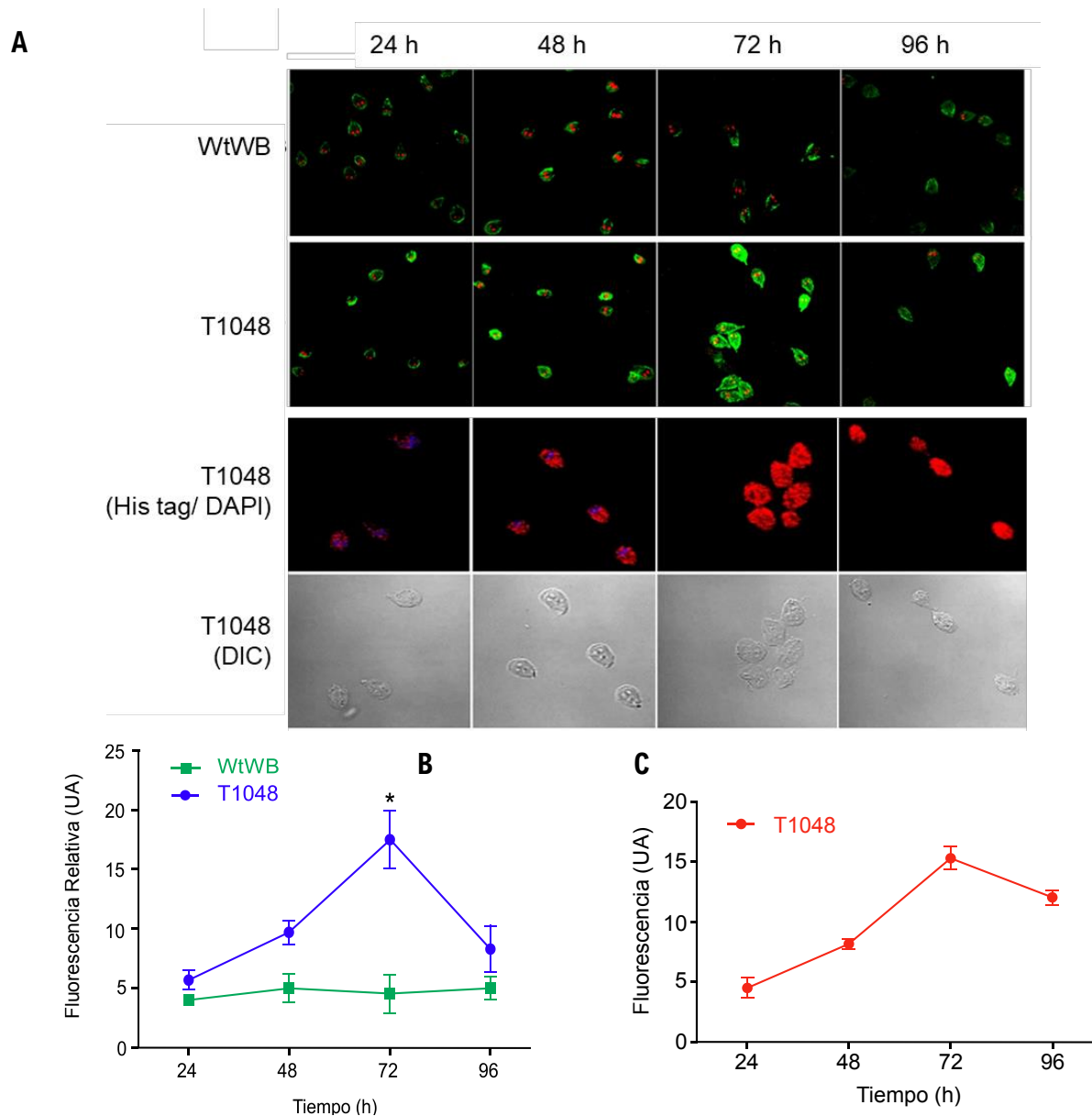
Al comparar la fluorescencia emitida por la proteína TPI en las cepas WtWB y T1048 en función del tiempo (figura 15A, fila 1 y 2), se observó que a las 24 h de cultivo la fluorescencia de la proteína TPI no cambió por la sobreexpresión del gen *GITpi* en la cepa T1048. La fluorescencia de la proteína TPI a las 48 h tiende a aumentar en la cepa T1048, mientras que a las 72 h la fluorescencia de la enzima TPI transcrita aumenta significativamente, siendo 4.5 veces mayor en las células T1048 respecto a la cepa WtWB ( $p < 0.01$ ). Finalmente, a las 96 h la fluorescencia de la enzima TPI disminuye drásticamente en la cepa T1048 alcanzando valores cercanos a la cepa WtWB (Figura 15B).

El vector pTub-HisTEV-Tpi construido para la sobreexpresión del gen *GITpi* contiene la secuencia de etiqueta 6x His unida al extremo N de la proteína TPI (Figura 10A). Esta característica se aprovechó para localizar y verificar específicamente la proteína TPI codificada por el vector de sobreexpresión pTub-HisTEV-Tpi y diferenciarla de la proteína endógena de *G. lamblia*. Por lo que se realizó una segunda prueba de inmunolocalización con la cepa T1048 a las 24, 48, 72 y 96 h usando el colorante DAPI para la distinción de núcleos y el anticuerpo monoclonal anti-His (Figura 15C).

Los resultados mostraron que los trofozoítos transfectados con el vector de sobreexpresión pTub-HisTEV-Tpi, además de sobreexpresar el gen *GITpi*, tienen una alta eficiencia de traducción para formar la proteína TPI (Figura 15A, fila 3). La cepa WtWB se cultivó y procesó en las mismas condiciones que la cepa T1048 sin mostrar señal de fluorescencia debido a la ausencia del vector pTub-HisTEV-Tpi en los trofozoítos, resultados no mostrados. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia relativa por las proteínas marcadas en los trofozoítos transfectados mostró un aumento gradual en la intensidad obtenida por la localización de la región de la etiqueta 6x His en función del tiempo, el pico máximo de fluorescencia se obtuvo a las 72 h (Figura 15 C). Este resultado fue similar a lo mencionado anteriormente con el anticuerpo anti-TPI, donde también se

observó una mayor intensidad de fluorescencia a las 72 h en la cepa T1048 (Figura 15B); esto ratifica que el aumento en la intensidad en la fluorescencia observado en la figura 15B se debe a la proteína codificada por el vector, después de este tiempo la fluorescencia decae a las 96 h (Figura 15 C).

El comportamiento de la emisión de fluorescencia de la proteína TPI codificada por el vector de sobreexpresión fue similar al comportamiento de las cinéticas de crecimiento (Figura 12) durante la fase logarítmica, donde la mayor emisión de fluorescencia se obtuvo en el pico máximo de crecimiento para la cepa T1048 (72 h). Sin embargo, no se observó el mismo comportamiento para la proteína endógena de la cepa WtWB. Estos resultados confirman la alta eficiencia de la transfección, así como la función del vector construido en este trabajo, el cual no afectó la viabilidad de los trofozoítos de *G. lamblia* (Figura 12). Además, en la morfología observada con microscopía DIC se observó la forma de “cometa” característica de los trofozoítos de *G. lamblia* (Figura 15A, fila 4), en la microscopía óptica de contraste de fases se observó el clásico movimiento flagelar y en forma de espiral de los trofozoítos.



**Figura 15.** Detección de la proteína TPI por microscopía confocal en diferentes tiempos de crecimiento. **A)** Identificación de la proteína TPI utilizando anticuerpo policlonal anti-TPI (verde) en la cepa WtWB y T1048 (fila 1 y 2), los núcleos de los trofozoítos están marcados con yoduro de propidio (color rojo). La inmunolocalización de la etiqueta 6x His ubicada en el extremo N-terminal de la proteína TPI sobreexpresada en la cepa T1048 marcada con rojo, el núcleo de los trofozoítos fue teñido con DAPI (fila 3). La morfología de la cepa T1048 se observó con microscopía de interferencia diferencial (DIC) (fila 4). **B)** Cuantificación de TPI mediante fluorescencia relativa. **C)** Fluorescencia emitida por la región de la etiqueta 6x His. Se observaron trofozoítos a 60X. Las barras de error indican la media de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar. El \* indica una diferencia significativa en la emisión de fluorescencia a las 72 h entre la cepa T1048 con la cepa WtWB ( $p < 0.01$ ).



### 6.1.5 Efecto de la sobreexpresión del gen *GITpi* en el metabolismo de la glucosa en *Giardia lamblia*

Después de observar que la fase logarítmica en la curva de crecimiento de *G. lamblia* comienza a las 24 h de cultivo y que a las 48 h la cepa T1048 tiende a un mayor crecimiento que la cepa WtWB, se consideraron estos dos tiempos de cultivo para medir el efecto de la sobreexpresión en los niveles de expresión del gen *GITpi*. Además, la expresión relativa del gen *GITpi* en la cepa T1048 aumenta a las 24 h y alcanza su máximo nivel de expresión a las 48 h (Figura 14A). Para relacionar la tendencia de crecimiento celular de la cepa T1048 y los cambios en el metabolismo del parásito, se consideró de interés analizar la concentración de glucosa, piruvato y etanol, en las cepas WtWB y T1048 durante la fase logarítmica a las 48 h, cuando también se observó la mayor expresión del gen *GITpi*.

Se confirmaron los niveles de expresión de la cepa T1048 de la figura 14A a las 24 y 48 h, donde la expresión relativa fue mayor que en las cepas control al medir la expresión del gen *GITpi* entre las cepas WtWB y T1048 (Figura 16A). Los resultados obtenidos por RT-qPCR, indicaron que en la cepa T1048 se encontraron 3.4 y 2.3 veces más transcripción en relación con WtWB a las 24 y 48 h, respectivamente, de acuerdo con el análisis densitométrico realizado en el programa ImageJ (Figura 16A).

