



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN**

**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA
SECRETARÍA DE SALUD**

“CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL DE GITIM COMO BLANCO PARA EL DISEÑO DE COMPUESTOS ANTIARDIÁSICOS EN CEPAS AISLADAS DE NIÑOS MEXICANOS”

TESIS

**QUE PARA OBTENER DIPLOMA DE
SUBESPECIALISTA EN GASTROENTEROLOGÍA Y
NUTRICIÓN PEDIÁTRICA**

PRESENTA

DRA. ROSALÍA FIGUEROA SALAZAR

TUTORES DE TESIS

DR. EN C. GABRIEL LÓPEZ VELÁZQUEZ

DR. EN C. HORACIO REYES VIVAS

DR. EN C. GLORIA HERNÁNDEZ ALCÁNTARA



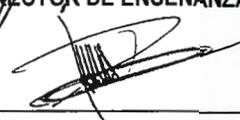
MÉXICO, DF

2008

"CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL DE GITIM COMO BLANCO PARA EL DISEÑO DE COMPUESTOS ANTIGIARDIÁSICOS EN CEPAS AISLADAS DE NIÑOS MEXICANOS"



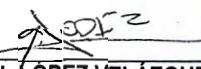
DR. JOSÉ N. REYNÉS MANZUR
DIRECTOR DE ENSEÑANZA



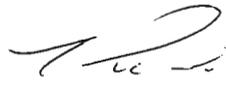
DRA. MIRELLA VÁZQUEZ RIVERA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSTGRADO



DR. JAIME A. RAMÍREZ MAYANS
PROFESOR TITULAR DEL CURSO



DR. EN C. GABRIEL LÓPEZ VELÁZQUEZ
TUTOR DE TESIS



DR. EN C. HORACIO REYES VIVAS
TUTOR DE TESIS



DR. EN C. GLORIA HERNÁNDEZ ALCÁNTARA
TUTOR DE TESIS



DR. ROBERTO CERVANTES BUSTAMANTE
COTUTOR DE TESIS

AGRADECIMIENTOS

A mis maestros del Servicio de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría, S.S.: Dr. Jaime A. Ramírez Mayans, Dr. Roberto Cervantes Bustamante, Dra. Flora Zárate Mondragón, Dr. Norberto Mata Rivera, Dra. Ericka Montijo Barrios, Licenciada en Nutrición Margarita García Campos.

A todos los integrantes del Laboratorio de Bioquímica Genética del Instituto Nacional de Pediatría, S.S., y especialmente al Dr. Gabriel López Velázquez, Dr. Horacio Reyes Vivas, Dra. Gloria Hernández Alcántara, M. en C. José Ignacio De la Mora De la Mora, M. en C. Sergio Enriquez Flores, Dra. Karla A. Carvajal Aguilera

Y también mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo a través de los proyectos J43022-M y 62321. Además de haber otorgado una beca para estudios de postgrado que abarcó de Agosto del 2006 hasta Diciembre del 2006.

DEDICATORIAS

A mis padres Alfonso y Rosalía.

A Carlos.

A mis amigos Gabriel, Horacio, Gloria, Karla, Sergio, Nacho.

CONTENIDO

Resumen.	4
Abstract.	6
1. Introducción.	8
1.1 Epidemiología.	8
1.2 Morfología y ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i> .	10
1.3 Metabolismo.	12
1.4 Enzimas de la glucólisis como blanco de compuestos anti-giardíacos.	14
1.4.1 Estructura de la TIM.	14
2. Planteamiento del Problema.	16
3. Pregunta de investigación.	18
4. Justificación.	19
5. Objetivos.	20
5.1 Objetivos generales.	20
5.2 Objetivos específicos.	20
6. Material y métodos.	21
6.1 Tipo y diseño del estudio.	21
6.2 Selección de pacientes.	21
6.3 Obtención de cultivos axénicos.	22
6.4 Obtención de ADN genómico de trofozoítos.	23
6.4.1 Lisis celular.	23
6.4.2 Extracción de ADN.	23

6.4.3 Precipitación de ADN.	24
6.5 Amplificación por PCR del gen de la TIM de <i>G. lamblia</i> .	26
6.6 Clonación en vector de replicación pCR 2.1.	26
6.6.1 Características del vector de replicación pCR 2.1.	26
6.6.2 Ligación.	28
6.6.3 Transformación.	28
6.7 Purificación de ADN del vector a partir de bacterias.	29
6.8 Secuenciación del gen.	29
6.9 Comparación por alineamiento del gen de TIM obtenido con la base de datos.	30
6.10 Subclonación al vector de expresión pET3a.	30
6.11 Sobreexpresión en la cepa de <i>Escherichia coli</i> BL21DE3pLysS y purificación de la enzima recombinante.	32
6.11.1 Características de la cepa <i>E. coli</i> BL21DE3pLysS.	32
6.11.2 Sobreexpresión de la enzima.	32
6.12 Determinación de la actividad enzimática.	34
6.13 Ensayos de derivatización con DTNB.	35
7. Resultados.	36
7.1 Análisis genético.	36
7.2 Análisis funcional y estructural.	39
8. Discusión.	44
9. Conclusión.	46
10. Referencias bibliográficas.	47

INDICE DE ABREVIATURAS

α GDH	α -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DTNB	Ácido 5, 5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
GAP	Gliceraldehido 3-fosfato
GITIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Giardia lamblia</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
LB	Luria Bertani
PBS	Buffer de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
TBE	Buffer de Tris/borato/EDTA
TIM ó TPI	Triosafosfato isomerasa

CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL DE GITIM COMO BLANCO PARA EL DISEÑO DE COMPUESTOS ANTIGIARDIÁSICOS EN CEPAS AISLADAS DE NIÑOS MEXICANOS.

Figuroa-Salazar R^{1, 2}, Reyes-Vivas H¹, Hernández-Alcántara G¹, De la Mora-De la Mora JI¹, Montijo-Barrios E², Cervantes-Bustamante R², Ruíz-Castillo M², Ramírez-Mayans JA², López-Velázquez G¹.

¹Laboratorio de Bioquímica Genética y ²Servicio de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica, Instituto Nacional de Pediatría, S.S., México. (Apoyado por CONACyT J43022-M y 62321).

RESUMEN.

Introducción. La giardiasis es una patología intestinal ocasionada por el protozooario *Giardia lamblia*. *G. lamblia* es un microorganismo unicelular que se transmite por agua o alimentos contaminados. En países en desarrollo se le ha asociado a la detención del crecimiento y a la diarrea del viajero. Los trofozoítos se replican en el duodeno y producen síntomas como diarrea y malabsorción por daño a las vellosidades intestinales. El parásito basa la obtención de su energía en la glucólisis. La triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima clave en la glucólisis que permite al parásito obtener energía en forma de ATP. El gen de la TIM se ha utilizado para la caracterización de cepas de *G. lamblia* y la enzima se ha propuesto como blanco para el diseño de fármacos anti giardiásicos. Todo lo anterior nos impulsó a iniciar la caracterización de la TIM de cepas de *G. lamblia* aisladas de niños mexicanos. Con el objetivo de proponer a esta enzima como blanco para el diseño de compuestos anti giardiásicos comparamos el efecto inhibitor del ácido bis-nitrobenzoico (DTNB) sobre la TIM de aislados mexicanos y la TIM de la cepa comercial WB.

Material y métodos. Se aislaron trofozoítos de *G. lamblia* a partir de muestras obtenidas por endoscopia alta en un grupo de niños mexicanos con síntomas de malabsorción de lactosa y giardiasis confirmada. A partir de la generación de cultivos axénicos de trofozoítos se aisló ADN genómico usando el método de fenol-cloroformo. Por reacción en cadena de la polimerasa se amplificó el gen de

la TIM y se clonó en un vector de replicación (pCR2.1). Se secuenciaron las clonas que resultaron positivas a contener el gen de la TIM y se compararon contra las secuencias reportadas en el GenBank. Posterior a la identificación de secuencias, el gen de la TIM se subclonó en un vector de sobreexpresión (pET3a). La TIM de *G. lamblia* recombinante (GITIM) se sobreexpresó y purificó por ultracentrifugación y cromatografía líquida de alta resolución obteniéndose una pureza del 99%. Se realizaron los ensayos de inactivación enzimática sobre la GITIM y se compararon con los reportados de la TIM de la cepa WB.

Resultados. Se obtuvieron dos cepas axénicas de *G. lamblia* denominadas INP-N001, N002. El gen de la TIM fue idéntico entre ambas cepas pero difirió del gen de la TIM de la cepa WB por seis mutaciones puntuales. Cinco mutaciones fueron silenciosas (no cambiaron el residuo aminoácil) y la sexta promovió el cambio de residuo (Thr253Ala). La actividad de la TIM recombinante fue similar a la reportada para la TIM de la cepa WB (3167 y 3967 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, respectivamente). La inactivación por el ácido 5, 5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) de la TIM recombinante de los aislados mexicanos y de la cepa WB fue similar. La inactivación total se alcanzó con concentraciones de DTNB de 20 μM .

Conclusiones. El gen y la secuencia de los aislados mexicanos de *G. lamblia* difiere de la TIM de la cepa WB. Sin embargo, los compuestos como el DTNB pueden utilizarse para la inactivación de ambas enzimas con resultados eficientes.

THE TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE FROM *Giardia lamblia* AS A TARGET TO DESIGN ANTIGIARDIAL DRUGS IN MEXICAN STRAINS ISOLATES.

Figuroa-Salazar R², Reyes-Vivas H¹, Hernández-Alcántara G¹, De la Mora-De la Mora JI¹, Montijo-Barrios E², Cervantes-Bustamante R², Ruíz-Castillo M², Ramírez-Mayans JA², López-Velázquez G¹.

¹Laboratorio de Bioquímica Genética y ²Servicio de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica, Instituto Nacional de Pediatría, S.S., México. (Partially supported by CONACyT 62321).

