



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CARACTERÍSTICAS DE PEROXISOMAS EN
*Giardia lamblia***

TESIS

QUE PRESENTA

BIÓL. KARLA BERENICE ACOSTA VIRGEN

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

DIRECTORES DE TESIS:

DR. ADOLFO MARTÍNEZ PALOMO (CINVESTAV-DIPM)

DRA. MARTHA ESPINOSA CANTELLANO (CINVESTAV-DIPM)

Ciudad de México

JULIO, 2017

Este trabajo se realizó en el laboratorio 1 de Biología Celular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la co-dirección del Adolfo Martínez Palomo y de la Dra. Martha Espinosa Cantellano.

Agradecemos el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

- I. Índice
- II. Dedicatoria
- III. Lista de figuras

1	RESUMEN / ABSTRACT	1
2	INTRODUCCIÓN	3
2.1	Generalidades de <i>Giardia lamblia</i>	3
2.2	Ciclo de vida	6
3	ANTECEDENTES	7
3.1	3.1 Generalidades de peroxisomas	7
3.2	Biogénesis y metabolismo de peroxisomas	8
3.3	Peroxisomas en diferentes eucariontes	11
3.4	Evidencias de “peroxisoma-like” en <i>G. lamblia</i>	12
4	JUSTIFICACIÓN	16
5	HIPÓTESIS...	16
6	OBJETIVOS	17
7	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
8	MATERIALES Y MÉTODOS	19
8.1	Análisis <i>in silico</i>	19
8.2	Procedimientos experimentales	20
8.2.1	Cultivo de <i>G. lamblia</i>	20
8.2.2	Preparación de extractos y cuantificación de proteínas	20
8.2.3	Inmunización, obtención y titulación de anticuerpos	21
8.2.4	Electroforesis en geles de poliacrilamida	22
8.2.5	Western Blot	22
8.3	Inmunofluorescencia y microscopía confocal ²³	23
8.4	Inmunomicroscopía electrónica ²⁴	24
9	RESULTADOS	26
9.1	Análisis bioinformático de proteínas del peroxisoma y búsqueda de secuencias proteínas peroxisomales de <i>Giardia lamblia</i>	26
9.2	Identificación de regiones inmunogénicas para la síntesis de péptidos candidatos para anticuerpos	41
9.3	Producción y titulación de anticuerpos policlonales	42
9.4	Electroforesis y Western blot en extractos totales	42
9.5	Microscopía confocal	44
9.6	Inmunomicroscopía electrónica	46
10	DISCUSIÓN	48
11	CONCLUSIONES	54
12	REFERENCIAS	55
13	ANEXO 1 Proteínas peroxisomales presentes en diferentes organismos	61
14	ANEXO 2 Herramientas bioinformáticas utilizadas	64
15	ANEXO 3 Esquema de inmunización	65
16	ANEXO 4 Exanguinación	65

i. **AGRADECIMIENTOS**

Expreso agradecimiento al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo, de manera especial, al departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular por todas las facilidades brindadas.

Con muchísimo cariño e infinita admiración, agradezco al Dr. Adolfo Martínez Palomo por aceptarme en laboratorio, por todo el apoyo que me ha brindado, por secundar mis locuras y sobretodo, por su paciencia y cariño, así como por enseñarme todos los días que la humildad es el mejor atributo de cualquier científico.

A la Dra. Martha Espinosa Cantellano por aceptar ser la codirectora de este trabajo, por todos sus consejos y aportaciones que han enriquecido y fortalecido mi crecimiento profesional.

También, expreso mi profundo agradecimiento a la Dra. Bibiana Chávez Munguía por todo el apoyo, así como las experiencias que ha compartido conmigo y por su cariño.

Con admiración y cariño, agradezco al Dr. Antonio Lazcano por haber aceptado ser parte de este trabajo; por la disponibilidad de tiempo, así como por todas y cada una de las experiencias que comparte conmigo cada vez que nos vemos, por su enorme sencillez y su simpatía extrema.

Gracias infinitas a la Biól. Anel Lagunes Guillén y a la Biól. Lizbeth Salazar Villatoro por su apoyo en los procedimientos experimentales de este trabajo. Agradezco a ambas el apoyo incondicional desde mi primer día en el laboratorio. Las quiero y admiro muchísimo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 1: Dani, Hugo, Paty y Oli, por enriquecer mi trabajo con sus conocimientos, así como por tantos momentos compartidos, por las risas de todos los días y por tantas fotos divertidas. ¡Los quiero!.

Agradezco también a mi querida Maritza, por ser tan bella conmigo, por todo su apoyo, consejos y su enorme cariño. ¡Gracias Mari!

Gracias infinitas a Judith, Miguel y Ranfe por sacarme de tantos apuros...
¡SIEMPRE!

Gracias a Martitha Dueñas y a Clara Castelán por sus múltiples salvaciones y por toda su ayuda sin restricciones.

A todos los miembros del laboratorio del Dr. Víctor Tsutsumi, en especial al querido doctor y a las siempre dispuestas M. en C. Karla Monserrat Gil Becerril y a Karlita, por su ayuda en el procedimiento experimental y sus aportaciones a este trabajo.