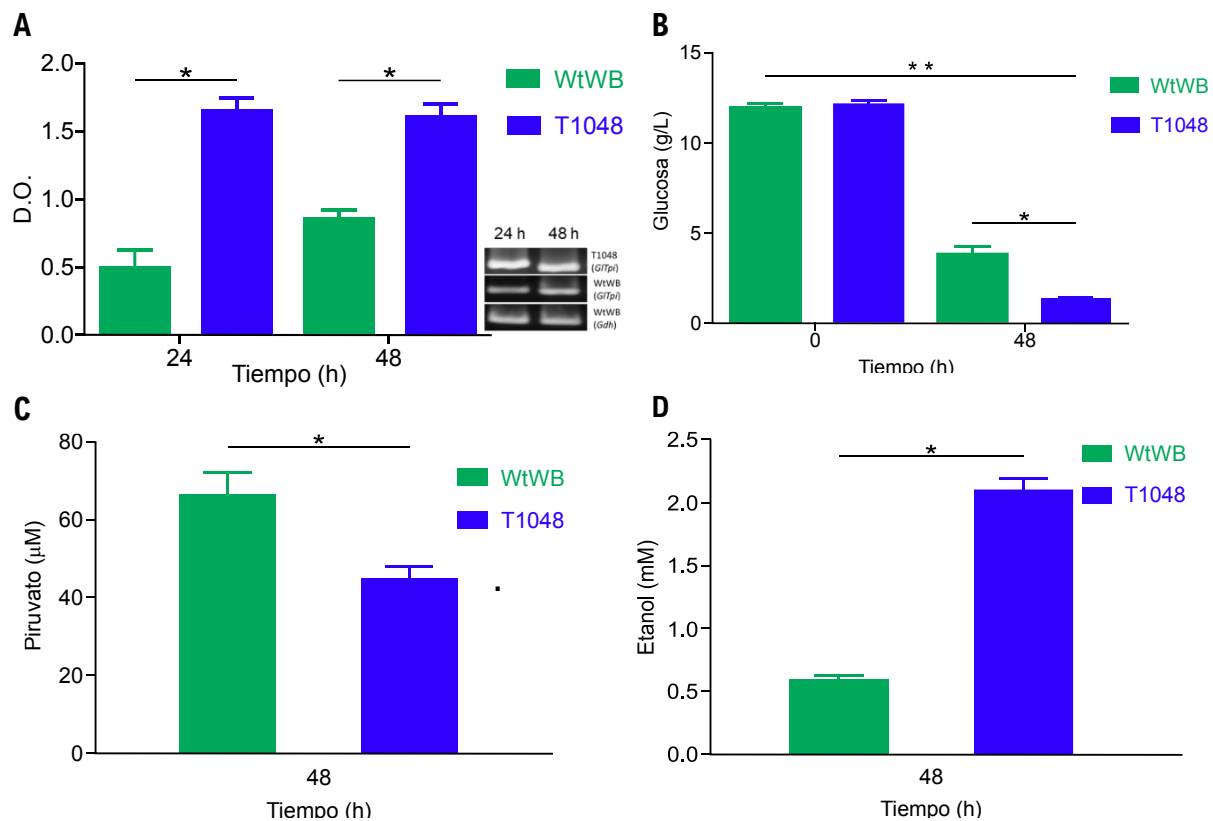
Debido a que la enzima TPI participa en la glucólisis, principal vía metabólica de *G. lamblia* en la oxidación de la glucosa para obtener energía, se realizó la cuantificación del consumo de glucosa en los trofozoítos WtWB y los trofozoítos transfectados para determinar posibles cambios en el metabolismo del parásito debido a la sobreexpresión del gen *GITpi*. En la figura 16B se muestran los resultados del consumo de glucosa en función del tiempo (0 y 48 h), donde la cepa WtWB consumió el 65% de glucosa a las 48 h, mientras que la cepa T1048 consumió el 85% en el mismo tiempo. Se encontró que la diferencia del consumo de glucosa entre estas cepas en el mismo tiempo fue significativa con una  $p < 0.05$ , y que el consumo de glucosa de la cepa WtWB a las 0 h y a las 48 h de la cepa T1048 fue mayor con respecto al de la cepa WtWB. Con estos resultados se confirmó que la sobreexpresión del gen *GITpi* aumenta el metabolismo de la glucosa y esto se ve reflejado en el crecimiento del parásito durante la fase logarítmica.

Unos de los productos esenciales en el metabolismo del parásito, es el piruvato, debido a que es uno de los principales precursores de los productos de fermentación de *G. lamblia* (Han y Collins, 2012). El piruvato puede oxidarse a través de otras vías, convertirse en carbohidratos por gluconeogénesis, o puede producir compuestos como alanina, etanol y/o acetato, que son metabolitos de alta producción en *G. lamblia*, aunque su síntesis depende de la disponibilidad de oxígeno u otros factores del cultivo (Luján y Svärd, 2011). Recientemente, se informó que la cantidad de piruvato dentro de los trofozoítos puede modificarse cuando las células se someten a condiciones de estrés (Raj *et al.*, 2018). Por ejemplo, la privación de cisteína-ascorbato en el medio aumenta la concentración de piruvato intracelular, pero sin efectos sobre la producción de uno de sus productos de fermentación (acetato). Al cuantificar la expresión de al menos seis genes implicados directamente en el metabolismo del piruvato, se observó desregulación de estos, los genes que codifican las proteínas malato deshidrogenasa, arginina desaminasa, piruvato diquinasa y acetil CoA sintasa son sobreexpresados, mientras que los genes de *piruvato-ferredoxina oxidorreductasa* y *piruvato quinasa* son subexpresados (Raj *et al.*, 2018).

Al comparar la concentración de piruvato producido entre los trofozoítos de WtWB y de T1048 a las 48 h, se detectó una concentración de piruvato significativamente mayor en la cepa WtWB que en la cepa T1048 ( $p < 0.05$ ) (Figura 16C). Esta disminución en la concentración de piruvato en la cepa T1048 podría deberse a una mayor actividad metabólica de las enzimas PK y PPDK provocada por la sobreexpresión de los genes *tpi* y *gapdh*, así como la disminución en los niveles de expresión del gen *pk1* y el gen *ppdk*, acompañado de un posible contenido proteico de PK y PPDK mayor que interviene en la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato y la rápida generación de etanol.

Para corroborar la disminución en la concentración de piruvato en los trofozoítos transfectados con respecto a los trofozoítos control (WtWB), se midió la producción de etanol, encontrándose que la cepa T1048 produjo 3.6 veces más concentración de este metabolito en comparación con la cepa WtWB ( $p < 0.05$ ) (Figura 16D). De esta manera se confirmó que el piruvato se dirige hacia la formación rápida de etanol, esto es de esperarse debido al incremento del metabolismo fermentativo presentado por *Giardia* (Sánchez, 1998; Luján y Svärd, 2011).

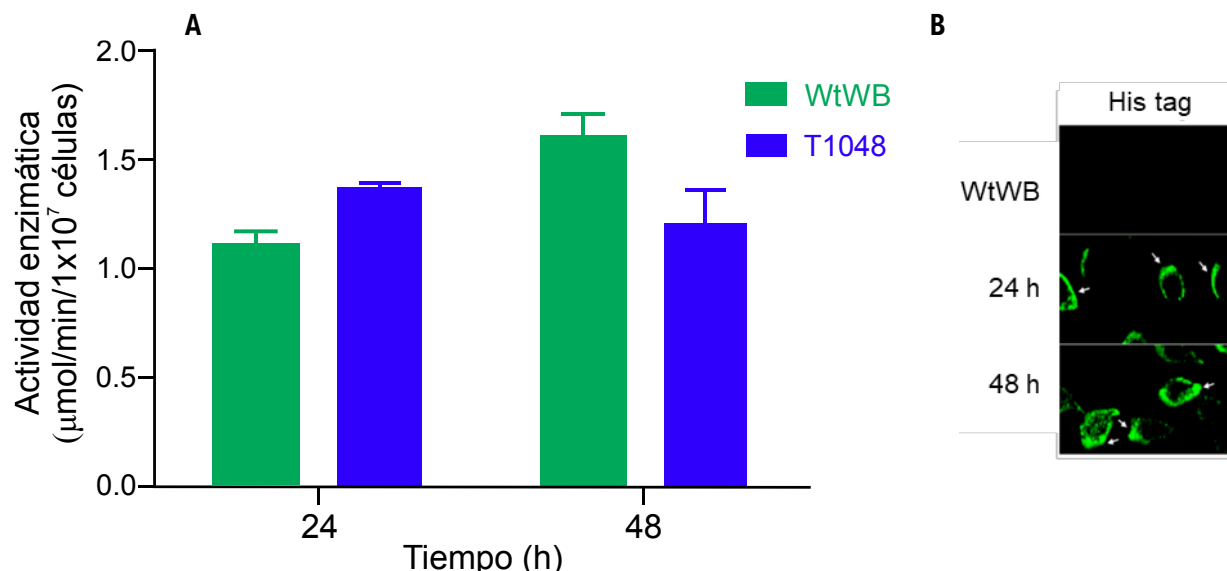
De acuerdo con los datos obtenidos, la sobreexpresión del gen *GITpi* provocó una alteración en los niveles de expresión de algunos genes de la glucólisis, principalmente del gen *gadph*. Además de un aumento en la estimulación del metabolismo de la glucosa favoreciendo la fermentación alcohólica. Estas modificaciones moleculares y bioquímicas proponen que la enzima TPI es relevante para el crecimiento del parásito durante la fase logarítmica.



**Figura 16.** Efectos producidos en el metabolismo de *G. lamblia* por la sobreexpresión del gen *GITpi*. **A)** La gráfica representa el análisis densitométrico de las bandas obtenidas en el gel de agarosa al 2%, donde se compara la expresión del gen *GITpi* por RT-PCR entre la cepa WtWB y la cepa T1048 a las 24 y a las 48 h. El gen del *glutamato deshidrogenasa (gdh)* se utilizó como control endógeno. **B)** Evaluación del consumo de glucosa mediante la cuantificación de azúcares reductores a las 0 y a las 48 h de cultivo. **C)** Análisis de la producción de metabolitos, como piruvato y **D)** etanol entre las cepas WtWB y T1048. Todos los valores de las desviaciones estándar fueron de tres experimentos independientes por duplicado. El \* indica una diferencia significativa entre las cepas WtWB y T1048 en el mismo tiempo ( $p < 0.05$ ); el \*\* indica una diferencia significativa en el consumo de glucosa entre la cepa WtWB en el tiempo cero y la cepa T1048 a las 48 h ( $p < 0.01$ ).

Por otra parte, la sobreexpresión del gen *GItpi* aumentó la presencia de la enzima TPI en la cepa T1048 (Figura 15B), de esta manera se determinó la actividad enzimática de la proteína TPI con el propósito de conocer si la concentración de proteína es directamente proporcional a la actividad metabólica de esta enzima (Figura 17A).

La actividad enzimática de la TPI para la cepa WtWB parece tener una tendencia a aumentar en el transcurso del tiempo. Sin embargo, la cepa T1048 mantuvo una actividad metabólica constante (Figura 17A). A las 24 h de cultivo, los trofozoítos inician la fase logarítmica según las cinéticas de crecimiento (Figura 12), durante esta fase el metabolismo se activa en los trofozoítos teniendo como consecuencia un aumento en actividad enzimática, el cual sólo se observó en la cepa WtWB. La invariabilidad en la actividad enzimática de la cepa T1048 sugiere que la proteína estudiada a las 48 h de cultivo se acumula en la periferia de los trofozoítos (Figura 17B), como ocurre en la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* cuando se forman cuerpos de inclusión (Ostoa-Saloma *et al.*, 1997; Wickner *et al.*, 1999; Baneyx y Mujacic, 2004; Arié *et al.*, 2006; Argüello-García *et al.*, 2009). Algunos autores han mostrado otras funciones de esta enzima distintas a las que se realizan en la glucólisis; esta enzima se ha encontrado acumulada en la periferia celular y se ha demostrado que desempeña un papel en la interacción patógeno-hospedero, un efecto que también podría afectar a su actividad enzimática (Pereira *et al.*, 2007; Ramiah *et al.*, 2008). Mientras que en 2016 Miranda-Ozuna y colaboradores trabajaron con TPI de *Trichomonas vaginalis* (TvTpi) e informaron que el TvTpi también se localiza en la periferia citoplasmática del parásito. Estos autores analizaron los dos Tpi (TvTpi1 y TvTpi2) presentes en este protozoo para encontrar nuevas funciones de estas proteínas en el parásito, aunque serían necesarios más estudios para demostrar estas posibles funciones del Tpi en *G. lamblia* (Miranda-Ozuna *et al.*, 2016).