ABSTRACT.

Introduction. Giardiasis is an intestinal disease caused by the protozoan *Giardia lamblia*. *G. lamblia* is an unicellular organism transmitted by contaminated water and food. In undeveloped countries giardiasis is associated to failure to thrive syndrome and traveler's diarrhea. Trophozoites grow in the small intestine and produce symptoms as diarrhea and malabsorption syndrome by intestinal damage. *G. lamblia* obtains energy mainly by glycolysis. Triosephosphate isomerase (TPI) is a glycolytic enzyme that allows the parasite to obtained energy as ATP. TPI gene has been used to characterize *G. lamblia* strains, and the enzyme has being proposed as target to design anti-giardiasis drugs. We characterized the TPI gene from *G. lamblia* strains isolated from mexican children, and the recombinant TPI of the mexican isolates was made. In order to propose the TPI from mexican isolates as a drug target, we compared the inhibitory effect of DTNB between mexican TPI and from that of the comertial strain WB.

Materials and methods. *G. lamblia* trophozoites were isolated from high intestinal endoscopy samples of mexican children with lactose malabsorption and confirmed giardiasis Genomic DNA isolation was performed from axenic cultures by phenol-chloroform method. TPI gene was amplified by the polymerase chain reaction and cloned in replication vector (pCR2.1). Positive clones containing TPI gene were sequenced and compared against the sequences in the GenBank. Identified sequences were subcloned in an over expression vector (pET3a). The

recombinant *G. lamblia* TPI (GITPI) was overexpressed and purified using ultracentrifugation and high performance liquid chromatography until 99% purity. Enzyme inactivation assays were performed on the GITPI and was compared with reports of inactivation of TPI from WB strain.

Results. We obtained two axenic *G. lamblia* strains INP-N001, N002. The TPI gene from both strains was identical; however, they were different to the gene from WB strain by six point mutations. Five mutations were silent and the sixth promotes an amino acid change (Thr253Ala). The enzyme activity from the recombinant and WB TPI was similar (3167 and 3967 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, respectively). Bis-nitrobenzoic acid (DTNB) inactivated recombinant TPI from WB and mexican isolates in the same way. Total enzyme inactivation was reached with 20 μM DTNB.

Conclusions. The gene and protein sequences from *G. lamblia* between TPI from mexican isolates and WB strain are different. Nevertheless, the compounds as DTNB can be used to inactivate both enzymes with similar efficient results.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Giardia lamblia (sinónimo de *G. duodenalis* y *G. intestinalis*) es un protozoo flagelado que infecta el intestino de prácticamente todos los vertebrados incluyendo al humano. Es el agente causal de la enfermedad denominada giardiasis, descrita por primera vez por Van Leeuwenhoek en 1681, quien observó al parásito en sus propias heces^{1,2}. La giardiasis se caracteriza por presentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas como diarrea³, la cual puede ser de evolución aguda ó crónica^{4,5} observándose náusea, vómito, dolor y distensión abdominal, flatulencia e intolerancia a disacáridos (específicamente lactosa). En niños puede causar síndrome de mala absorción⁶, hiporexia y detención del crecimiento. La giardiasis se transmite por agua y alimentos contaminados con los quistes del parásito^{7,8,9}, por lo que la infección predomina en países subdesarrollados donde se ha asociado a diarrea del viajero¹⁰. La población de riesgo son los niños, adultos entre 30 y 40 años así como viajeros e inmunocomprometidos^{11,12}.

La OMS reporta 200 millones de casos anuales a nivel mundial. La prevalencia en países subdesarrollados se ha documentado hasta del 30% en menores de 10 años¹³. En México, *G. lamblia* produce cerca del 19% de las

parasitosis debidas a protozoarios, siendo un problema recurrente ya que para el año 2002, por ejemplo, se reportaron 173,026 casos¹⁴.

El tratamiento propuesto para combatir la giardiasis es el metronidazol, un derivado del nitroimidazol, el cual sólo es efectivo en los trofozoitos y no en los quistes. Se ha observado un intervalo de eficiencia del tratamiento del 80 al 95%, con la desventaja de que tiene efectos adversos para el huésped y, además, existen reportes de cepas resistentes de *G. lamblia* al mismo¹⁵. Otros fármacos empleados para el tratamiento de la giardiasis, pero con rangos de curación mucho más bajos del 50 al 70%, son nitazoxanida¹⁶, furazolidona, tinidazol, albendazol, mebendazol, quinacrina y paramomicina^{11,15,17}. Sin embargo, ya existen cepas resistentes para todos estos fármacos¹⁸.

Se realizó un estudio en el Instituto Nacional de Pediatría (Protocolo número INP 03/056) donde se determinó la asociación de absorción intestinal deficiente de lactosa y parasitosis intestinal en 100 niñas mexicanas. Se les realizó coproparasitoscópico en serie de 3 para identificar los parásitos relacionados, así como test de hidrógeno exhalado para identificar a las pacientes con absorción intestinal deficiente de lactosa (intolerancia y malabsorción). Se encontró una asociación de absorción intestinal deficiente de lactosa y giardiasis del 8%. El tratamiento inicial que se administró fue nitazoxanida. Después del tratamiento persistieron los coproparasitoscópicos positivos para quistes de *G. lamblia* y el test de hidrógeno exhalado continuó positivo, por lo que se administró un segundo

tratamiento con metronidazol. Este último tratamiento indujo que tanto el coproparasitoscópico como el test de hidrógeno exhalado resultaran negativos¹⁹.

Todo lo anterior enfatiza la creciente necesidad de encontrar nuevos fármacos anti giardiásicos.

1.2 MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA DE *G. lamblia*.

G. lamblia es un protozoario, flagelado, binucleado, clasificado en el phylum Sarcomastigophora, clase Zoomastigophorea, orden Diplomonadida, familia Hexamitidae^{20,21}. La especie que provoca infección intestinal en el humano es *G. lamblia*, otras especies como *G. muris*, infectan a aves, mamíferos y reptiles; *G. agilis* infecta a anfibios^{22,23}.

El ciclo de vida del parásito consta de dos fases, una infectante que es el quiste y otra vegetativa que es el trofozoíto. El quiste es resistente a la desecación y al pH ácido del estómago; al ingerirse se desenquista a nivel del duodeno dando origen a 2 trofozoítos binucleados²⁴.

Los trofozoítos se instalan en el intestino delgado específicamente en el duodeno, en donde por fisión binaria se replican²⁵. En el yeyuno, por acción de las sales biliares se enquistan, excretándose en las heces y así completando así su ciclo de vida²⁶ (Figura 1).

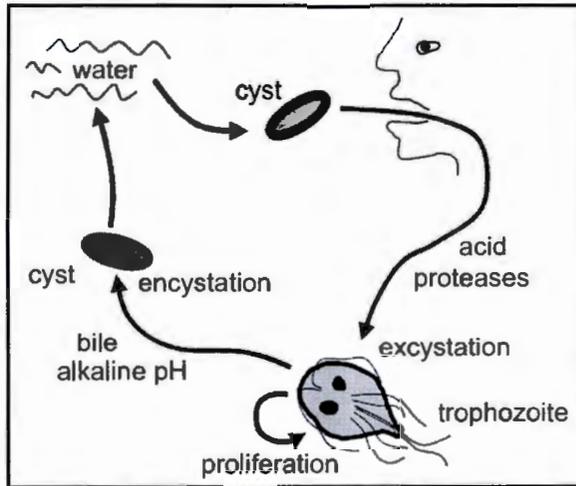


Figura 1. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*. Los quistes que contaminan agua y alimentos se ingieren por el ser humano en quien por estímulo del ácido del estómago se desenquistan en el intestino proximal. Los trofozoitos son móviles, proliferan en el intestino y se adhieren a la vellosidad intestinal. Algunos se enquistan nuevamente por efecto de las sales biliares y el pH alcalino, excretándose así por las heces completando su ciclo de vida²⁵.

El trofozoito mide de 10 a 12 μm de largo por 5 a 9 μm de ancho. Es binucleado con 4 pares de flagelos distribuidos en las regiones anterolateral, posterolateral, caudal y ventral. Posee un disco ventral por medio del cual se adhiere al epitelio intestinal del huésped²⁷ (Figura 2). El quiste de apariencia ovoide mide 5 por 8 μm , está rodeado por una pared gruesa compuesta de carbohidratos y proteínas que le confieren protección y resistencia a los cambios ambientales, ver figura 3²⁸.

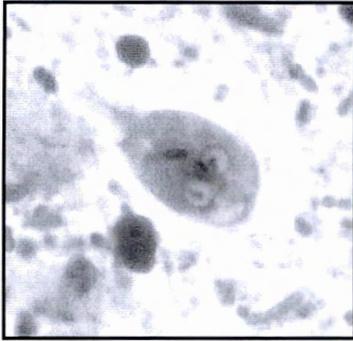


Figura 2. Trofozoito de *G. lamblia*. Mide de 10 a 12 μm de largo por 5 a 9 μm de ancho, es binucleado con 4 pares de flagelos.



Figura 3. Quiste de *Giardia*. Ovoide, mide 5 por 8 μm , rodeado por una pared gruesa que le confiere resistencia al medio ambiente.

1.3 METABOLISMO

G. lamblia es un organismo anaerobio (o microaerobio), se caracteriza por carecer de mitocondrias y en su lugar posee unas estructuras denominadas mitosomas, por lo que no presenta fosforilación oxidativa y basa su obtención de energía en la glucólisis²⁹. *Giardia* posee otras vías alternas de obtención de energía independiente de la vía glucolítica como la del metabolismo de la arginina, pero se ha demostrado que no es una fuente importante de producción de ATP para el parásito y que la glucólisis es la principal fuente de la misma^{30, 31}.