Agradezco el apoyo brindado por parte de la UPEAL durante todo el proceso experimental, en especial al Dr. Jorge Fernández y a Ma. Antonieta López. Infinitas gracias al MVZ. Octavio, por las facilidades brindadas en el manejo de los conejos y por su apoyo incondicional.

Con mucho cariño agradezco a todo el laboratorio de Origen de la Vida de la Facultad de Ciencias (UNAM), por las facilidades brindadas y por apoyarme en la parte bioinformática de este trabajo, en especial a mis queridos Wolfgang, Caro, Pepe, Beto, Ricardo y al Dr. Arturo Becerra. ¡Gracias chicos!.

ii. DEDICATORIA

Con todo mi amor, agradezco y dedico este trabajo a familia: Mamá, Papá y Fer, gracias por apoyar cada una de las decisiones que tomo, por estar siempre conmigo, por su tolerancia, paciencia y sobretodo, por su infinito amor.

A mi querida amiga y primera mentora (por siempre) Dra. Rosario Mata (Chayo), por apoyar cada una de mis locuras, decisiones y caprichos. Por enseñarme tanto del mundo científico y por traerme de vuelta a la realidad cada que lo necesito, desde hace ya más de 6 años.

Para ti mi querida caracol, por estar tan cerquita de mí en las buenas, en las malas y en las peores. Por vivir conmigo todos los momentos, ya sea de felicidad o de sufrimiento. Gracias por no dejarme sola nunca Itzelita.

A mi tropa favorita, llena de locura (y trabajo extra): Marce, Sandy, Lili y Rigo. ¡Los quiero amiguitos!.

Con muchísimo cariño, dedico este trabajo a mi otra familia, Sra. Mago, Sr. Juan, Mari, Gelo, Viri, Luis, Linda y a los pequeños dementes Samu y Carlitos. ¡Gracias por tanto cariño!.

Con mucho amor y de manera muy especial, para ti Betín que me hiciste voltear al norte y me convenciste de venir aquí y redirigir mi camino. Gracias por estar siempre, siempre, siempre a mi lado.

iii. LISTA DE FIGURAS

Fig.1 Trofozoítos de *Giardia lamblia*

Fig.2 Quistes de *G. lamblia*

Fig.3 Ciclo de vida de *G. lamblia*

Fig.4 Biogénesis del peroxisoma

Fig.5 Western blot de la expresión de peroxirredoxinas en trofozoítos de *Giardia lamblia*

Fig.6 Identificación de un anticuerpo α -PRDX1 en *Giardia lamblia*

Fig.7 Reacciones de Cerio en trofozoítos

Fig.8 Reacciones de Diaminobencidina

Fig.9 Proteínas metabólicas que participan en diferentes funciones del peroxisoma

Fig.10 Dominios de las proteínas MVK

Fig.11 Alineamiento pareado de las proteínas mevalonato cinasa de *Homo sapiens* y *G. lamblia*.

Fig.12 Fragmento más conservado del alineamiento múltiple de las proteínas MVK.

Fig.13 Alineamiento en Promals 3D de las proteínas mevalonato cinasa de *H. sapiens* vs *G. lamblia*

Fig.14 Predicción de estructuras terciarias de la mevalonato cinasa

Fig.15 Empalme en Chimera de las mevalonato cinasa

Fig.16 Interactoma de la mevalonato cinasa de *G. lamblia*

Fig.17 Blast para la búsqueda de Acil-CoA sintetasas de cadena larga en *G. lamblia*

Fig.18 Dominios de unión a AMP de las ACSL-4

Fig.19 Fragmentos de los alineamientos pareados de las ACSL-4

Fig.20 Alineamiento en Promals 3D de las secuencias de *H. sapiens* y *G. lamblia*

Fig.21 Predicción de estructuras terciarias de las ACSL-4

Fig.22 Empalme de estructuras terciarias de las ACSL-4

Fig.23 Interactoma de la proteína ACSL-4 de *G. lamblia*

Fig.24 Blast para la búsqueda de peroxina-4 en *G. lamblia*

Fig.25 Dominio ubiquitina en la peroxina-4

- Fig.26 Alineamiento pareado entre *Arabidopsis thaliana* y *Giardia lamblia*
- Fig.27 Alineamiento múltiple de la PEX-4 en Muscle
- Fig.28 Alineamiento pareado y predicción de estructura secundaria de la peroxina-4
- Fig.29 Predicción de estructuras terciarias de la Pex-4 en Raptor X
- Fig.30 Empalme de estructuras terciarias de *A. thaliana* y *G. lamblia*
- Fig.31 Interactoma de la peroxina-4 de *G. lamblia*
- Fig.32 Regiones inmunogénicas de ACSL-4 y Pex-4 de *Giardia lamblia*
- Fig.33 Perfil proteico de extractos totales de *Giardia lamblia*
- Fig.34 Western blot de las proteínas candidatas
- Fig.35 Inmunofluorescencia para identificar la proteína ACSL-4 de *G. lamblia*
- Fig.36 Inmunofluorescencia para identificar a la PEX-4 de *G. lamblia*
- Fig.37 Inmunomarcage de la proteína ACSL-4 de *G. lamblia*
- Fig.38 Inmunomarcage de la proteína PEX-4 de *G. lamblia*

1. RESUMEN

Los peroxisomas son organelos celulares de organismos eucariontes encargados principalmente del metabolismo de los ácidos grasos y de la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Desde su descubrimiento, se les diferenciaba de otros organelos por la presencia de al menos una oxidasa y una catalasa. Sin embargo, actualmente se identifica al peroxisoma por la presencia de proteínas que participan en la biogénesis del organelo.