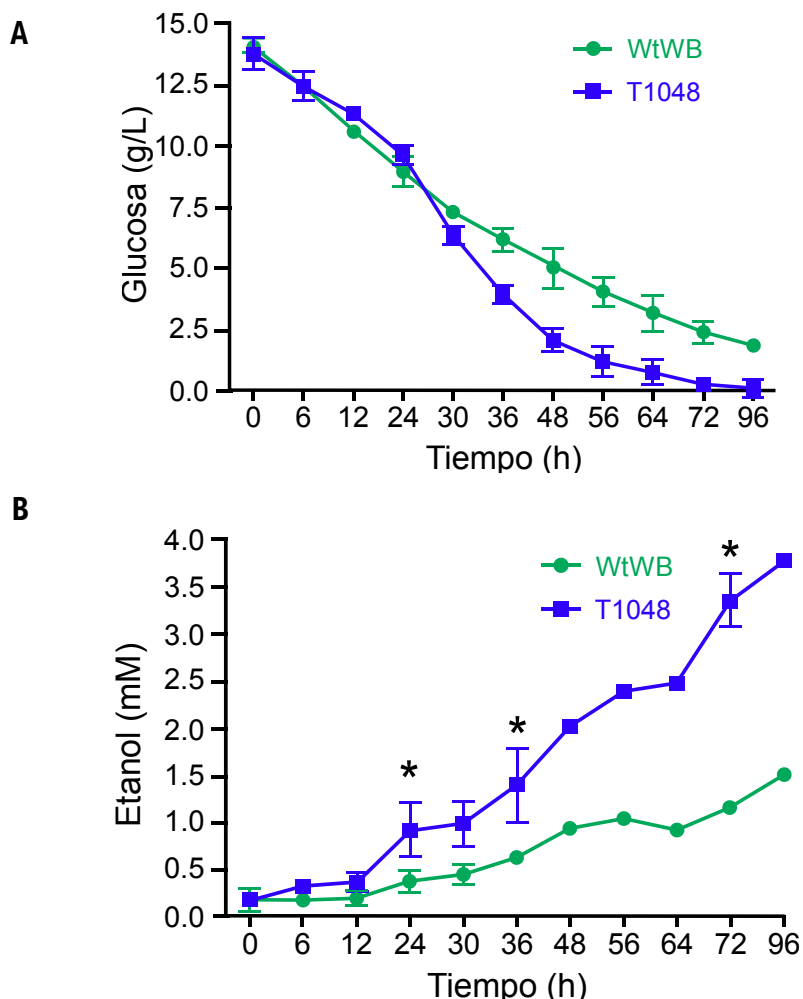
**Figura 17.** Efecto de la sobreexpresión del gen *GtTpi* sobre la actividad enzimática de TPI. **A)** Cuantificación de la actividad de la enzima TPI a las 24 y 48 h entre la cepa WtWB y la T1048. **B)** Localización de la enzima TPI en trofozoítos transformados mediante el ensayo de inmunolocalización usando el anticuerpo anti-His, a un aumento de 100X con microscopía confocal. Las barras de error indican el promedio de 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

### 6.1.6 Efecto de la sobreexpresión del gen *GtTpi* en el consumo de glucosa y producción de etanol

Ansell y colaboradores (2015), reportaron que los cambios en la expresión génica se deben principalmente a la disminución de la disponibilidad de O<sub>2</sub> (a pesar de que aún exista glucosa en el medio), condición que limita la eficiencia de la glucólisis y podría ser la causa de activación de otras vías metabólicas por parte de este microorganismo, como la vía de la arginina para la producción de energía (Brown *et al.*, 1998; Bernander *et al.*, 2001). En este sentido, se cuantificó la concentración de la glucosa y la producción de etanol en función del tiempo para la cepa control y la cepa transfectada (Figura 18). La tasa de consumo de glucosa fue similar para ambas cepas durante las primeras 24 h (fase de estabilización de los trofozoítos en la cinética de crecimiento). Sin embargo, a partir de las 24 h se observó una tendencia a consumir una mayor concentración de glucosa en la cepa T1048 con respecto a la cepa WtWB; así mismo, la cepa transfectada después de las 72 h agotó la fuente de glucosa del medio de cultivo (Figura 18A). Este factor se relaciona con el punto máximo de crecimiento durante la fase logarítmica (72 h) y el inicio de la fase

estacionaria (Figura 12). Además, al comparar la figura 16B con la figura 18A la concentración de glucosa a las 48 h fue de ~5 g/L y menor a 2.5 g/L para las cepas WtWB y T1048, respectivamente.

Se cuantificó la concentración de etanol en función del tiempo debido al aumento en la concentración de este metabolito a las 48 h (Figura 16D), explicando así la importancia de este producto en el metabolismo fermentativo de *G. lamblia*. Al cuantificar la tasa de producción de etanol, se encontró que la cepa T1048 produce una mayor concentración a partir de las 24 de crecimiento con respecto a la cepa WtWB (Figura 18B). Esto se relaciona con los resultados obtenidos para el consumo de glucosa, puesto que la generación de etanol es inversamente proporcional al consumo de glucosa en el medio, llegando a ser 2.5 veces mayor la producción de etanol en la cepa transfectada T1048 en comparación con la cepa control WtWB al final del cultivo (96 h).

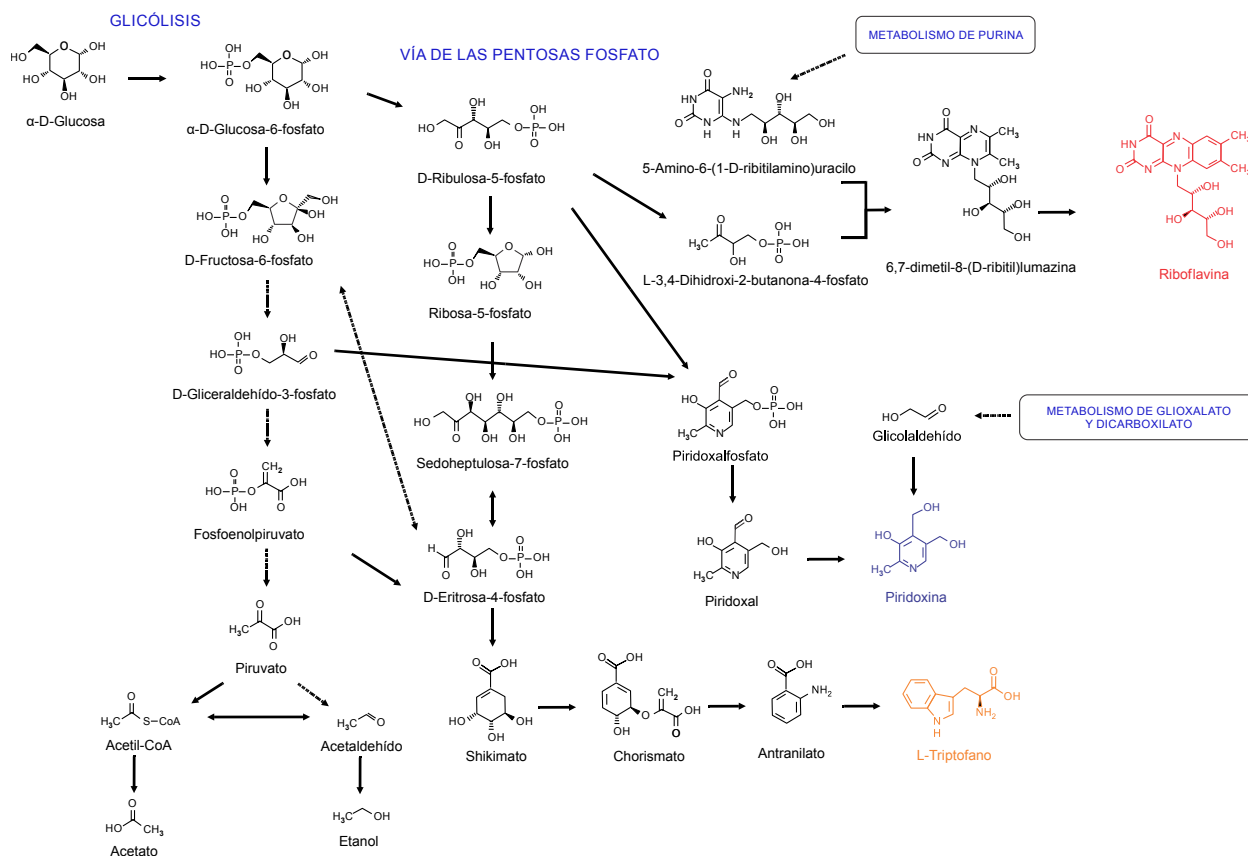


**Figura 18.** Análisis del consumo de glucosa y producción de etanol a diferentes horas de cultivo. **A)** Cuantificación del consumo de glucosa en función del tiempo de la cepa WtWB y la T1048, determinado por azúcares reductores. **B)** Producción de etanol por las cepas WtWB y T1048 en función del tiempo. Las barras de error indican la media de 3 repeticiones  $\pm$  la desviación estándar. El \* indica diferencia significativa en la producción de etanol respecto al tiempo entre la cepa WtWB y la T1048 ( $p < 0.05$ ).

### 6.1.7 Efecto de la sobreexpresión del gen *GITpi* en metabolitos secundarios de *Giardia lamblia*

Otras moléculas intracelulares implicadas en el metabolismo o las funciones estructurales para el funcionamiento celular adecuado son las vitaminas, coenzimas y/o metabolitos secundarios, como alcaloides, glucósidos, terpenoides y compuestos fenólicos (Figura 19) (Monici, 2005; Talamond *et al.*, 2015). Varias de estas moléculas tienen la propiedad de emitir fluorescencia de forma natural,

esta característica se ha utilizado como método analítico para determinar ausencia o presencia en las células, lo que aporta información sobre el estado fisiológico de las células, basado en las propiedades fisicoquímicas y las diferentes concentraciones de fluoróforos endógenos (Monici, 2005; Talamond *et al.*, 2015). Debido a que la cantidad de estos fluoróforos puede variar entre las células o ser modificada por algunas condiciones experimentales, se usó esta propiedad para comparar la fluorescencia entre la cepa WtWB y las células transfectadas T1048.



**Figura 19.** Biosíntesis de metabolitos de la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato de *G. lamblia*. La biosíntesis de la riboflavina (rojo), piridoxina (azul) y L-triptófano (naranja), inicia con el metabolismo de la glucosa. Las rutas se tomaron de la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG) (Kanehisa y Goto, 2010).

Los fluoróforos analizados en este trabajo fueron triptófano, piridoxina y riboflavina, ya que se encuentran entre las moléculas más estudiadas y se han estandarizado las condiciones para determinar su fluorescencia (Bernander *et al.*, 2001; Maslanka *et al.*, 2018). El interés de analizar estas moléculas se debe a que su formación se deriva de productos generados durante el



procesamiento de la glucosa (Figura 19), lo que puede servir como indicador de cambio metabólico entre la cepa WtWB y la cepa T1048. (Bernander *et al.*, 2001).

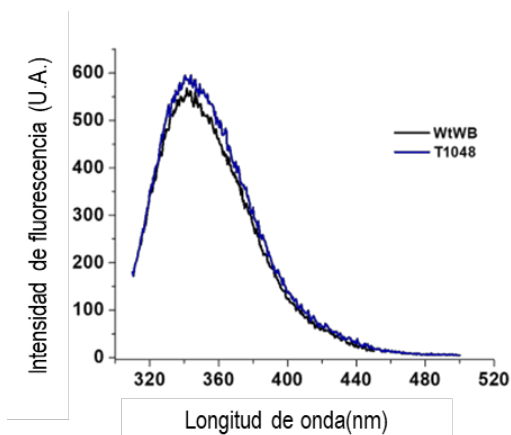
En la figura 20 se muestra el contenido de triptófano, piridoxina y riboflavina. Se observó una ligera diferencia en el contenido de triptófano entre estas cepas según la fluorescencia detectada, la máxima longitud de onda de emisión para esta molécula fue a 344 nm (Figura 20A). Sin embargo, la mayor diferencia en la intensidad de fluorescencia entre la cepa WtWB y T1048 se encontró cuando se analizó la piridoxina con la fluorescencia máxima registrada para esta molécula a 401 nm, a esta longitud de onda se determinaron 240 UA de fluorescencia para la cepa T1048, mientras que para la cepa WtWB se registraron 220 UA de fluorescencia (Figura 20B). Por otra parte, la medición de intensidad de fluorescencia registrada para la determinación de riboflavina no mostró cambios entre ambas cepas.