G. lamblia transforma la glucosa en piruvato a través de la glucólisis o vía de Embden-Meyerhof-Parnas, en donde se ven involucradas 10 reacciones

enzimáticas³² (Figura 4). Dichas enzimas se encuentran libres en el citosol del trofozoíto.

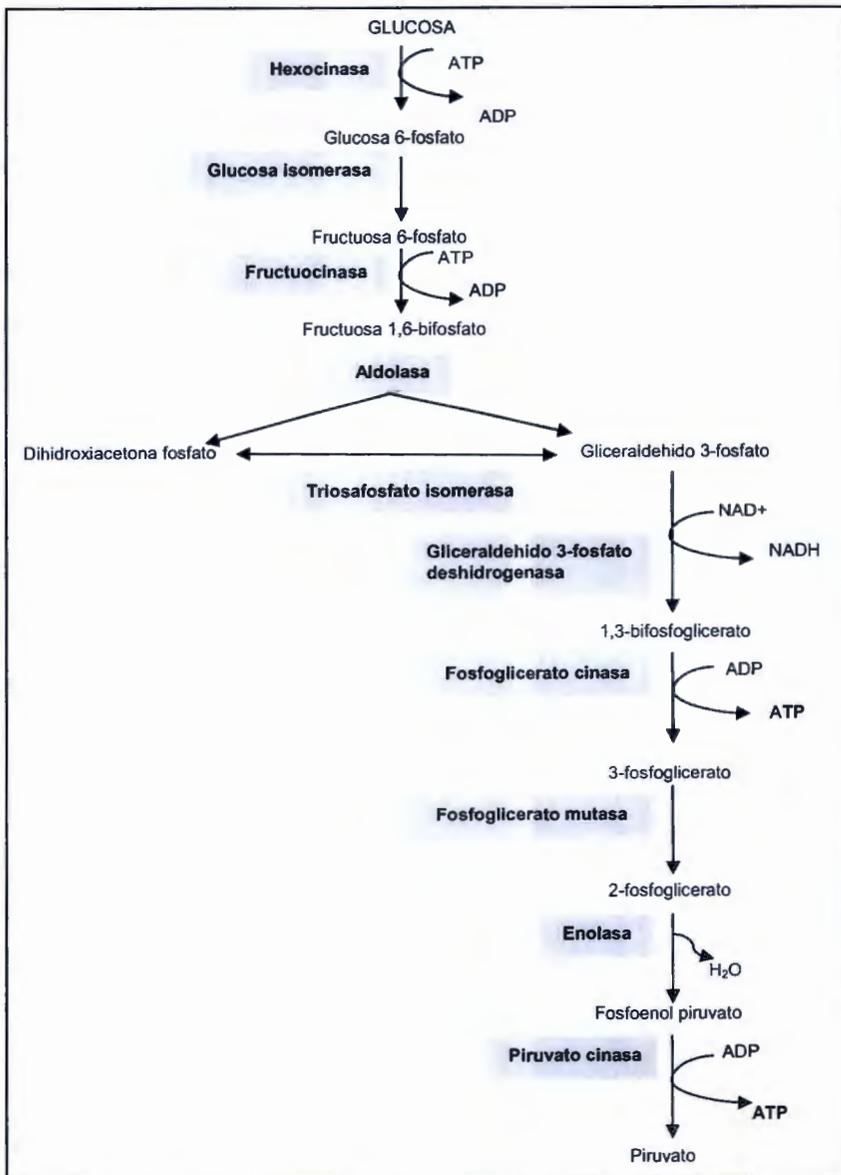


Figura 4. Pasos de la glucólisis de *G. lamblia* donde se muestran las diez enzimas involucradas en la misma.

1.4 ENZIMAS DE LA GLUCÓLISIS COMO BLANCO DE COMPUESTOS ANTIGIARDIÁSICOS

El apartado anterior sitúa a las enzimas de la vía glucolítica como blancos promisorios para el diseño de nuevos antiardiásicos. La triosafosfato isomerasa (TIM ó TPI), es una enzima clave en la vía glucolítica ya que cataliza la conversión de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a gliceraldehido 3-fosfato (GAP). Cada molécula de glucosa que entra en la vía consume 2 ATPs y genera 4 ATPs sólo en presencia de la TIM. Por cada molécula de GAP se generan 2 moléculas de ATP. En contra parte, la ausencia o inactivación de la TIM daría como resultado el consumo de glucosa sin ganancia de ATP.

1.4.1 Estructura de la TIM.

La TIM es una enzima codificada por un solo gen, formada por dos monómeros, cada monómero está compuesto por ocho hebras- β plegadas centrales, rodeadas por ocho hélices- α conectadas a través de asas. La presencia y distribución de las hebras- β y hélices- α representan un patrón de plegamiento conocido como barril TIM o dominio barril α/β ³³ (Figura 5).

Cada monómero contiene un sitio catalítico independiente localizado en la parte central del barril siendo una región muy conservada. Esta formado por los aminoácidos Lys 13, His 95 y Glu 168. Cabe mencionar que el monómero aislado

no es activo, por lo que se sugiere que el sitio de contacto entre los dos monómeros es importante para la funcionalidad de la enzima.

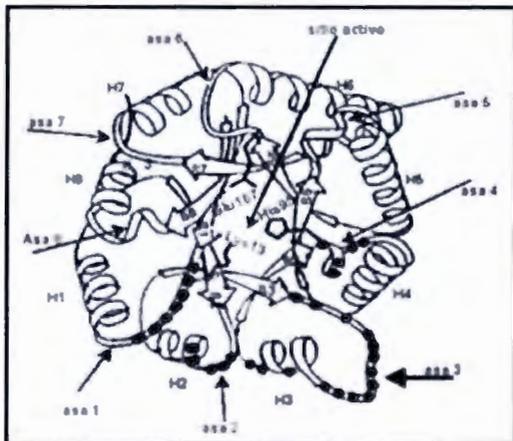


Figura 5. Estructura de la TIM (barril α/β). Se muestra el número y posición de las estructuras α -hélices y hojas β y se indica la posición y los aminoácidos que constituyen el sitio catalítico.

Por todo lo anterior, el grupo de López-Velázquez ha propuesto a esta enzima como un blanco para el diseño de fármacos anti-giardíasicos específicos de especie, además de caracterizar ampliamente a la TIM recombinante de *G. lamblia* (GITIM) determinando sus parámetros cinéticos y estructurales^{34,35}. Después de caracterizar la enzima recombinante, se probaron diferentes compuestos que inactivan a la GITIM determinando así, el mecanismo de inactivación enzimática mediante la modificación química de cisteínas (Cys). La GITIM contiene cinco Cys: Cys14, Cys127, Cys202, Cys222, Cys228, en las que se determinó la reactividad a agentes sulfhidrilo³⁶.

Todo lo anterior nos estimuló a iniciar la caracterización de la TIM de cepas de *G. lamblia* aisladas de niños mexicanos.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La giardiasis en la actualidad es un problema mundial que tiene importancia debido a la resistencia del parásito a los tratamientos convencionales. Diferentes grupos de investigación están diseñando nuevos fármacos y tratamientos alternativos para erradicar a *G. lamblia* sin resultados concluyentes^{37,38, 39}.

G. lamblia es anaerobio y por lo tanto basa la obtención de su energía principalmente en la glucólisis. Motivo por el cual se han propuesto a las enzimas de la glucólisis como blanco para el diseño de compuestos anti giardiásicos⁴⁰. Otros estudios con respecto a la inactivación de la TIM del parásito proponen un compuesto con efecto sobre la enzima, similar al observado con los agentes derivatizantes de cisteínas. Este compuesto presenta un efecto citotóxico y por lo tanto muerte celular; su mecanismo aún no está bien definido⁴¹.

En un estudio realizado en el INP en niños mexicanos infectados por *G. lamblia*¹⁹ se observó resistencia a los tratamientos convencionales siendo necesaria la administración de dos esquemas de manejo. A partir de estas cepas resistentes se decidió obtener la TIM para caracterizarla y comparar su susceptibilidad a la inactivación por DTNB con la de la cepa comercial WB. Si las

susceptibilidad al DTNB es equivalente entre las enzimas de ambas cepas, entonces la TIM de las cepas mexicanas puede considerarse fuertemente como blanco para el diseño de fármacos específicos de especie. Por lo que en un primer estudio se inició la caracterización de la TIM de dichas cepas planteándonos las siguientes preguntas de investigación.

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Las cepas aisladas de *G. lamblia* obtenidas en el INP son genéticamente iguales a las de referencia WB con respecto al gen de GITIM?

¿La actividad enzimática de GITIM de estas cepas es diferente a la de GITIM de la cepa WB?

¿El porcentaje de inactivación por agentes derivatizantes de cisteínas (Cys) en GITIM de la cepa WB es semejante en la GITIM de cepas mexicanas?

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia que tiene la giardiasis a nivel mundial y en nuestro país, así como la resistencia del parásito a los tratamientos convencionales, surge la necesidad de identificar nuevos blancos en el parásito para el diseño de fármacos que induzcan muerte celular de manera selectiva y eficiente.

Como un primer estudio se caracterizará la GITIM de las cepas aisladas de niños mexicanos para determinar si son genéticamente iguales a la de referencia (WB, Afganistán) y determinar si el DTNB utilizado *in vitro* para inactivar la GITIM de la cepa de referencia tiene la misma efectividad para inactivar a la GITIM recombinante de las cepas mexicanas.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GENERALES

- Demostrar si las características del gen de la TIM de las cepas de *G.lambliá* presentes en los niños mexicanos que asisten al Instituto Nacional de Pediatría son iguales a las de la cepa WB (referencia).
- Generar una GITIM recombinante de las cepas aisladas que exhiban cambios en la secuencia primaria de esta enzima y determinar su actividad enzimática.
- Determinar el efecto del DTNB (ácido 5, 5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico) en la GITIM recombinante de cepas mexicanas.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener cultivos axénicos de cepas de *G. lambliá* que infectan a niños mexicanos.
- Obtención de ADN genómico de cepas aisladas.
- A partir de ADN genómico amplificar por PCR el gen de la TIM de *G. lambliá* .
- Clonar el gen de la TIM en el vector de replicación pCR2.1.
- Secuenciar el gen de la TIM.
- Búsqueda en la base de datos (GenBank) y comparación por alineamiento del ADN de la TIM de las cepas aisladas.
- Subclonar al vector de expresión pET3a.
- Sobreexpresar la proteína en la cepa de *Escherichia coli* BL21DE3pLysS y purificación de la enzima recombinante.
- Determinar la actividad de la enzima recombinante.
- Analizar el efecto del agente derivatizante DTNB.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Tipo y diseño del estudio.

De acuerdo a la finalidad es un estudio analítico; de acuerdo a la secuencia temporal es transversal; de acuerdo a la asignación de variables es descriptivo, y de acuerdo a la direccionalidad es prospectivo.

6.2 Selección de pacientes.

A partir de un grupo de 137 niñas mexicanas de entre 6 y 18 años de edad, se seleccionaron a aquellas que presentaron las siguientes características:

a) Absorción intestinal deficiente de lactosa, lo cual se determinó mediante la prueba de hidrógeno en aire espirado (se administró una carga de lactosa a 1g/kg/dosis con dosis máxima de 50g y se realizó la medición de hidrógeno en aire espirado con un equipo Gastrolyzer)

b) Corroboración de la infección por *G. lamblia* mediante coproparasitológico seriado (se realizó la técnica Faust) y observación directa de trofozoítos por microscopía de luz del líquido y biopsia duodenales en buffer de fosfato salino (PBS: NaCl 650mg, K₂HPO₄ 280mg, KH₂PO₄ 40mg, aforados en 100mL, pH 7.2). El líquido y biopsia duodenales se obtuvieron por aspiración mediante endoscopia alta con videopanendoscopia, bajo anestesia general inducida, previo consentimiento informado del tutor.

6.3 Obtención de cultivos axénicos.

De los aspirados de líquido y biopsia duodenales positivos, se generaron cultivos axénicos de los trofozoítos en medio de TYI-S33⁴² (Tabla 1), previamente esterilizado por filtración en una unidad de filtrado con poros de 0.45µm y 0.22 µm en campana de flujo laminar.

Tabla 1. Medio de cultivo para *G. lamblia* TYI-S33

NaCl	2g
K ₂ HPO ₄	1g
KH ₂ PO ₄	0.6g
D-glucosa	10g
Biosate	30g
L-cisteína	2g
L-ácido ascórbico	0.2g
Citrato de amonio férrico	0.228g
Bilis bovina	0.8g
Suero fetal bovino	10%
Antibiótico (5µg/mL)	250µL
Ampicilina/Estreptomicina	

Aforado a 1L y a pH 7.2

6.4 Obtención de ADN genómico de trofozoítos.

A partir de tubos de 7mL de cultivos axénicos de trofozoítos de *G. lamblia*, se aisló y purificó ADN genómico de los mismos mediante el método de fenol-cloroformo de acuerdo al siguiente protocolo.

6.4.1 Lisis celular.

Dos tubos de cultivo de trofozoítos se centrifugaron a 1500rpm durante 10min a 25°C,, el sobrenadante se desechó con pipeta Pasteur sin resuspender el botón.

Se agregaron 2mL de PBS y se centrifugó a 1500rpm durante 10min a 25°C, el sobrenadante se eliminó como en el paso anterior.

Posteriormente se agregó a cada tubo 2mL de buffer de lisis WCLB (1mL de TRIS 1M a pH 7.6, 1mL de EDTA 1M a pH 8, 5mL de NaCl 1M, SDS 0.2g, Proteinasa K 0.02g, aforados a 100mL y filtrado con filtros de 0.22 µm). Se incubó toda la noche en agitación a 37°C.

6.4.2 Extracción de ADN.

A los tubos se les agregó un volumen de fenol saturado (el volumen equivalente al volumen de buffer de lisis previamente adicionado); se agitaron suavemente por inversión durante 5 minutos y se centrifugaron a 3000 rpm 10 minutos. La fase superior se pasó a un tubo limpio sin tocar la interfase. Se repitió la extracción con un volumen de fenol.

La fase superior se pasó a un tubo limpio sin tocar la interfase. Se extrajo con igual volumen de fenol/cloroformo (V/V), se agitó 5 minutos y se centrifugó 10 min a 3000 rpm.

La extracción se repitió con fenol/cloroformo y la fase superior se pasó a un tubo limpio. Se extrajo con igual volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (29/1), se agitó 5 minutos y se centrifugó a 3000 rpm por diez minutos; este paso se repitió hasta que dejó de aparecer la interfaz.

6.4.3 Precipitación de ADN.

La fase superior se tomó y se le agregó 60µl de NaCl 1N ó 20µl 5M (se agita suavemente). Posteriormente se agregó etanol absoluto -20°C (2-3 volúmenes). Se agitó suavemente hasta que flotó el ADN. La muestra se guardó a -70°C por 24 horas. Al término de la incubación, la muestra se colocó en un tubo eppendorf y se centrifugó un minuto a 12000 rpm, el sobrenadante se desechó. El botón se secó durante 10 minutos en estufa a 36°C, se agregó 100µl de TBE (TRIS 10.8 g, ácido bórico 5.5 g, 4 ml de EDTA 0.5M, pH 8.0) y el botón (ADN) se resuspendió (se mezcló en vortex).

La muestra se corrió electroforéticamente en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio; la corrida se realizó a 120V durante 40min. Posteriormente, el gel se analizó con luz UV para corroborar la presencia del ADN genómico. El ADN genómico se conservó a -4°C.

6.5 Amplificación por PCR del gen de la TIM de *G. lamblia*.

EL ADN genómico obtenido se utilizó como molde para amplificar por PCR el gen de la TIM. Se utilizó una Taq polimerasa, AccuPrime *Pfx* DNA Polymerase marca Invitrogen y los primers que contenían los sitios de restricción Nde1 (contenido en el extremo 5' del gen) y BamH1 (contenido en el extremo 3' del gen) (figuras 6 y 7)

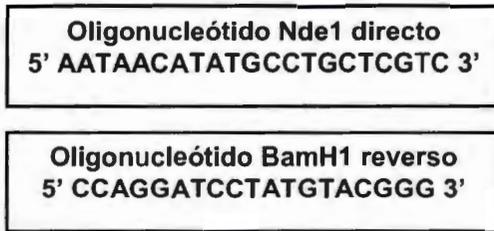


Figura 6. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR del gen de la TIM.

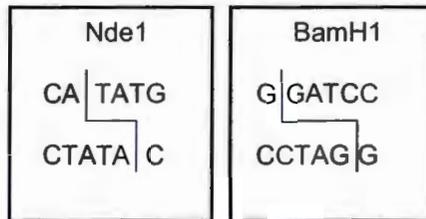


Figura 7. Sitios de corte que reconocen las enzimas de restricción Nde1 y BamH1.

El ensayo de PCR consistió en tres pasos: desnaturalización, alineamiento y elongación ver Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones para la amplificación por PCR del gen de GITIM

PASOS	TIEMPO (MIN)	TEMP °C	No. CICLOS
Desnaturalización	4	94	1
Desnaturalización	0.5	94	30
Alineamiento	0.5	60	30
Elongación	1	68	30
Elongación final	10	68	1

El peso molecular esperado del producto PCR obtenido se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

El producto amplificado se purificó mediante un kit a partir de geles de agarosa (marca promega).

6.6 Clonación en vector de replicación pCR 2.1.

6.6.1 Características del vector de replicación pCR 2.1.

El producto de PCR obtenido se clonó en el vector de replicación pCR 2.1 (TA cloning kit de Invitrogen), este es un vector lineal que en sus extremos 5' y 3' contiene residuos de desoxitimidina (T) lo cual permite clonar fácilmente productos de PCR que en sus extremos 5' y 3' contengan residuos de desoxiadenina (A). Otra de sus características es que contiene el promotor LacZ que permite la

expresión de la β -galactosidasa que da como resultados colonias azules (vector religado), la presencia de colonias blancas indica una interrupción del promotor LacZ por la presencia del producto de PCR clonado.

Otra característica es que tiene dos sitios de restricción EcoR1 que flanquean el sitio de clonación lo que permite realizar un análisis de restricción rápido para confirmar la presencia del gen clonado (Figura 8).

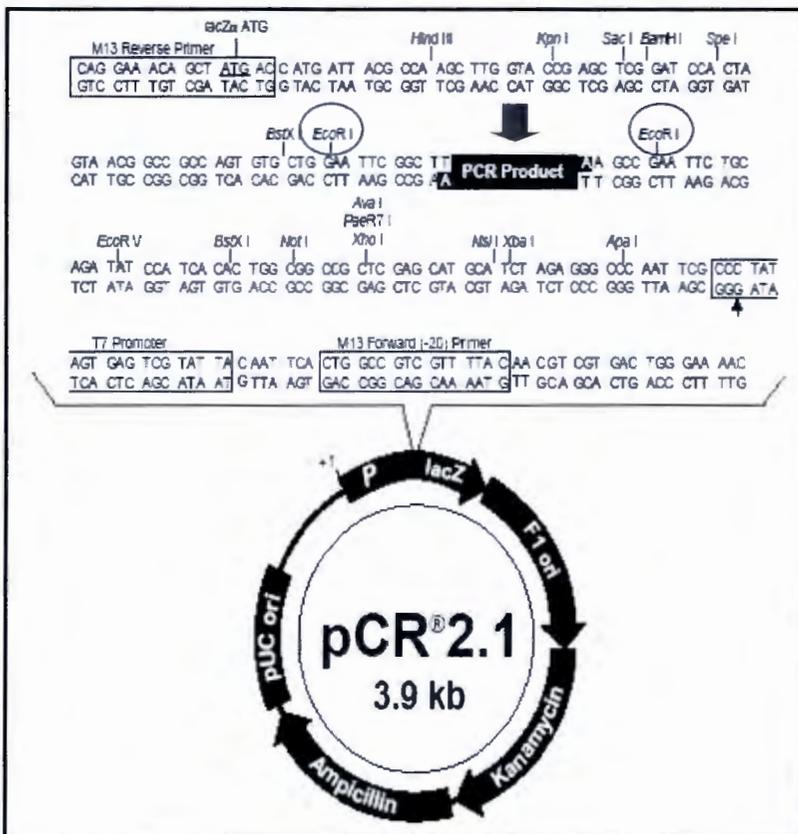


Figura 8. Características del vector de replicación pCR2.1. Se señalan con un círculo los sitios de restricción con la enzima EcoR1. La flecha indica el sitio de clonación.