Con base en estos datos, los resultados de fluorescencia obtenidos para el triptófano y los datos de crecimiento, que se muestran en la Figura 12, algunos autores han considerado la medición de este aminoácido como un indicador del contenido relativo de proteína de las células, y se ha utilizado como indicador del crecimiento celular en cultivos (Moyersoén *et al.*, 2004). Al correlacionar los datos de la intensidad de fluorescencia obtenidos del triptófano y el crecimiento celular, ambos métodos revelaron que los valores eran ligeramente superiores en la cepa T1048 que en la WtWB. Sin embargo, la mayor diferencia en la intensidad de fluorescencia entre la cepa WtWB y T1048 se encontró cuando se analizó la piridoxina con la fluorescencia máxima registrada para esta molécula a 401 nm (Figura 20B). La piridoxina participa en el metabolismo de aminoácidos, carbohidratos y lípidos (Wu y Lu, 2012) y es un indicador de la diferencia metabólica entre cepas, estos cambios metabólicos son probablemente causados por la sobreexpresión del gen *GITpi* en la cepa T1048, un efecto que también se ha informado con respecto a la sobreexpresión de genes en levaduras (Maslanka *et al.*, 2018). Además, se ha demostrado que la piridoxina puede cambiar el estado fisiológico de la célula, exhibiendo una actividad antioxidante que se asocia con diferentes mecanismos, incluida la extinción directa de especies reactivas de oxígeno, como el anión superóxido o el oxígeno singlete, o la prevención de peroxidación de lípidos (Müller y Hemphill, 2013). Por otro lado, la riboflavina no reveló una diferencia en la intensidad de la fluorescencia emitida entre las cepas WtWB y T1048 (Figura 20C), lo que puede deberse a que

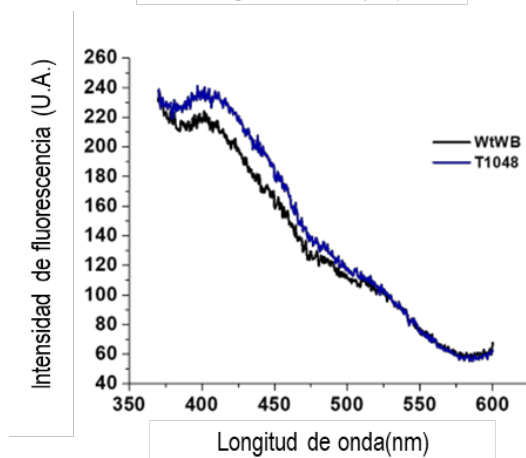
la síntesis de esta vitamina depende de la acumulación intracelular de uno de sus principales precursores, la ribulosa-5-fosfato (Ru5P) (Fischer, 2015). Esto se demostró en *Bacillus subtilis*, al sobreexpresar uno de sus genes de la vía de la pentosa fosfato, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), en la que Ru5P se acumula y aumenta la producción de riboflavina (Zhu *et al.*, 2006; Duan *et al.*, 2010).

Estos resultados concuerdan con un informe anterior en levaduras, en el que el nivel de autofluorescencia fue diferente entre las células, como resultado de diferentes concentraciones de fluoróforos endógenos, como triptófano, piridoxina y riboflavina (Müller y Hemphill, 2013).

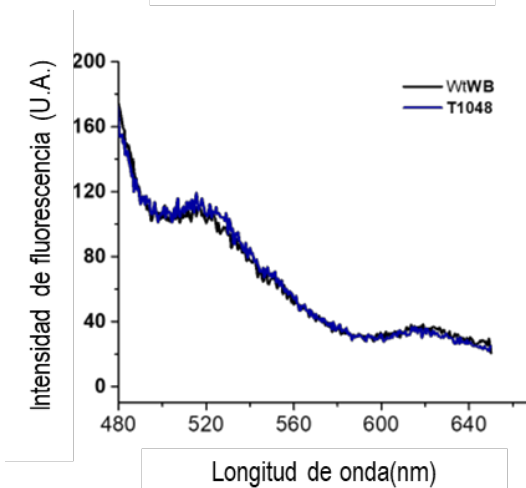
**A**



**B**



**C**



**Figura 20.** Autofluorescencia determinada en trofozoitos transfectados de *G. lamblia* como indicador de productos del metabolismo de la glucosa. Cada gráfica muestra la intensidad de fluorescencia en función de la longitud de onda de las cepas WtWB y T1048 para los metabolitos: **A)** triptófano, **B)** piridoxina y **C)** riboflavina. La medición de cada fluoróforo se realizó por triplicado.

La curva de crecimiento de *G. lamblia* mostró una fase de adaptación del parásito durante las primeras 24 h de cultivo, la fase logarítmica inició después de este tiempo alcanzando un pico máximo a las 72 h, dando pie a la fase estacionaria. La sobreexpresión del gen *GITpi* aumentó el crecimiento de los trofozoítos de *G. lamblia*, este efecto se relacionó con el cambio en la expresión del subsecuente de la TPI en la glucólisis: *gadph*. El vector para la sobreexpresión pTub-HisTEV-Tpi mostró ser eficiente para la síntesis de la enzima TPI, la cual puede acumularse formando cuerpos de inclusión o bien fijarse en la periferia del parásito. A pesar de que la actividad enzimática de TPI no mostró un cambio significativo en las cepas transfectadas, se observó un aumento en el metabolismo de la glucosa favoreciendo la producción de etanol y una aparente producción de piridoxina. Las alteraciones en la tasa de crecimiento, en los niveles de expresión y en el metabolismo de *G. lamblia* sugieren que el vector propuesto en este trabajo es eficiente para la sobreexpresión génica de *GITpi* y confirma la relevancia de la enzima TPI en los trofozoítos de *G. lamblia*.

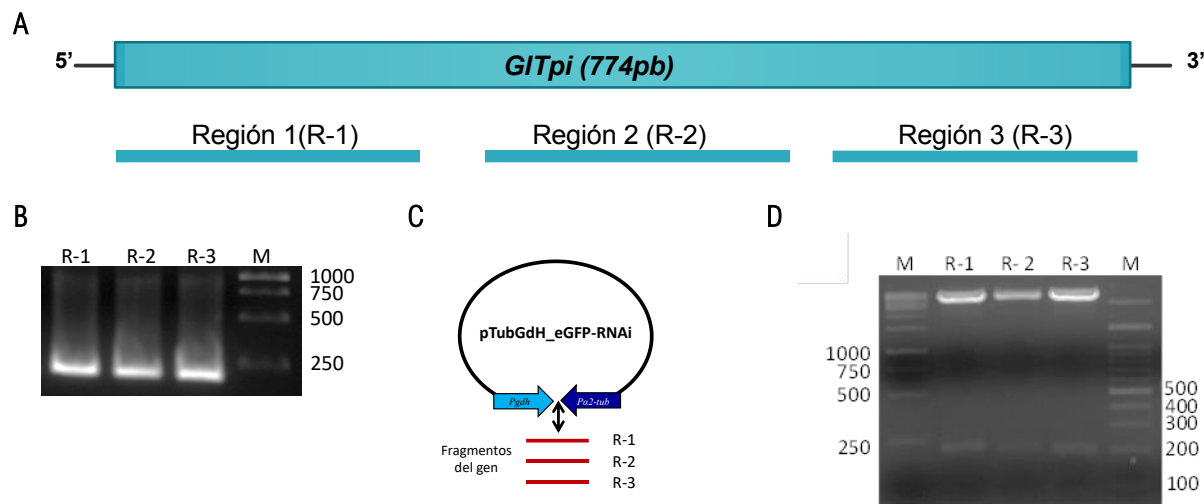
## 6.2 Silenciamiento

Se ha demostrado que las enzimas de la vía RNAi están presentes y son funcionales en *G. lamblia* (Prucca *et al.*, 2008). Se ha sugerido que la expresión de algunas proteínas de *G. lamblia*, como las de la familia denominada proteínas variables de superficie que se expresan en la superficie de las células y sirven para evadir el ataque del sistema inmunitario del hospedero, están reguladas por un mecanismo similar al RNAi (Prucca y Luján, 2009). Marcial-Quino y colaboradores, demostraron que es posible inducir la maquinaria RNAi de *G. lamblia* para atenuar específicamente la expresión de genes seleccionados, con la construcción de vectores que contienen un casete que permite la síntesis de fragmentos de dsRNA a partir de regiones del gen seleccionado (Marcial-Quino *et al.*, 2017). Otros estudios han demostrado la presencia de dsRNA o RNA antisentido de genes endógenos  $\alpha$ -*tub*, RNA polimerasa dependiente de RNA replicasa (*RdRP*), proteína de almacenamiento vegetativo (VSP) o exógenos *eGFP*, que inhiben la expresión de estas proteínas; esto es indicativo de un mecanismo de silenciamiento específico de genes en *G. lamblia* (Rivero *et al.*, 2010).

### 6.2.1 Análisis de la inserción del vector de silenciamiento pTubGdH-eGFR-RNAi en los trofozoítos de *Giardia lamblia*

El silenciamiento del gen *GITpi* fue evaluado mediante la generación de moléculas de dsRNA, esto se logró usando el vector pTubGdH-eGFR-RNAi (Marcial-Quino *et al.*, 2017) y tres regiones diferentes del gen *GITpi*, cada región de 200 pb. Se utilizó este tamaño porque Marcial-Quino y colaboradores (2017) reportaron que el tamaño de dsRNA más eficiente para RNAi en un organismo eucariota temprano como *G. lamblia* es de 200 pb. Las regiones seleccionadas se muestran en la figura 21A, las tres regiones del gen fueron obtenidas por PCR con los primers que se muestran en la Tabla 2. Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa, obteniendo cada región una banda de 200 pb (Figura 21B), en consecuencia, se construyeron los plásmidos y se nombraron pTubGdh-eGFP-RNAi R-1, pTubGdh-eGFP-RNAi R-2, y pTubGdh-eGFP-RNAi R-3, cada plásmido contiene el casete  $\alpha 2$ -*tub::gdh*, con un sitio de clonación *NcoI* que permite la inserción de los fragmentos de DNA que se transcribirán de ambas cadenas para formar un dsRNA (Figura 21C) (Marcial-Quino *et al.*, 2017). Las dos regiones promotoras inducen una fuerte

transcripción constitutiva para favorecer la generación constante de dsRNAs (Yee *et al.*, 2000; Elmendorf *et al.*, 2001), lo que induciría el sistema enzimático de *G. lamblia* RNAi, provocando el silenciamiento del gen *GITpi*. Todos los plásmidos construidos se digirieron con la enzima de restricción *NcoI* para confirmar la presencia del fragmento insertado (Figura 21D), en cada carril se observan 2 bandas, una de 6456 pb perteneciente al vector y otra del fragmento del gen *GITpi* de 200 pb. Después de que los trofozoítos se electroporaron, estos fueron seleccionados con el antibiótico puromicina como marcador de selección.