La obtención de clonas consta de dos pasos: ligación y transformación. Estos se describen a continuación.

6.6.2 Ligación.

Consiste en la inserción de un gen o fragmento de ADN en un vector (de replicación ó de sobreexpresión) mediante una T4DNA ligasa. Una vez obtenido el producto de PCR fresco, se procedió a la ligación incubando a 17°C toda la noche (ver Tabla 3).

Tabla 3. Reacción de ligación en el vector pCR 2.1

COMPUESTO	VOLUMEN μ l
Producto de PCR	16.5
Buffer de ligación 10X	2
Vector pCR 2.1 (1 μ g)	1
T4 DNA ligasa (5U)	0.5

6.6.3 Transformación.

Este proceso implica la introducción del vector de replicación en bacterias que lo incorporen y lo repliquen. Se realizó en bacterias competentes *E. coli* Top10, conservadas a -70°C. Las bacterias competentes se descongelaron en hielo durante 15 minutos. En un ambiente estéril (con mechero), se pasaron 30 μ l

de bacterias a un tubo eppendorf estéril de 1.5ml, se agregaron 10µl de la ligación y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se indujo un choque térmico por tres minutos a 37°C ó a temperatura ambiente. Se agregaron 500µl de medio LB (Luria Bertani) sin ampicilina y previamente atemperado, se incubó a 30 minutos a 37°C o temperatura ambiente en agitación. Se centrifugaron de 2-3 minutos a 12000 rpm, el sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en 40µl de LB sin ampicilina. Las bacterias se sembraron en caja petri con medio LB con ampicilina (100 µg/mL), se incubaron toda la noche a 37°C.

6.7 Purificación de ADN del vector a partir de bacterias.

Después de verificar el crecimiento de las bacterias, a las colonias blancas se les extrajo el ADN con el protocolo de purificación de plásmido Rapid Plasmid Miniprep System (Marligen Bioscience). Se realizó un análisis de restricción con la enzima EcoR1. La digestión se analizó en un gel de agarosa al 1% para confirmar la clonación del gen. Una vez confirmada la colonia positiva se aisló y posteriormente se purificó el ADN para su secuenciación.

6.8 Secuenciación del gen.

El gen clonado se secuenció mediante un sistema automatizado basado en el método enzimático de secuenciación en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

6.9 Comparación por alineamiento del gen de la TIM obtenido con la base de datos.

La secuencia obtenida se comparó con la secuencia de referencia WB y al mismo tiempo se hizo la búsqueda “*in silico*” (BLAST) contra las bases de datos de genes existentes.

6.10 Subclonación al vector de expresión pET3a.

El gen de TIM clonado en pCR2.1 se subclonó en el vector de sobreexpresión pET3a (Figura 9), el cual funciona como un sistema de clonación y expresión de proteínas en células de *E. coli*. Se realizó la restricción del gen clonado con las enzimas Nde1 y BamH1. La digestión se realizó en horno de microondas por cinco ciclos de 20 segundos con intervalos de dos minutos. Se corrió en un gel de agarosa al 1% para corroborar la liberación del inserto del peso esperado. Posteriormente se purificó el ADN mediante un kit comercial (Gibco). Al mismo tiempo se realizó una digestión con Nde1 y BamH1 del vector pET3a.

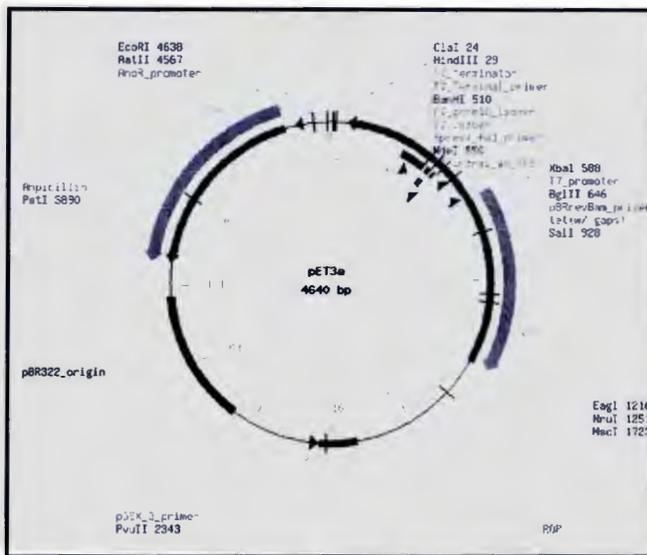


Figura 9. Vector de expresión pET3a con los sitios de restricción Nde1 y BamH1.

Los fragmentos del gen digeridos se clonaron al vector pET3a en los sitios Nde1 y BamH1 siguiendo protocolo de ligación anterior. Se transformaron células competentes *E. coli* BL21DE3pLysS con la ligación. Se obtuvieron colonias y se les realizó una digestión con las enzimas de restricción Nde1 y BamH1 para confirmar la presencia del gen.

6.11 Sobreexpresión en la cepa BL21DE3pLysS y purificación de la enzima recombinante.

6.11.1 Características de la cepa de *E. coli* BL21DE3pLysS.

Este sistema de expresión se ha desarrollado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* y consiste en un vector pET3a y una bacteria huésped (cepa BL21DE3pLysS de *E. coli*).

Los genes blanco se clonan en el vector pET3a, que contiene un sitio de clonación múltiple, resistencia a ampicilina y un promotor del bacteriófago T7 (T7 promoter). El pET3a se transforma en la cepa BL21DE3pLysS, que contiene una copia cromosómica del gen de la RNA polimerasa del fago T7. El gen de la RNA polimerasa del fago T7 se encuentra bajo el control del promotor LacUV5, que a su vez es inducido por isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Esta cepa además contiene un vector pLysS que codifica para la lisozima del fago T7. La producción de la lisozima por parte de la cepa, permite que la pared celular sea digerida por ésta y sea mucho más sencillo romper las células^{43,44}.

6.11.2 Sobreexpresión de la enzima.

Para la expresión de la enzima se realizó un precultivo de células BL21DE3pLysS que contenían el gen, en 5mL de medio LB con 100 μ m/mL de ampicilina, incubadas toda la noche a 37°C en agitación. Posteriormente se centrifugaron y el botón se resuspendió en medio LB nuevo.

Una vez realizado lo anterior, se tomó una alícuota del precultivo y se sembraron en 500mL de medio LB hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.1. Las bacterias se incubaron a 37°C con agitación hasta alcanzar una D.O._{600 nm} de 0.6 (esto permite obtener un cultivo que se encuentra en la fase logarítmica de crecimiento para lograr una mayor inducción). Posteriormente, se agregó el inductor IPTG a una concentración final de 0.4mM, se incubó toda la noche a 30°C en agitación. Una vez realizado lo anterior, las células se centrifugaron a 5000 rpm/10min a 4°C. El botón resultante se resuspendió en 20mL de buffer de lisis (50mM de TRIS, 1mM de EDTA, 0.2mM PMSF, 100mM de fosfatos, a pH 7.9).

Las bacterias se rompieron por sonicación en frío (cinco ciclos de 45seg con intervalos de 75seg) y se centrifugaron a 45,000 rpm/1h a 4°C. El sobrenadante de la ultracentrifugación se precipitó con sulfato de amonio hasta el 45% de saturación y se incubó tres horas a 4°C. Esta suspensión se centrifugó a 9,000 rpm/30min a 4°C. El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio hasta el 75% a 4°C toda la noche. Se centrifugó a 9,000 rpm/30 min a 4°C. El botón se resuspendió en 10mL de buffer con 10mM de TRIS, 1mM de EDTA a pH 8.7. El extracto se dializa extensivamente contra ese mismo buffer a 4°C. La muestra se concentró a un volumen de 2mL y se pasó por filtros de 0.45µm de diámetro de poro. La muestra se aplicó a una columna Q-Sepharosa (1.5x12cm) (intercambio aniónico) equilibrada con el mismo buffer. La enzima se eluyó con un gradiente de NaCl de 0 a 100mM, con una velocidad de flujo de 3mL/min. La elución de la enzima se monitoreó por su señal de absorbencia a 280 nm. Se colectaron fracciones de 2.5mL. Las fracciones enriquecidas con la enzima fueron

seleccionadas y concentradas por ultrafiltración hasta 2 mL utilizando filtros con corte de paso de 10,000 de peso molecular. La muestra se aplicó a una columna de Superdex-75 (1.6 x 60 cm) (exclusión molecular) previamente equilibrada con un buffer conteniendo 50 mM de TRIS, 150 mM de Na₂HPO₄, 100 mM de NaCl y 1.5 mM de Na₂N₃, pH 8. La enzima se eluyó a una velocidad de flujo de 1 mL/min y su elusión se monitoreó por su señal de absorbencia a 280 nm. Se colectaron fracciones de 1.25 mL. Las fracciones enriquecidas con la enzima se concentraron. Durante todo el proceso de purificación, la calidad y cantidad de la proteína se monitoreó por actividad enzimática y por geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y se mantuvo bajo atmósfera de nitrógeno (N₂). La proteína purificada se le llamó GITIM INP.