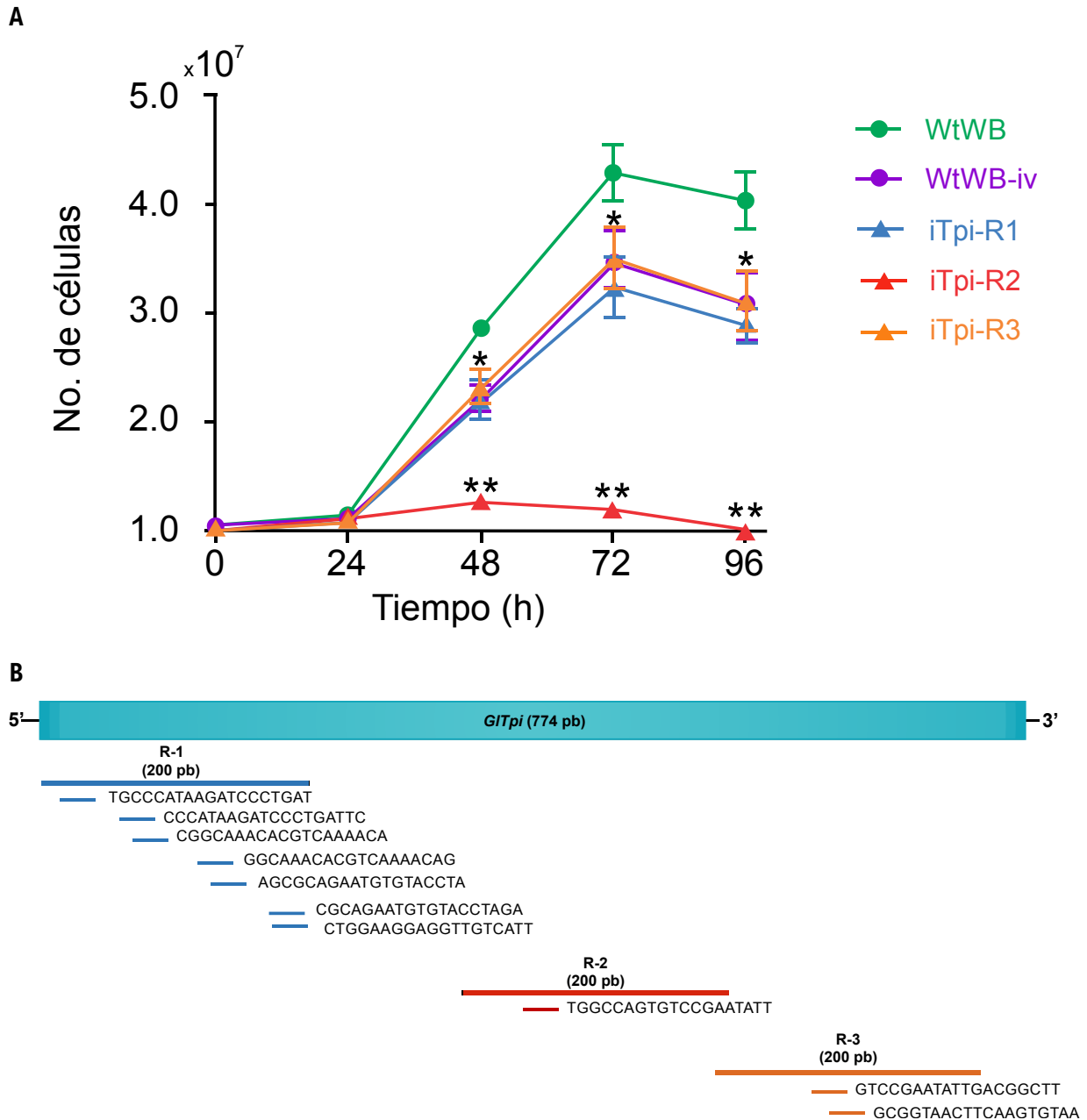


### 6.2.2 Efecto del silenciamiento del gen *GITpi* en el crecimiento de los trofozoítos de *Giardia lamblia*

Para conocer el efecto del silenciamiento del gen *GITpi* sobre el crecimiento de *G. lamblia*, se compararon las tasas de crecimiento de los trofozoítos transfectados de las tres regiones iTpi-R1, iTpi-R2 e iTpi-R3 con las cepas control WtWB y WtWB-iv (Figura 22A). La curva de crecimiento de la cepa WtWB mostró un comportamiento similar a la curva obtenida para la sobreexpresión, donde la fase de adaptación ocurrió en las primeras 24, la fase logarítmica alcanzó un pico máximo a las

72 h con una densidad celular de  $4.3 \times 10^7$ , seguida de la fase estacionaria. Las cepas WtWB-iv, iTpi-R1 e iTpi-R3 presentan el mismo patrón de crecimiento que la WtWB, con la diferencia de que en estas tres cepas la densidad celular disminuye significativamente a partir de las 48 h ( $p < 0.05$ ), alcanzando un valor máximo de  $3.4 \times 10^7$  a las 72 h. Esto sugiere que el vector de silenciamiento pTubGdh\_eGFP-RNA tiene un efecto *per se* sobre el crecimiento de *G. lamblia* y que el efecto observado por las regiones 1 y 3 se debe a la presencia del vector. Por otro lado, el crecimiento de la cepa iTpi-R2 permaneció constante en los cuatro tiempos de cultivo, es decir, no presentó fase logarítmica ni fase estacionaria. La disminución en el crecimiento de la cepa iTpi-R2 no está relacionada con la presencia del vector debido a que esta cepa mostró diferencias significativas con el resto de las cepas estudiadas ( $p < 0.05$ ).

Para comprender el efecto en la tasa de crecimiento producido por el silenciamiento de la región 2 del gen *GITpi*, se analizaron las secuencias *in silico* en un predictor en línea ([bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/sirnaSequenceDesignInit.do](http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/sirnaSequenceDesignInit.do)) para encontrar supuestos siRNA que podrían generarse en el gen (Figura 22B). Este programa arrojó diez secuencias de 19 pb como siRNAs potenciales, de los cuales la región 1, presenta siete secuencias; la región 2, una sola secuencia; la región 3, dos secuencias. El hecho de que se hayan obtenido más de un siRNA en las regiones 1 y 3 no implica que todos sean generados y procesados. La región 2 al mostrar un único posible siRNA explica la disminución en el crecimiento celular.



**Figura 22.** Efecto del silenciamiento génico de *GITpi* en el crecimiento de *G. lamblia*. **A)** Cinética de crecimiento celular de las cepas WtWB, WtWB-iv, y las regiones transfectadas iTpi-R1, iTpi-R2 y iTpi-R3. **B)** Análisis de los siRNA del gen *GITpi* obtenidos con el programa [bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/sirnaSequenceDesignInit.do](http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/sirnaSequenceDesignInit.do). Las barras de error indican el promedio de cinco repeticiones de cinco experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar. El \* representa una diferencia significativa en el número de células entre la cepa WtWB con las cepas WtWB-iv, iTpi-R1 e iTpi-R3 ( $p < 0.05$ ); el \*\* representa una diferencia significativa entre las cepas WtWB y WtWB-iv con la región 2 (iTpi-R2) ( $p < 0.01$ ).

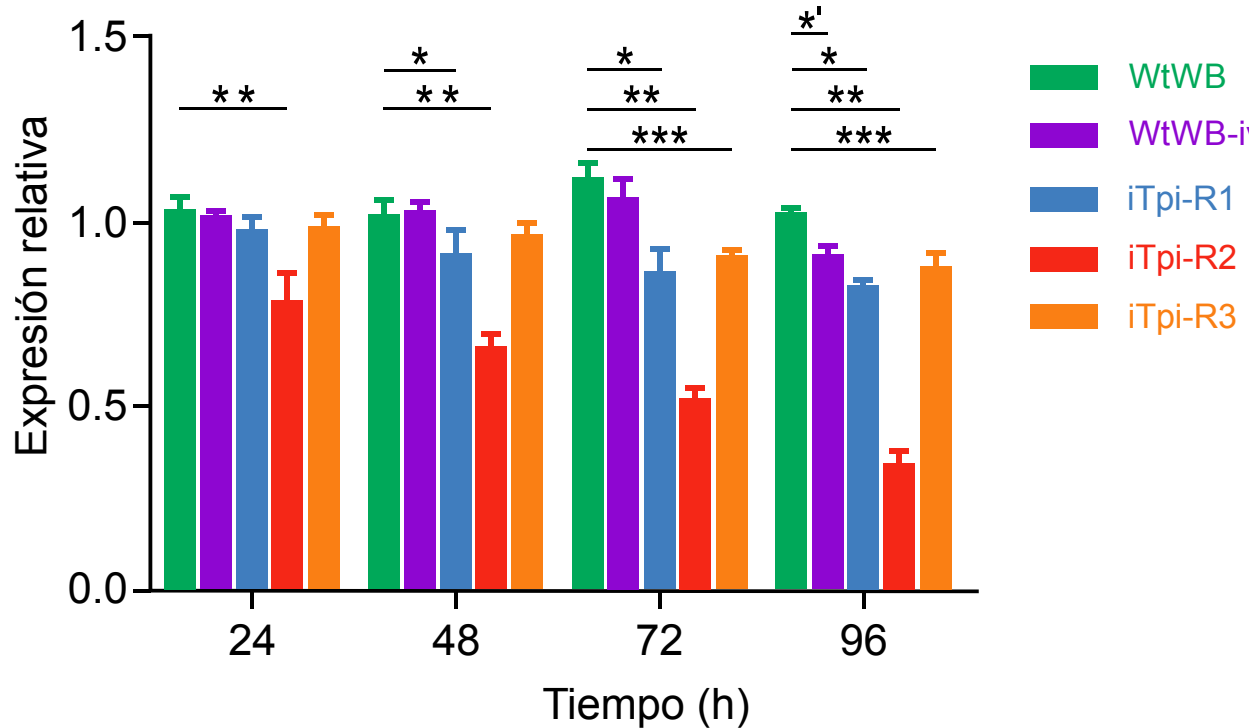


### 6.2.3 Efecto del silenciamiento del gen *GITpi* en los niveles de expresión

Para determinar si la disminución en el crecimiento de los trofozoítos transfectados se debe al silenciamiento génico del gen *tpi*, y de esta manera comprobar si la proteína TPI es una diana potencial para el diseño de fármacos en *G. lamblia*, se usó la estrategia basada en la generación de dsRNA para silenciar la expresión del gen *GITpi* por la vía RNAi. Posteriormente, se determinaron los niveles de transcripción del gen *GITpi* mediante RT-qPCR en las cepas iTpi-R1, iTpi-R2 e iTpi-R3 a diferentes tiempos de cultivo: 24, 48, 72 y 96 h (Figura 23).

En la figura 23 se muestran los cambios en los niveles de expresión en función del tiempo, donde la cepa WtWB no muestra diferencia significativa a las 24, 48 y 72 h con la cepa WtWB-iv; sin embargo, entre estas dos cepas la expresión disminuyó significativamente a las 96 h ( $p < 0.05$ ). La región iTpi-R1 disminuyó significativamente a partir de las 48 h respecto a la cepa WtWB ( $p < 0.05$ ). La región iTpi-R2 muestra una disminución significativa en los niveles expresión del gen *GITpi* desde las primeras 24 h respecto a la cepa WtWB; a las 72 horas disminuyó la expresión en un 50% y a las 96 h disminuyó aproximadamente en un 60%. La expresión de la región iTpi-R3 disminuyó significativamente a partir de las 72 h respecto a la cepa WtWB. A las 96 h todas las cepas mostraron una disminución significativa en los niveles de RNAm del gen *GITpi* respecto a la cepa WtWB. Las cepas con las regiones 1 y 3 no mostraron diferencia con la cepa WtWB-iv, lo que sugiere que los cambios en los niveles de expresión de estas regiones se deben a la presencia del vector de silenciamiento. Estos datos se relacionan con los resultados de crecimiento mostrados en la figura 22A, donde se observa que la mayor disminución en el crecimiento de *G. lamblia* se ve afectado por el silenciamiento de la región 2 del gen *GITpi*.

Debido a que este método produjo una inhibición del 50% a las 72 h de la expresión del gen *GITpi*, y que el valor obtenido es mayor que el 31% de reducción en la expresión de *NADHox* obtenido por Marcial-Quino y colaboradores (2017), se confirma la validez de esta estrategia molecular para el silenciamiento génico en *G. lamblia*.



**Figura 23.** Cuantificación de RNAm del gen *GITpi* en las diferentes cepas mediante RT-qPCR. Determinación de la expresión del gen *GITpi* cada 24 h, usando el gen *actina* (*act*) como gen de referencia. Las barras de error representan el promedio de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. El \* indica una diferencia significativa entre la WtWB y la región 1 (iTpi-R1) ( $p < 0.01$ ); el \*\* indica una diferencia significativa entre la cepa WtWB y la región 2 (iTpi-R2) ( $p < 0.01$ ); el \*\*\* indica una diferencia significativa entre WtWB y la región 3 (iTpi-R3) ( $p < 0.01$ ); finalmente el \*' indica una diferencia significativa entre la WtWB y la WtWB-iv ( $p < 0.01$ ).

#### 6.2.4 Efecto del silenciamiento del gen *GITpi* en la actividad enzimática de TPI

Se determinó la actividad enzimática de la TPI en las cepas WtWB, WtWB-iv e iTpi-R2 durante los diferentes períodos de cultivo, debido a que la cepa iTpi-R2 mostró una mejor respuesta en el silenciamiento mediante RNAi que las cepas iTpi-R1 e iTpi-R3. Las cepas WtWB y WtWB-iv, no muestran diferencias significativas entre ellas ( $p > 0.05$ ), lo que indica que a pesar de que existe una disminución en el crecimiento y en los niveles de expresión a las 96 h de la cepa WtWB-iv por la presencia del vector pTubGdh\_eGFP-RNA, no hay una diferencia en la actividad enzimática de TPI. Sin embargo, se puede confirmar una relación entre la disminución en el crecimiento de la

cepa iTpi-R2 con la disminución significativa en la actividad enzimática, siendo esta 1.6 veces menor a las 0 y 24 h; 3 veces menor a las 48 h; 5.2 veces menor a las 96 h, respecto a la cepa WtWB (Figura 24).

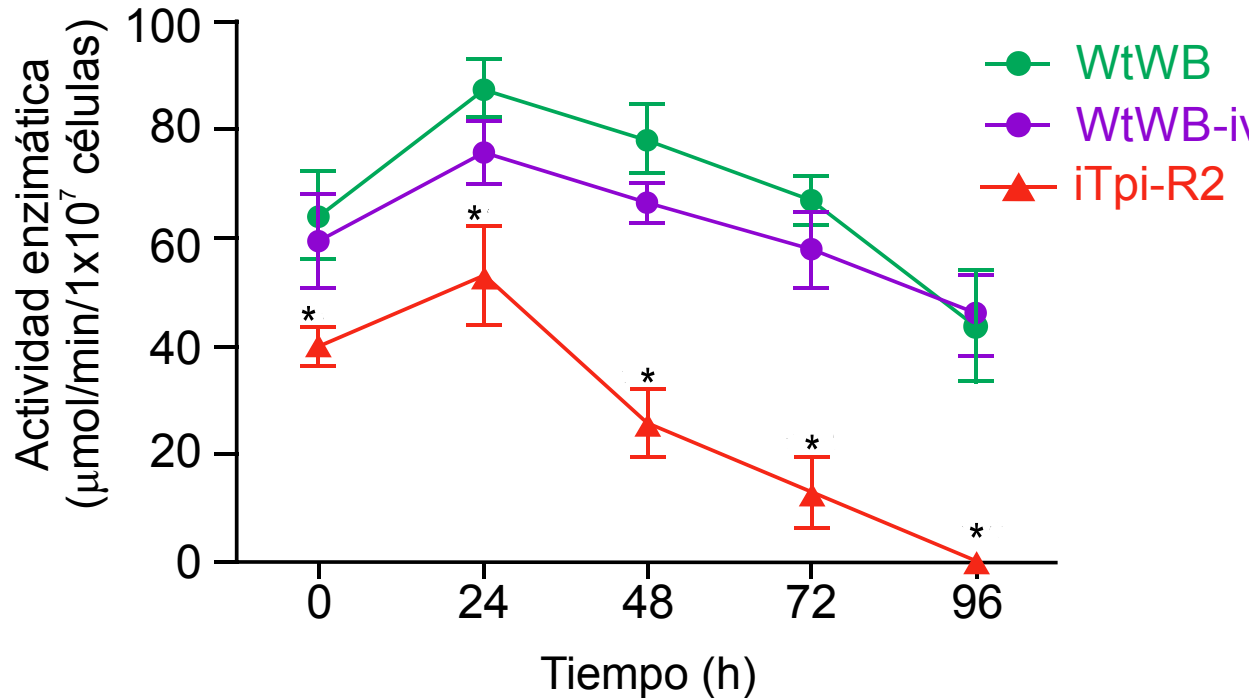


Figura 24. Efecto del silenciamiento génico de *GITpi* sobre la actividad de la enzima TPI mediante espectrofotometría. Cuantificación de la actividad de la enzima TPI en función del tiempo de la cepa WtWB y la T1048. Las barras de error indican la media de tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar. El \* indica una diferencia significativa en la actividad enzimática entre las cepas WtWB y T1048 ( $p < 0.01$ ).

El efecto del silenciamiento del gen *GITpi* mediado por RNAi es contrario al observado en el efecto de la sobreexpresión del gen, es decir, la sobreexpresión del gen *GITpi* aumenta la cantidad de proteína TPI sin observar cambios en la actividad enzimática, pero el silenciamiento del gen disminuye la actividad enzimática.

En conjunto, estos datos indican que el vector construido con la región 2 del gen *GITpi* genera dsRNA del gen *GITpi*, capaz de atenuar la expresión de este, lo que probablemente promueve la degradación de los transcritos (RNAm) que codifican para la proteína TPI. Esto tiene como consecuencia una menor concentración de proteína, lo cual se puede relacionar con la reducción

de la actividad enzimática, y a su vez tiene implicaciones en el crecimiento de los trofozoítos silenciados con la región 2.

La curva de crecimiento de *G. lamblia* mostró una fase de adaptación del parásito durante las primeras 24 h de cultivo, la fase logarítmica inició después de este tiempo alcanzando un pico máximo a las 72 h, dando pie a la fase estacionaria para los trofozoítos WtWB, WtWB-iv, iTpi-R1 e iTpi-R3; sin embargo, la región 2 carece de estas fases. Este efecto se relacionó con el siRNA único, así como con la disminución gradual en los niveles de expresión. El vector propuesto para el silenciamiento pTubGdh\_eGFP-RNA (Marcial-Quino *et al.*, 2017) mostró un efecto en el crecimiento del parásito y en la expresión génica. La actividad enzimática de TPI disminuyó significativamente en la cepa transfectada iTpi-R2. Las alteraciones en la tasa de crecimiento, en los niveles de expresión y en la actividad enzimática de TPI sugieren que el vector de silenciamiento con la región 2 del gen *GITpi* es de vital importancia para el parásito *G. lamblia*. La disminución de la actividad enzimática produce un desequilibrio energético, el cual podría ser perjudicial para el crecimiento del parásito por la acumulación de DHAP que se convierte en metilglioxal, un metabolito tóxico (López-Velázquez *et al.*, 2019).

La importancia de este trabajo es la evaluación del efecto de la sobreexpresión y silenciamiento del gen *GITpi* en los trofozoítos de *G. lamblia*, comparados con otros trabajos reportados (Desai y Miller, 2008; Enríquez-Flores *et al.*, 2008; Enríquez-Flores *et al.*, 2011; López-Velázquez *et al.*, 2019). Por otro lado, se podría considerar el vector de silenciamiento como tratamiento anti-giardiasis; sin embargo, se requieren más estudios.

## 7. CONCLUSIONES

Se construyó un vector para sobreexpresar genes en *G. lamblia*, lo que permitió analizar la expresión homóloga del gen *GITpi*; la sobreexpresión del gen en los trofozoítos transfectados se verificó mediante un análisis de RT-qPCR, y la proteína TPI codificada por la secuencia contenida en el vector de sobreexpresión construido se verificó mediante análisis de inmunolocalización. La sobreexpresión del gen *GITpi* provocó efectos importantes sobre los trofozoítos transfectados; entre ellos, aumento en la cinética de crecimiento de la cepa T1048 respecto a la cepa WtWB. Además, la microscopía reveló que también existía una mayor concentración de proteína TPI en la cepa T1048, y que esta se acumuló en la periferia de la membrana del trofozoíto. Esta acumulación de la enzima TPI en la periferia podría ser la razón por la cual no hay cambios significativos en la actividad enzimática en la cepa T1048. Se encontraron cambios importantes en la síntesis de algunos metabolitos cuantificados: la producción de etanol, triptófano y piridoxina fue mayor en los trofozoítos transfectados, lo que indica una modificación en su metabolismo. En vista de esto, los resultados obtenidos mejoran el conocimiento existente sobre la ubicación y función de la enzima TPI, sugiriendo que esta enzima es importante para el desarrollo y proliferación de *Giardia*.

Adicionalmente, se confirmó que el silenciamiento génico por la vía RNAi puede ser una herramienta útil para limitar específicamente la expresión génica en el parásito *G. lamblia*. Se demostró que la llamada región 2 del gen *GITpi* provoca efectos importantes sobre el metabolismo de *G. lamblia*, ya que tiene un mayor efecto en la inhibición del crecimiento de los trofozoítos. Además, disminuyó la expresión de los transcritos (RNAm), afectando por consiguiente la actividad enzimática de la enzima TPI. Estos resultados indican que la enzima TPI posee un papel esencial en el metabolismo de *G. lamblia*, debido a que se inhibió el desarrollo y la proliferación del parásito.

Los resultados de sobreexpresión y silenciamiento validan a la enzima TPI como un potencial blanco terapéutico para el desarrollo de fármacos específicos anti*giardiásicos*.

## 8. PERSPECTIVAS

Los trofozoítos transfectados con el vector de sobreexpresión y el vector de silenciamiento de *G. lamblia* podrían ser una herramienta útil para la detección y análisis experimental de moléculas de importancia en este parásito.

Es necesario medir la concentración de la enzima TPI en las cepas T104, así como la actividad enzimática de otras enzimas involucradas en el metabolismo de *G. lamblia*. Por otro lado, es de importancia estudiar el efecto del silenciamiento en el metabolismo de *G. lamblia*, consumo de glucosa, concentración de metabolitos tóxicos, concentración de piruvato, etanol, así como medir los niveles de expresión de otros genes de la vía glucolítica del parásito.

## 9. REFERENCIAS

- Abeywardena, H., Jex, A.R. & Gasser, R.B. (2015). *A perspective on Cryptosporidium and Giardia*, with an emphasis on bovines and recent epidemiological findings. *Advances in Parasitology*, 88, 243-301.
- Ahmed, D. A., Rabbo, M. A., Jamjoom, M., S Salem, H., & Ghieth, M. A. (2019). Giardiasis Pattern among Different Age Categories: Childhood Assemblage B Proclaim Endemicity. *Iranian journal of parasitology*, 14(4), 614-622.
- AMSE (Asociación de Médicos de Sanidad Exterior) (2016). Información epidemiológica. Giardiasis. Epidemiología y situación mundial. Recuperado de: <https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/187-giardiasis-epidemiologia-y-situacion-mundial>
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K. & Svärd, S.G. (2010). *Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of Giardia species*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 413-422.
- Ansell, B.R.E., McConville, M.J., Baker, L., Korhonen, P.K., Young, N.D., Hall, R.S., Rojas, C.A., Svärd, S.G., Gasser, R.B. & Jex, A.R. (2015). Time-dependent transcriptional changes in axenic *Giardia duodenalis* trophozoites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(12), e0004261.
- Argüello-García, R., Cruz-Soto, M., Romero-Montoya, L. & Ortega-Pierres, M.G. (2009). *In vitro* resistance to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in *Giardia duodenalis*: variability and variation in gene expression. *Infection, Genetics and Evolution*, 9, 1057-1064.
- Arié, J.P., Miot, M., Sassoon, N. & Betton, J.M. (2006). Formation of active inclusion bodies in the periplasm of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 62, 427-437.
- Baneyx, F. & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22, 1399-1408.
- Bergmeyer, H.U. (1974). *Methods in Enzymatic Analysis*, 3a ed. Elsevier. pp. 1463-1468.
- Bergmeyer, H.U. & Beutler, H.O. (1984). Ethanol; in Bergmeyer HU (eds): *Methods in Enzymatic Analysis*, ed 3. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft. pp 598-606.
- Bernander, R., Palm, J.E. & Svärd, S.G. (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cellular Microbiology*, 1, 55-62.