6.12 Determinación de la actividad enzimática.

La actividad de la enzima se determinó mediante un ensayo acoplado en la dirección gliceraldehído-3-fosfato (GAP) hacia dihidroxiacetona fosfato (DHAP).

La reacción se llevó acabo en un ensayo acoplado, el cual contenía 100mM de trietanolamina, 10mM de EDTA, pH 7.4 (buffer TE), 1mM de GAP, 0.2mM de NADH y 0.9 U de α -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (α GDH) por cada mililitro de mezcla de reacción³⁴.

La actividad enzimática se siguió espectrofotometricamente por la disminución de la absorbancia del NADH a 340nm, a una temperatura de 25°C. La

reacción se inició al agregar la enzima utilizándose una concentración de proteína para los ensayos de 5ng/mL.

6.13 Ensayos de derivatización con DTNB.

Se realizaron experimentos de inactivación con DTNB (ácido 5, 5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico) para la enzima GITIM INP y como control GITIM⁴⁰. Los experimentos se realizaron incubando 0.2 mg/mL de proteína en buffer TE, con diferentes concentraciones del derivatizante durante 2 hrs a 25°C. La actividad residual se determinó con 5 ng/mL de proteína.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis genético.

Se realizó la prueba de hidrogeno en aire espirado y coproparasitológico seriado a 137 niños mexicanos entre 6 y 18 años de edad, todos del sexo femenino, identificándose a 8 pacientes con absorción intestinal deficiente de lactosa e infección por *G. lamblia*, los cuales se sometieron a endoscopia alta, con toma de aspirado de líquido y biopsia duodenal¹⁹.

De la biopsia duodenal se aislaron dos cepas de las cuales se obtuvieron cultivos axénicos, denominados INP-N001 e INP-N002. Se aisló el ADN genómico de estas cepas y su integridad se muestra en los geles de agarosa (Figura 10).

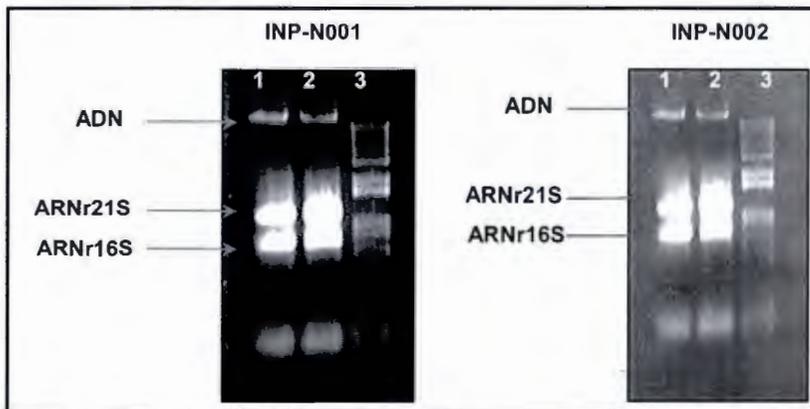


Figura 10. ADN genómico de INP-N001 y 002. En los carriles 1 y 2 se señalan con flechas el ADN genómico, así como el ARNr en sus dos fracciones. El carril tres es el marcador de peso molecular (1kb plus DNA ladder de Invitrogen).

De ambas cepas se amplificó por PCR el gen de la TIM de *G. lamblia* (Fig. 11) y éste se clono en el vector de replicación pCR2.1 y se secuenciaron los ADN's. El análisis de ambos genes mostró que eran idénticos entre ellos por lo que para los siguientes análisis se tomó sólo uno. Posteriormente la secuencia de ADN (INP-N002) se comparó con la secuencia control del gen reportado para la cepa WB (GITIM) Figura 12.

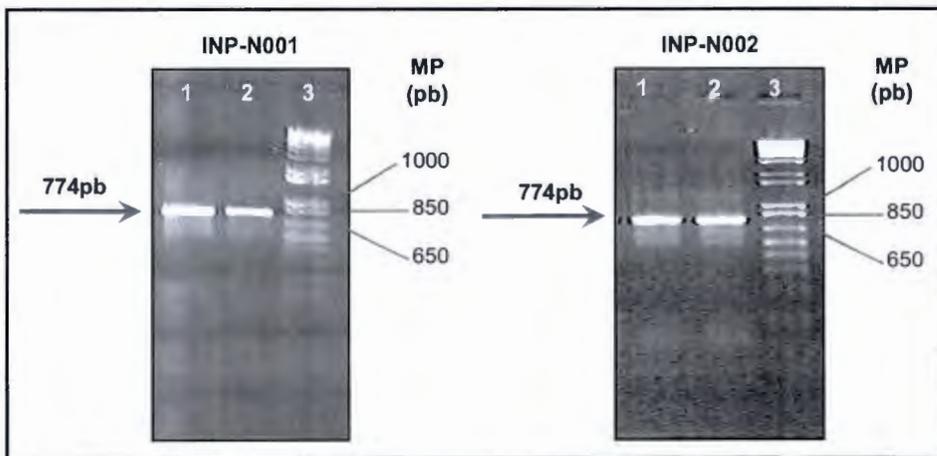


Figura 11. Producto de PCR obtenido a partir del ADN genómico de INP-N001 y 002. Los carriles 1 y 2 corresponden al fragmento de PCR esperado para GITIM (774 pb). El carril 3 es el marcador de peso molecular (MP) (1kb plus DNA ladder de Invitrogen).

Este análisis demostró que ambas cepas difieren de la cepa control (WB) por 6 mutaciones puntuales en los nucleótidos 15, 129, 402, 570, 678, 760. Cinco de ellas fueron mutaciones silenciosas (nucleótidos 15, 129, 402, 570 y 678) y en el nucleótido 760 se promovió un cambio de aminoácido (ACG=Treonina por GCG=Alanina) figura 12.

INPN002, WB,	1 ATGCCTGCTCGT CGT CCCTTCATCGGCGGTAACCTCAAGTGTAAACGGCTCTCTTGACTTT 1 ATGCCTGCTCGT CGC CCCTTCATCGGCGGTAACCTCAAGTGTAAACGGCTCTCTTGACTTT
INPN002, WB,	61 ATCAAGAGCCACGTGGCGGCAATTGCTGCCATAAGATCCCTGATTCCGTGGACGTCGTC 61 ATCAAGAGCCACGTGGCGGCAATTGCTGCCATAAGATCCCTGATTCCGTGGACGTCGTC
INPN002, WB,	121 ATTGC CCG TCCGCCGTACACCTGTCAACAGCCATTGCGGGCAAACACGTCAAAACAGTTG 121 ATTGC CCT TCCGCCGTACACCTGTCAACAGCCATTGCGGGCAAACACGTCAAAACAGTTG
INPN002, WB,	181 AGGATAGCAGCGCAGAATGTGTACCTAGAGGGGAACGGGGCGTGGACTGGCGAGACAAGT 181 AGGATAGCAGCGCAGAATGTGTACCTAGAGGGGAACGGGGCGTGGACTGGCGAGACAAGT
INPN002, WB,	241 GTTGAGATGCTTCAGGACATGGGTTTGAAGCATGTGATAGTAGGGCACTCTGAAAGACGC 241 GTTGAGATGCTTCAGGACATGGGTTTGAAGCATGTGATAGTAGGGCACTCTGAAAGACGC
INPN002, WB,	301 AGAATCATGGGGGAGACCCGACGAGCAAAGCGCCAAGAAGGCTAAGCGTGCCCTGGAAAAG 301 AGAATCATGGGGGAGACCCGACGAGCAAAGCGCCAAGAAGGCTAAGCGTGCCCTGGAAAAG
INPN002, WB,	361 GGGATGACGGTCACTTCTCGTCTGGAGAGACCTT GAT GAGCGCAAGGCCAACCGCACCC 361 GGGATGACGGTCACTTCTCGTCTGGAGAGACCTT GAC GAGCGCAAGGCCAACCGCACCC
INPN002, WB,	421 ATGGAGGTGAACATCGCCCAGCTTGAGGCGCTTGGCAAGGAGCTCGGAGAGTCCAAGATG 421 ATGGAGGTGAACATCGCCCAGCTTGAGGCGCTTGGCAAGGAGCTCGGAGAGTCCAAGATG
INPN002, WB,	481 CTCTGGAAGGAGGTTGTCAATTGCTTACGAGCCCGTGTGGTCCATTGGCACGGGCGTGGTG 481 CTCTGGAAGGAGGTTGTCAATTGCTTACGAGCCCGTGTGGTCCATTGGCACGGGCGTGGTG
INPN002, WB,	541 GCCACGCCCGAGCAGGCAGAGGAG GTA CATGTGGGGTCCGAAAGTGGTTTTCGGAGAAG 541 GCCACGCCCGAGCAGGCAGAGGAG GTC CATGTGGGGTCCGAAAGTGGTTTTCGGAGAAG
INPN002, WB,	601 GTTTGTGCCGAGGGCGCACAGCATATCCGTATCATTACGGGGGATCGGCCAATGGAAGC 601 GTTTGTGCCGAGGGCGCACAGCATATCCGTATCATTACGGGGGATCGGCCAATGGAAGC
INPN002, WB,	661 AACTGCGAGAAG CTG GGCCAGTGTCCGAATATTGACGGCTTCTTGTCCGGTGGCGCTTCC 661 AACTGCGAGAAG CTT GGCCAGTGTCCGAATATTGACGGCTTCTTGTCCGGTGGCGCTTCC
INPN002, WB,	721 CTCAAGCCGGAGTTTATGACGATGATCGACATTCTT GCG AAGACCCGTACATAG 721 CTCAAGCCGGAGTTTATGACGATGATCGACATTCTT ACG AAGACCCGTACATAG

Figura 12. Alineamiento del gen de la TIM de la cepa INP vs el gen de la TIM de la cepa WB. Los recuadros muestran las cinco mutaciones silenciosas: el codón CGT ó CGC=Arginina, CCC ó CCT=Prolina, GAT ó GAC=Ácido aspártico, GTA ó GTC=Valina, CTC ó CTT=Leucina, y la última mutación que promueve un cambio de aminoácido en el codón ACG=Treonina por GCG=Alanina.

Otro de los análisis realizados fue con el programa BLAST (programa informático de alineamiento de secuencias de tipo global, ya sea de ADN o de proteínas) del gen de la TIM obtenido (INP) con la base de datos del GenBank (es la base de datos de secuencias genéticas de disponibilidad pública del NIH

(National Institutes of Health de USA)). Este análisis nos mostró la existencia de 28 variantes del gen de la TIM ya reportadas. De las cuales la variante con el número de referencia U57897 coincide con el gen de la TIM de las cepas aisladas (INP-002 y 001) en un 100%⁴⁵. No se encontró mayor información sobre la caracterización del gen de esta variante, únicamente se encontró el gen reportado.

7.2 Análisis funcional y estructural.

Una vez obtenido el gen de la TIM de la cepa INP-N002 se procedió a purificar la proteína (la secuencia de INP001 y 002 fueron idénticas). La proteína se purificó siguiendo el protocolo ya reportado³⁴ y la cinética fue similar a la descrita para la WB. En la figura 13 se muestra un gel de poliacrilamida que muestra los pasos de purificación. Por electroforesis se comparó la proteína INP-002 con GITIM de WB. Ambas enzimas muestran tener el mismo peso molecular como monómero (27 kDa) y forman puentes disulfuro mostrando una banda que corresponde al peso esperado para un dímero (54 kDa)^{34,35}. El grado de pureza obtenido fue mayor al 95% figura 14.

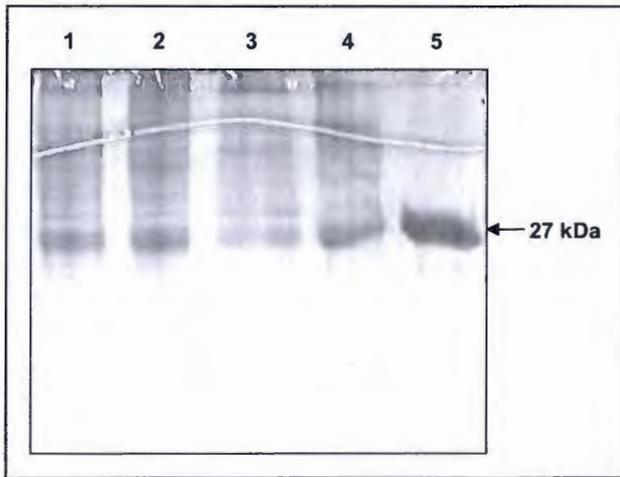


Figura 13. Proceso de purificación monitoreado por geles de poliacrilamida, donde el carril 1 corresponde al lisado de células *E. coli* transformadas, el 2 al sobrenadante, el 3 es el botón del lisado, el carril 4 es la proteína antes de cargarla a la columna, el carril 5 es un control de GITIM. Se cargaron 10 μ g de proteína total.

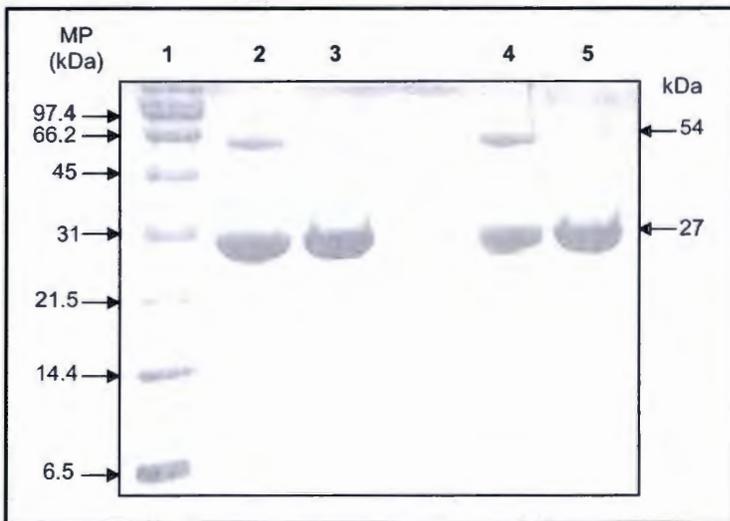


Figura 14. Gel de poliacrilamida donde se muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular (en kDa). Los carriles 2 y 4 corresponden a la GITIM-INP y GITIM de WB respectivamente sin DTT (agente reductor) y los carriles 3 y 5 corresponden a la GITIM-INP y GITIM de WB respectivamente con DTT. Del lado derecho se señalan con flechas los pesos en kDa que corresponden al dímero (54kDa) y monómero (27kDa).

Para determinar la actividad enzimática de la GITIM-INP se comparó con la actividad de una control de GITIM WB (mutante C202A con características cinéticas iguales a la silvestre), resultando ser de 3167 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ y 3967 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ respectivamente. Este resultado nos indica que la mutación con el cambio de aminoácido de GITIM-INP (T253A) no afecta su actividad, ya que es muy similar al control de referencia WB. Se generó una imagen de la estructura terciaria de la proteína con el programa VMD⁴⁶ (programa de visualización molecular) para localizar la posición de la mutación. En la figura 15 se observa que esta mutación está localizada hacia la parte externa del barril TIM.



Figura 15. Representación en listones del monómero de GITIM-INP. Apartir de las coordenadas cristalográficas de la GITIM C202A (PDB ID 2DP3), se generó por mutación *in silico* un cambio en T253A. La imagen se generó utilizando el programa VMD⁴⁶.

En estudios previos de GITIM con agentes derivatizantes de cisteínas (como el DTNB) se ha demostrado que éste promueve su inactivación. GITIM presenta 5 residuos de cisteínas, localizadas en las posiciones 14, 127, 202, 222, 228, por lo que ha sido posible evaluar el efecto de estos compuestos sobre la actividad de la enzima. A pesar de que GITIM-INP presenta los mismos residuos de cisteínas que GITIM, se decidió realizar los ensayos con derivatizantes para determinar su efecto. En los ensayos de derivatización se utilizaron distintas concentraciones del DTNB y como control se tomó a la GITIM.

En la figura 16 se muestra el porcentaje de actividad residual contra concentraciones ascendentes del derivatizante (DTNB). El DTNB inactiva al 100% a las dos enzimas a concentraciones mayores de 20 μ M, por lo que resulta en un efecto equivalente entre ambas enzimas.

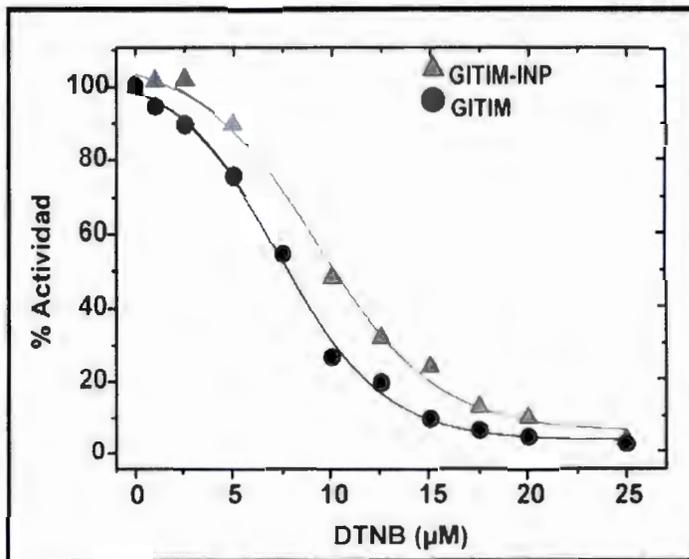


Figura 16. Gráfica que muestra el efecto inhibitorio del DTNB (derivatizante) sobre la GITIM-INP y GITIM WB.

8. Discusión.

Para la obtención de las cepas de *G. lamblia* se le dio seguimiento a un estudio previo realizado por Ruíz-Castillo y cols.¹⁹, quienes realizaron la prueba de hidrogeno en aire espirado y coproparasitoscópico a las habitantes de una casa hogar para mujeres. A las niñas infectadas por *G. lamblia* se les realizó endoscopia alta. Tomamos el líquido y biopsia duodenal de las pacientes infectadas, de los cuales aislamos dos cepas de *G. lamblia*. Considerando los estudios por López-Velázquez y cols.³⁴, en donde se sugiere a las enzimas de la glucólisis como blanco para el diseño de compuestos anti-giardíasicos y, específicamente a la GITIM, se decidió caracterizar el gen de la TIM de las cepas obtenidas y compararlo con el control (cepa WB). Decidimos determinar si las características con respecto al gen de la TIM de las cepas obtenidas de niños mexicanos infectados con *G. lamblia* diferían del gen de la cepa WB proveniente de Afganistán.

Una vez corroborado y obtenido el gen de la TIM, al que denominamos INP-N001 y 002, se secuenciaron. El análisis y comparación de estas secuencias nos mostraron ser idénticas entre ellas. Esto se podría explicar ya que los pacientes de los cuales se obtuvieron las muestras cumplían con la condición de hacinamiento (casa hogar). Sin embargo, difieren con respecto al gen de la TIM de la cepa WB.

De las seis mutaciones encontradas en el gen de GITIM, cinco fueron mutaciones puntuales y sólo una promovió el cambio de un aminoácido (Thr253Ala). Sin embargo esta mutación no promueve diferencias en cuanto a la actividad enzimática y al efecto de los agentes derivatizantes de Cys en la enzima recombinante con respecto a lo ya reportado para la enzima de la cepa WB.