- Bogitsh, B.J., Carter, C.E. & Oeltmann, T.N. (2013). Visceral Protozoa II. *Human Parasitology*, pp. 73-84. Elsevier.
- Brown, D. M., Upcroft, J. A., Edwards, M. R., & Upcroft, P. (1998). Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *International journal for parasitology*, 28(1), 149–164.
- Cacciò, S. M., & Ryan, U. (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 160(2), 75–80.
- Castillo-Villanueva, A., Méndez, S.T., Torres-Arroyo, A., Reyes-Vivas, H. & Oria-Hernández, J. (2016). Cloning, expression and characterization of recombinant, NADH oxidase from *Giardia lamblia*. *The Protein Journal*, 35(1), 24-33.
- Davis-Hayman, S.R. & Nash, T.E. (2002). Genetic manipulation of *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 122(1), 1-7.
- Desai, K.K. & Miller, B.G. (2008). A metabolic bypass of the triosephosphate isomerase reaction. *Biochemistry*, 47(31), 7983-7985.
- Du, J.X., Hagos, E.G., Nandan, M.O., Bialkowska, A.B., Yu, B. & Yang, V.W. (2011). The E3 ubiquitin ligase SMAD ubiquitination regulatory factor 2 negatively regulates Krüppel-like factor 5 protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(46), 40354-40364.
- Duan, Y.X., Chen, T., Chen, X. & Zhao, X.M. (2010). Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase enhances riboflavin production in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1907-1914.
- Einarsson, E., Ma'ayeh, S. & Svärd, S.G. (2016). An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 47-52.
- El Basha, N. R., Zaki, M. M., Hassanin, O. M., Rehan, M. K., & Omran, D. (2016). *Giardia* Assemblages A and B in Diarrheic Patients: A Comparative Study in Egyptian Children and Adults. *The Journal of parasitology*, 102(1), 69–74.
- Elmendorf H.G., Singer S.M., Pierce J., Cowan, J. & Nash TE. (2001). Initiator and upstream elements in the alpha2-tubulin promoter of *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 113, 157-169.
- Enriquez-Flores, S., Rodriguez-Romero, A., Hernandez-Alcantara, G., De la Mora-De la Mora, I., Gutierrez-Castrellon, P., Carvajal, K., & Reyes-Vivas, H. (2008). Species-specific inhibition of *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase by localized perturbation of the homodimer. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 157(2), 179-186.



- Enríquez-Flores, S., Rodríguez-Romero, A., Hernández-Alcántara, G., Oria-Hernández, J., Gutiérrez-Castrellón, P., Pérez-Hernández, G., de la Mora-de la Mora, I., Castillo-Villanueva, A., García-Torres, I., Méndez, S. T., Gómez-Manzo, S., Torres-Arroyo, A., López-Velázquez, G. & Reyes-Vivas, H. (2011). Determining the molecular mechanism of inactivation by chemical modification of triosephosphate isomerase from the human parasite *Giardia lamblia*: a study for antiparasitic drug design. *Proteins*, 79(9), 2711-2724.
- Esch, K.J. & Petersen, C.A. (2013). Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 58-85.
- Feng, X.-M., Cao, L.-J., Adam, R. D., Zhang, X.-C., & Lu, S.-Q. (2008). The catalyzing role of PPK in *Giardia lamblia*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(2), 394-398.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-811.
- Fischer, S.E.J. (2015). RNA Interference and microRNA-mediated silencing. *Current Protocols in Molecular Biology*, 26.1.1-26.1.5.
- Franzén, O., Jerlström-Hultqvist, J., Castro, E., Sherwood, E., Ankarklev, J., Reiner, D. S., Palm, D., Andersson, J. O., Andersson, B., & Svärd, S. G. (2009). Draft genome sequencing of giardia intestinalis assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? *PLoS pathogens*, 5(8), e1000560.
- Fu, D., Uauy, C., Blechl, A. & Dubcovsky, J. (2007). RNA interference for wheat functional gene analysis. *Transgenic Research*, 16(6), 689-701.
- Gardner, T.B. & Hill, D.R. (2001). Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 14(1), 114-128.
- GiardiaDB. (15 de febrero de 2022). Giardia Informatics Resources. <http://giardiadb.org/giardiadb/>
- Halder, G., Callaerts, P. & Gehring, W. J. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5205), 1788-1792.
- Gourguechon, S. & Cande, W.Z. (2010). Rapid tagging and integration of genes in *Giardia intestinalis*. *Eukaryotic Cell*, 10, 142-145.
- Han, J. & Collins, L.J. (2012). Reconstruction of sugar metabolic pathways of *Giardia lamblia*. *International Journal of Proteomics*. 980829,1-9.
- Hinnen, A., Hicks, J.B. & Fink, G.R. (1978). Transformation of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(4), 1929-1933.

- Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B., & Philpott, K. L. (2011). Principles of early drug discovery. *British journal of pharmacology*, 162(6), 1239–1249.
- Hooshyar, H., Rostamkhani, P., Arbabi, M., & Delavari, M. (2019). Giardia lamblia infection: review of current diagnostic strategies. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 12(1), 3–12.
- Jerlström-Hultqvist, J., Stadelmann, B., Birkestedt, S., Hellman, U. & Svärd, S.G. (2012). Plasmid vectors for proteomic analyses in *Giardia*: purification of virulence factors and analysis of the proteasome. *Eukaryotic Cell*, 11, 864-873.
- Karnkowska, A., Vacek, V., Zubáčová, Z., Treitli, S., Petrželková, R., Eme, L., Novák, L., Žárský, V., Barlow, L., Herman, E., Soukal, P., Hroudová, M., Doležal, P., Stairs, C., Roger, A., Eliáš, M., Dacks, J., Vlček, C. & Hampl, V. (2016). A Eukaryote without a mitochondrial organelle. *Current Biology*, 26, 1-11.
- Karp, G. (2011). Biología celular y molecular conceptos y experimentos. *Mc Graw Hill*. 6ª Edición. 448-453.
- Katiyar, S.K., Gordon, V.R., McLaughlin, G.L. & Edlind, T.D. (1994). Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with beta-tubulin sequence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(9), 2086-2090.
- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D. & Chambon, P. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5241), 1491-1494.
- Kenehisa, M. & Goto, S. (2010). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28, 27-30.
- Lau, A.H., Lam, N.P., Piscitelli, S.C., Wilkes, L. & Danziger, L.H. (1992). Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. *Clinical Pharmacokinetics*, 23(5), 328-364.
- Leitsch, D., Burgess, A.G., Dunn, L A., Krauer, K G., Tan, K., Duchêne, M., Upcroft, P., Eckmann, L, & Upcroft, J.A. (2011). Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thioredoxin reductase are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-nitroimidazole resistance in *Giardia lamblia*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(8), 1756-1765.
- Lin, J. & Blackburn, E.H. (2004). Nucleolar protein PinX1p regulates telomerase by sequestering its protein catalytic subunit in an inactive complex lacking telomerase RNA. *Genes & Development*, 18(4), 387-396.

- Lopes-Oliveira, L., Fantinatti, M., & Da-Cruz, A.M. (2020). In vitro-induction of metronidazole-resistant *Giardia duodenalis* is not associated with nucleotide alterations in the genes involved in pro-drug activation. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 115, e200303.
- López-Avilés, S., Grande, M., González, M., Helgesen, A.L., Alemany, V., Sanchez-Piris, M., Bachs, O., Millar, J.B. & Aligue, R. (2005). Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress-activated Srk1 kinase in fission yeast. *Molecular Cell*, 17(1), 49-59.
- López-Velázquez, G., Fernández-Lainez, C., de la Mora-de la Mora, J.I., Caudillo de la Portilla, D., Reynoso-Robles, R., González-Maciel, A., Ridaura, C., García-Torres, I., Gutiérrez-Castrellón, P., Olivos-García, A., Flores-López, L.A. & Enríquez-Flores, S. (2019). On the molecular and cellular effects of omeprazole to further support its effectiveness as an anti-giardial drug. *Scientific Reports*, 9(1), 8922.
- Luján, H.D. & Svärd, S. (2011). *Giardia*-A Model Organism, in: Jarroll E.L., van Keulen, H., Paget T.A., Lindmark G.D. (Eds), *Giardia Metabolism*. SpringerWien New York, pp 127-137.
- Marcial-Quino, J., Fierro, F., De la Mora-De la Mora, I., Enríquez-Flores, S., Gómez-Manzo, S., Vanoye-Carlo, A., Garcia-Torres, I., Sierra-Palacios, E. & Reyes-Vivas, H. (2016a). Validation of housekeeping genes as an internal control for gene expression studies in *Giardia lamblia* using quantitative real-time PCR. *Gene*, 581, 21-30.
- Marcial-Quino, J., Gómez-Manzo, S., Fierro, F., Vanoye-Carlo, A., Rufino-González, Y., Sierra-Palacios, E., Castillo-Villanueva, A., Castillo-Rodríguez, R.A., Rodríguez-Bustamante, E., Arreguin-Espinosa, R. & Reyes-Vivas, H. (2016b). Stem-Loop RT-qPCR as an efficient tool for the detection and quantification of small RNAs in *Giardia lamblia*. *Genes*, 7(12), 131.
- Marcial-Quino, J., Gómez-Manzo, S., Fierro, F., Rufino-González, Y., Ortega-Cuellar, D., Sierra-Palacios, E., Vanoye-Carlo, A., González-Valdez, A., Torres-Arroyo, A., Oria-Hernández, J., Reyes-Vivas, H. (2017). RNAi-mediated specific gene silencing as a tool for the discovery of new drug targets in *Giardia lamblia*; evaluation using the NADH oxidase gene. *Genes (Basel)*, 8(11), pii: E303.
- Maslanka, R., Kwolek-Mirek, M. & Zadrag-Tecza, R. (2018). Autofluorescence of yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells caused by glucose metabolism products and its methodological implications. *Journal of Microbiological Methods*, 146, 55-60.
- McArthur, A. G., Morrison, H. G., Nixon, J. E., Passamaneck, N. Q., Kim, U., Hinkle, G., Crocker, M. K., Holder, M. E., Farr, R., Reich, C. I., Olsen, G. E., Aley, S. B., Adam, R. D., Gillin, F. D., & Sogin, M. L. (2000). The *Giardia* genome project database. *FEMS microbiology letters*, 189(2), 271-273.

- Meeks-Wagner, D. & Hartwell, L.H. (1986). Normal stoichiometry of histone dimer sets is necessary for high fidelity of mitotic chromosome transmission. *Cell*, 44(1), 43-52.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*. 31(3), 426-428.
- Minetti, C., Chalmers, R.M., Beeching, N.J., Probert, C. & Lamden, K. (2016). Giardiasis. *The British Medical Journal*, i5369, 1-9.
- Miranda-Ozuna, J.F., Hernández-García, M.S., Brieba, L.G., Benítez-Cardoza, C.G., Ortega-López, J., González-Robles, A. & Arroyo, R. 2016. The glycolytic enzyme triosephosphate isomerase of *Trichomonas vaginalis* is a surface-associated protein induced by glucose that functions as a laminin- and fibronectin-binding protein. *Infection and Immunity*, 84, 2878-2894.
- Miyamoto, Y. & Eckmann, L. (2015). Drug development against the major diarrhea-causing parasites of the small intestine, *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1208.
- Mocellin, S. & Provenzano, M. (2004). RNA interference; learning gene knock-down from cell physiology. *Journal of Translational Medicine*, 2(1), 39.
- Monici, M. (2005). Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnology Annual Review*, 11, 227-256.
- Moyersoen, J., Choe, J., Fan, E., Hol, W.G., Michels, P.A. (2004). Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 603-643.
- Müller, J., & Hemphill, A. (2013). New approaches for the identification of drug targets in protozoan parasites. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 301, 359-401.
- Nasmyth, K.A. & Reed, S.I. (1980). Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(4), 2119-2123.
- Nogi, Y., Shimada, H., Matsuzaki, Y., Hashimoto, H. & Fukasawa, T. (1984). Regulation of expression of the galactose gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. II. The isolation and dosage effect of the regulatory gene GAL80. *Molecular & General Genetics: MGG*, 195(1-2), 29-34.
- Olalla, H.R. & Tercero, G.J. (2011). Parasitosis comunes interna y externas. Consejos desde la oficina de farmacia. *Ámbito Farmaceutico Educación Sanitaria*, 30(4), 33-39.
- Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Ramirez, J., Becker, I., Berzunza, M., Landa, A., Gomez-Puyou, A., Tuena De Gomez-Puyou, M. & Perez-Montfort, R. (1997). Cloning, expression, purification and

- characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Biochemistry*, 244, 700-705.
- López-Velázquez, G., Fernández-Lainez, C., de la Mora-de la Mora, J.I., Caudillo de la Portilla, D., Reynoso-Robles, R., González-Maciel, A., Ridaura, C., García-Torres, I., Gutiérrez-Castrellón, P., Olivos-García, A., Flores-López, L.A. & Enríquez-Flores, S. (2019). On the molecular and cellular effects of omeprazole to further support its effectiveness as an anti-giardial drug. *Scientific Reports*, 9(1), 8922.
  - Pereira, L.A., Bão, S.N., Barbosa, M.S., da Silva, J.L., Felipe, M.S., de Santana, J.M., Mendes-Giannini, M.J. & de Almeida-Soares, C.M. (2007). Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Research*, 7, 1381-1388.
  - Podrazký, O., Kuncová, G., Krasowska, A. & Sigler, K. (2003). Monitoring the growth and stress responses of yeast cells by two-dimensional fluorescence spectroscopy: first results. *Folia Microbiologica*, 48, 189-192.
  - Prelich, G. (2012). Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*, 190(3), 841-854.
  - Primer3Plus. (s.f.). Pick primers from a DNA sequence. <https://www.primer3plus.com>
  - Prucca, C.G. & Lujan, H.D. (2009). Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cellular Microbiology*, 11(12), 1706-1715.
  - Prucca, C.G., Slavin, I., Quiroga, R., Elías, E.V., Rivero, F.D., Saura, A., Carranza, P.G. & Luján, H.D. (2008). Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*, 456(7223), 750-754.
  - Puebla, L. J., Núñez, F. A., Fernández, Y. A., Fraga, J., Rivero, L. R., Millán, I. A., Valdés, L. A., & Silva, I. M. (2014). Correlation of *Giardia duodenalis* assemblages with clinical and epidemiological data in Cuban children. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 23, 7–12.
  - Raj, D., Chowdhury, P., Sarkar, R., Saito-Nakano, Y., Okamoto, K., Dutta, S., Nozaki, T. & Ganguly, S. (2018). Pyruvate protects *Giardia* trophozoites from cysteine-ascorbate deprived medium induced cytotoxicity. *The Korean Journal of Parasitology*, 56, 1-9.
  - Ramiah, K., van Reenen, C.A. & Dicks, L.M. (2008). Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion

- and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Research in Microbiology*, 159, 470-475.
- Reyes-Vivas, H., de la Mora-de la Mora, I., Castillo-Villanueva, A., Yépez-Mulia, L., Hernández-Alcántara, G., Figueroa-Salazar, R., García-Torres, I., Gómez-Manzo, S., Méndez, S. T., Vanoye-Carlo, A., Marcial-Quino, J., Torres-Arroyo, A., Oria-Hernández, J., Gutiérrez-Castrellón, P., Enríquez-Flores, S., & López-Velázquez, G. (2014). Giardial triosephosphate isomerase as possible target of the cytotoxic effect of omeprazole in *Giardia lamblia*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(12), 7072–7082.
  - Richard, J P., Zhai, X.& Malabanan, M.M. (2014). Reflections on the catalytic power of a TIM-barrel. *Bioorganic Chemistry*, 57, 206-212.
  - Rine, J., Hansen, W., Hardeman, E. & Davis, R. W. (1983). Targeted selection of recombinant clones through gene dosage effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(22), 6750-6754.
  - Rivero, M. R., Kulakova, L., & Touz, M. C. (2010). Long Double-Stranded RNA Produces Specific Gene Downregulation in *Giardia lamblia*. *Journal of Parasitology*, 96(4), 815–819.
  - Rose, A.B. & Broach, J R. (1990). Propagation and expression of cloned genes in yeast: 2-microns circle-based vectors. *Methods in Enzymology*, 185, 234-279.
  - Sánchez, L.B. (1998). Aldehyde dehydrogenase (CoA-acetylating) and the mechanism of ethanol formation in the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 354, 57-64.
  - Savioli, L., Smith, H. & Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative.” *Trends in Parasitology*, 22(5), 203-208.
  - Schofield, P.J., Edwards, M.R., Matthews, J. & Wilson, J.R. (1992). The pathway of arginine catabolism in *Giardia intestinalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 51, 29-36.
  - Secretaría de Salud. (2012). GPC ISSSTE-252-12. Diagnóstico y Tratamiento de la Giardiasis en niños y Adolescentes de 1 a 18 años en el Primer y Segundo Nivel de Atención. <http://sgm.issste.gob.mx/medica/medicadocumentacion/guiasautorizadas/Pediatria/ISSSTE-252-12-Giardiasis/giardiasis270812.pdf>
  - Shore García L. (2007). Intestinal protozoa: flagellates and ciliates. Diagnostic Medical Parasitology. LSG & Associates.

- SINAVE. (2020). Distribución de casos nuevos de enfermedad por fuente de notificación Estados Unidos Mexicanos 2020. [https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2020/morbilidad/nacional/distribucion\\_casos\\_nuevos\\_enfermedad\\_fuente\\_notificacion.pdf](https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2020/morbilidad/nacional/distribucion_casos_nuevos_enfermedad_fuente_notificacion.pdf)
- Singer, S.M., Yee, J. & Nash, T.E. (1998). Episomal and integrated maintenance of foreign DNA in *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 92, 59-69.
- Solter, L.F., Becnel, J.J. & Vávra, J. (2012). Research methods for entomopathogenic microsporidia and other protists. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, pp. 329-371. Elsevier.
- Sopko, R., Huang, D., Preston, N., Chua, G., Papp, B., Kafadar, K., Snyder, M., Oliver, S. G., Cyert, M., Hughes, T.R., Boone, C. & Andrews, B. (2006). Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Molecular Cell*, 21(3), 319-330.
- Su, L.H., Lee, G.A., Huang, Y.C., Chen, Y.H. & Sun, C.H. (2007). Neomycin and puromycin affect gene expression in *Giardia lamblia* stable transfection. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 156(2), 124-135.
- Sun, C.H. & Tai, J.H. (2000). Development of a tetracycline-controlled gene expression system in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 105, 51-60.
- Suzuki-Fujimoto, T., Fukuma, M., Yano, K.I., Sakurai, H., Vonika, A., Johnston, S.A. & Fukasawa, T. (1996). Analysis of the galactose signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: interaction between Gal3p and Gal80p. *Molecular and Cellular Biology*, 16(5), 2504-2508.
- Talamond, P., Verdeil, J.L. & Conéjéro, G. (2015). Secondary metabolite localization by autofluorescence in living plant cells. *Molecules*, 20, 5024-5037.
- Theel, E.S. & Pritt, B.S. (2016). Parasites. *Microbiology Spectrum*, 4(4), 1-53.
- Thompson, R.C.A. & Monis, P. (2012). *Giardia*-from genome to proteome. *Advances in Parasitology*, 78, 57-95.
- Touz, M.C., Rópolo, A.S., Rivero, M.R., Vranych, C.V., Conrad, J.T., Svärd, S.G. & Nash, T.E. (2008). Arginine deiminase has multiple regulatory roles in the biology of *Giardia lamblia*. *Journal of Cell Science*, 121, 2930-2938.
- Upcroft, P. & Upcroft, J. A. (2001). Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(1), 150-164.
- Vamathevan, J., Clark, D., Czodrowski, P., Dunham, I., Ferran, E., Lee, G., Li, B., Madabhushi, A., Shah, P., Spitzer, M. & Zhao, S. (2019). Applications of machine learning in drug discovery and development. *Nature Reviews in Drug Discovery*, 18(6), 463-477.

- Vivancos, V., González-Álvarez, I., Bermejo, M. & González-Álvarez, M. (2018). Giardiasis: characteristics, pathogenesis and new insights about treatment. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(15), 1287-1303.
- Wang, Y., Gonzalez-Moreno, O., Roellig, D. M., Oliver, L., Huguet, J., Guo, Y., Feng, Y., & Xiao, L. (2019). Epidemiological distribution of genotypes of *Giardia duodenalis* in humans in Spain. *Parasites & vectors*, 12(1), 432.
- Wickner, S., Maurizi, M.R. & Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, 286, 1888-1893.
- Wierenga, R.K., Kapetaniou, E.G. & Venkatesan, R. (2010). Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 67(23), 3961-3982.
- Wolfe, M.S. (1979). Giardiasis. *Pediatric Clinics of North America*, 26(2), 295-303.
- Wu, X.Y. & Lu, L. (2012). Vitamin B6 deficiency, genome instability and cancer. *Asian Pacific Journal Cancer Prev*, 13, 5333-5338.
- Xu, F., Jerlström-Hultqvist, J., & Andersson, J. O. (2012). Genome-wide analyses of recombination suggest that *Giardia intestinalis* assemblages represent different species. *Molecular biology and evolution*, 29(10), 2895–2898.
- Yee, J. & Nash, T.E. (1995). Transient transfection and expression of firefly luciferase in *Giardia lamblia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), 5615-5619.
- Yee, J., Mowatt, M.R., Dennis, P.P. & Nash, T.E. (2000). Transcriptional analysis of the glutamate dehydrogenase gene in the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. Identification of a primordial gene promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 11432-11439.
- Yu, D.C., Wang, A.L. & Wang, C.C. (1996). Stable coexpression of a drug resistance gene and a heterologous gene in an ancient parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 83, 81-91
- Zhu, Y., Chen, X., Chen, T., Shi, S. & Zhao, X. (2006). Over-expression of glucose dehydrogenase improves cell growth and riboflavin production in *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 28, 1667-1672.





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00299

Matrícula: 2192802307

EFFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN Y SILENCIAMIENTO GÉNICO DE LA TRIOSA FOSFATO ISOMERASA DE *Giardia lamblia* COMO BLANCO FARMACOLÓGICO PARA EL DISEÑO DE ANTIPARASITARIOS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 26 del mes de agosto del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

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

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: MIRIAM ABIGAIL ROJAS ALARCON



MIRIAM ABIGAIL ROJAS ALARCON  
ALUMNA

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

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. ALBA MONICA MONTIEL GONZALEZ

VOCAL

DRA. YENIZEY MERIT ALVAREZ CISNEROS

VOCAL

DR. FERNANDO GOMEZ CHAVEZ

SECRETARIA

DRA. CAROLINA CAMPOS MUÑIZ