9. Conclusión.

El gen y la secuencia de los aislados mexicanos de *G. lamblia* difiere de la TIM de la cepa WB. Sin embargo, los compuestos como el DTNB pueden utilizarse para la inactivación de ambas enzimas con resultados eficientes.

Por lo que nuestros resultados sugieren un alto potencial de la GITIM presente en el grupo de niños mexicanos estudiado para ser usada como blanco en el diseño de fármacos anti-giardíasicos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ¹ Adam R. D. The biology of Giardia spp. *Microbiological Reviews*. Vol. 5(4): pp 706-732; EUA. Dic. 1991.
- ² David E. Katz MD., David N. Taylor MD. Parasitic Infections of the Gastrointestinal Tract. *Gastroenterology Clinics*. Vol. 30(3). September 2001.
- ³ Benjamin Lebwohl MD, Richard J. Deckelbaum MD, Peter H. R. Green MD. Giardiasis. *Gastrointestinal Endoscopy*. Vol. 57(7). Junio 2003.
- ⁴ Dennehy P.H. Acute diarrheal disease in children: epidemiology, prevention and treatment. *Infect Dis Clin N Am*. Vol. 19: pp.585-602. EUA, 2005.
- ⁵ Scott D. Lee MD, Christina M, Surawicz MD. Infectious causes of chronic diarrhea. *Gastroenterology clinics*. Vol.30(3). September 2001.
- ⁶ Julio C. Bai., Malabsorption syndromes. *Digestion*. 59:530-546.1998.
- ⁷ Ted S Steiner MD, Nathan M. Thielman MD, Richard L. Guerrant Md. Protozoal agents: What are the Dangers for the public Water Supply. *Annu. Rev. Med*. 48. 329-40. 1997.
- ⁸ Corry Jeb Kucik, Gary L. Martin, Brett V. Sortor. Common Intestinal Parasites. *American Family Physician*. Vol.69(5). 2004.
- ⁹ H. Leclerc, L. Schwartzbrod, E. Dei-Cas. Microbial Agents Associated with Waterborne Disease. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(4); 371-409. 2002.
- ¹⁰ Elaine Jong MD. Intestinal Parasites. *Prim Care Clin Office Pract*. Vol. 29;857-877. 2002.

-
- ¹¹ Moon T. D., Oberhelman R. A. Antiparasitic Therapy in Children. *Pediatr Clin N Am*. Vol.52: pp 917-948. EUA, 2005.
- ¹² Juckett Gregory MD. Intestinal Protozoa. *American Family Physician*. Vol. 53(8);2507-2516. 1996.
- ¹³ Huang D. B., White A. C. An updated review of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterology Clinics of North America*. Vol. 35: pp 291-314. EUA, 2006.
- ¹⁴ SSA *Boletín Epidemiológico*. Vol.20: 9-15 marzo de 2003.
- ¹⁵ Tomoko Mineno and Mitchell A. Avery. Giardiasis: Recent progress in Chemotherapy and Drug Development. *Current Pharmaceutical Desing*. Vol. 9; 841-855. 2003.
- ¹⁶ Cedillo-Rivera R, Chávez B, González-Robles A, Tapia A, Yépez-Mulia L. In vitro effect of nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *J Eukaryot Microbiol*. 49(3):201-8. 2002.
- ¹⁷ Vesey C.J., Peterson W.L. Review article: the management of giardiasis. *Aliment Pharmacol Ther*. Vol. 1: pp 843-850. EUA. Enero,1999.
- ¹⁸ Raúl Argüello-García, Maricela Cruz-Soto, Lydia Romero Montoya y Guadalupe Ortega-Pierres. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 54; 711-721. 2004.
- ¹⁹ Ruíz-Castillo M. A. Frecuencia de Absorción Intestinal Deficiente de Lactosa en un Grupo de Niños Sanos. Tesis para obtener grado de Gastroenterólogo Pediatra, Instituto Nacional de Pediatría, S.S. 2006.

-
- ²⁰ Levine N.D., Corlis J.O., Cox F. A Newly Revised Classification of the Protozoa. *J Protozol*; 27: 37-58. 1980.
- ²¹ Lane S., Lloyd D. Current Trends in Research into the Waterborne Parasite *Giardia*. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(2)123-147, 2002.
- ²² Adam, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*. 14(3)447-475. 2001.
- ²³ Argüello-García R, Ortega-Pierres MG. *Giardia duodenalis*: analysis of humoral immune response in experimentally infected gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Arch Med Res*. 28(2):171-8. 1997.
- ²⁴ Meredith S. Sagolla, Scott C. Dawson, Joel J. Mancuso and W. Zacheus Cande. Three-dimensional analysis of mitosis and cytokinesis in the binucleated parasite *Giardia intestinalis*. *Journal of cell Science*. 119(23); 4889-4900. 2006.
- ²⁵ Eckmann L. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunology*. Vol. 25: pp. 259-270. EUA, 2003.
- ²⁶ Bazán-Tejeda ML, Argüello-García R, Bermúdez-Cruz RM, Robles-Flores M, Ortega-Pierres G. Protein kinase C isoforms from *Giardia duodenalis*: identification and functional characterization of a beta-like molecule during encystment. *Arch Microbiol*. 187(1):55-66. 2007.
- ²⁷ Rodríguez-Fuentes G.B., Cedillo-Rivera R., Fonseca-Liñán R., Argüello-García R., Onofre-Muñoz, Ortega-Pierres G., Yépez-Mulia L. *Giardia duodenalis*: analisis of secreted proteases upon trophozoites-epitelial cell interaction *in vitro*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Río de Janeiro. 101(6); 693-696. 2006.

-
- ²⁸ Argüello-García R, Argüello-López C, González-Robles A, Castillo-Figueroa AM, Ortega-Pierres MG. Sequential exposure and assembly of cyst wall filaments on the surface of encysting *Giardia duodenalis*. *Parasitology*. 125(Pt 3):209-19. 2002.
- ²⁹ Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L. B., Sutak, R., Tachezy, J., Van der Geizen, M., Hernández, M., Müller, M. & Lucocq, J. M. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 426, 172-176. 2003.
- ³⁰ Lindmark DG. Energy metabolism of the anaerobic protozoan *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1:1-12;1976.
- ³¹ Müller M. Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 465-88; 1988.
- ³² Voet D., *et. al.* Fundamentals of Biochemistry. Ed. John Wiley and Sons, inc. EUA 1999.
- ³³ Wierenga, R.K., Noble, M.E.M. and Davenport, R.C. Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J. Mol Biol.* 224;1115-1126.1992.
- ³⁴ Lopez-Velazquez, G; Molina-Ortiz, D; Cabrera, N; *et al.* An unusual Triosephosphate isomerase from the early divergent eukaryote *Giardia lamblia*. *Proteins: Structure Function and Bioinformatics*. Vol. 55 (4): pp. 824-834. México. Jun 1, 2004.
- ³⁵ Reyes-Vivas H, Diaz A, Peon J, Mendoza-Hernandez G, Hernandez-Alcantara G, De la Mora-De la Mora I, Enriquez-Flores S, Domínguez-Ramírez L, López-

Velázquez G. Disulfide bridges in the mesophilic triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* are related to oligomerization and activity. *Journal of Molecular Biology*. Vol. 19;365(3):752-63. México, Jan 2007.

³⁶ Enriquez-Flores S. Reactividad de los Residuos de Cisteínas de la Triosafosfato Isomerasa de *Giardia lamblia* a Agentes Derivatizantes Específicos de Cisteína. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas. UNAM. Noviembre 2005.

³⁷ Suk D.H., Rejman D., Dykstra C.C., Pohl R., Pankiewicz KW., Patterson S.E. Phosphonoxins: rational design and discovery of a potent nucleotide anti-giardiasic agent. *Bioorg Med Chem Lett*. 17(10); 2811-6; 2007.

³⁸ Calzada F, Yépez-Mulia L, Aguilar A. In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J Ethnopharmacol*.108(3):367-70. 2006.

³⁹ Yépez-Mulia L., Calzada F, Cervantes-Martínez JA, In vitro antiprotozoal activity from the roots of *Geranium mexicanum* and its constituents on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *J Ethnopharmacol*.98(1-2):191-3. 2005.

⁴⁰ Enriquez-Flores S., Rodríguez-Romero A., Hernández-Alcántara G., De la Mora-De la Mora I., Gutiérrez-Castrellón P., Carvajal K., López-Velázquez G., Reyes-Vivas H. Species-specific inhibition of *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase by localized perturbation of the homodimer. *Molecular and Biochemical Parasitology*; 157(2); 179-186; Feb. 2008.

⁴¹ López-Velázquez G, Hernández-Alcántara G, Enriquez-Flores S, De la Mora-De la Mora J.I, Reyes-Vivas H. Toward a specific inactivation of the triosephosphate

isomerase from *Giardia lamblia*. II International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference. Morelia, Michoacán, México. May 13-18. 2007.

⁴² Cedillo-Rivera R, Enciso-Moreno JA, Martínez-Palomo A, Ortega Pierres G. Isolation and axenization of *Giardia lamblia* isolates from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Arch Invest Med (Mex)*. 22(1):79-85. 1991

⁴³ Coeddel, V.D. Methods in enzymology. *Press New York*. Vol. 185; 60-85. 1998.

⁴⁴ Jean-Pierre Herveg y Maritza Barcia-Macay. Expresión de genes clonados en *E. coli*. *Biología molecular*. Bolivia, 2004.

⁴⁵ Baruch AC, Isaac-Renton J, Adam RD. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach. *J. Infect. Dis.* 174 (1), 233-236 1996.

⁴⁶ Humphrey W, Dalke A, Schulten K, VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 14;33-8. 1996.