Tradicionalmente se ha señalado la ausencia de peroxisomas en *Giardia lamblia*, parásito que causa diarreas agudas principalmente en menores de cinco años. Evidencias bioquímicas y de inmunomicroscopía electrónica de transmisión de nuestro laboratorio, muestran la presencia de peroxirredoxina-1 (proteína involucrada en el metabolismo de los peroxisomas) en vesículas en *G. lamblia*, sugiriendo la presencia de un organelo similar al peroxisoma.

El objetivo de este trabajo fue buscar proteínas características del peroxisoma utilizando herramientas bioinformáticas para subsecuentemente, identificarlas con anticuerpos específicos en lisados celulares mediante Western blot y localizarlas por microscopía confocal e inmunoelectrónica. Se identificaron dos proteínas características de peroxisomas en *G. lamblia*: la ASCL-4 que es una proteína metabólica y la Peroxina-4, relacionada con la biogénesis del organelo; ambas proteínas podrían representar la primera evidencia que sustente la presencia de peroxisomas en *Giardia lamblia*.

ABSTRACT

Peroxisomes are cellular organelles of eukaryotic organisms mainly responsible for the metabolism of fatty acids and the detoxification of reactive oxygen species (ROS). Since their discovery, they were differentiated from other organelles by the presence of at least one oxidase and one catalase. However, peroxisomes are currently identified by the presence of proteins involved in the organelle biogenesis.

Giardia lamblia, a protozoan parasite causative agent of human giardiasis, has traditionally been reported as lacking peroxisomes. However, biochemical evidence from our laboratory (data not published) shows the presence of peroxiredoxin-1 (PRDX-1) in cytoplasmic vesicles in this parasite. Since PRDX-1 is a metabolic enzyme of peroxisomes, our results suggested the presence of a peroxisome-like organelle in *G. lamblia*.

The objective of this work was to search for proteins characteristic of the peroxisome using bioinformatics tools to subsequently identify them by western blot and localize them by some types of microscopy. Two proteins were identified: ACSL-4 a metabolic enzyme which in peroxisomes is responsible for the β -oxidation of unsaturated fatty acids and a PEX-4 protein that could be involved in peroxisome biogenesis. These results could represent the first evidence to support the presence of peroxisomes in *Giardia lamblia*.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades de *G. lamblia*

→ Clasificación taxonómica

Reino (Haeckel, 1866)

Excavata (Cavalier-Smith, 2002)

Phylum Metamonada (Grassé, 1952)

Clase Fornicata (Simpson, 2003)

Orden Diplomonadida (Wenyon, 1926)

Familia Hexamitidae

Género *Giardia* (Kunstler, 1882)

Especie *G. lamblia* (Kunstler, 1882)

Giardia lamblia (sin. *duodenalis*, *intestinalis*) es un protista parásito de vertebrados que en humanos causa diarreas agudas, principalmente en niños. Este parásito presenta dos fases en su ciclo de vida: el trofozoito y el quiste (Adam 2001).

→ Trofozoíto

Esta fase se caracteriza por tener un cuerpo redondeado en forma de media pera; está provisto de cuatro pares de flagelos en las posiciones anterior, posterior, caudal y ventral. Asimismo, posee un disco ventral en la región anterior que ocupa un tercio del cuerpo del parásito, mismo que participa en la adhesión a la mucosa del hospedero (Adam 2001).

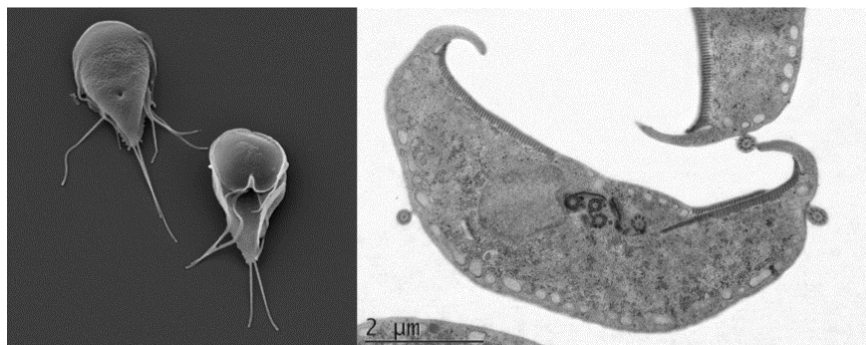


Fig. 1 Trofozoítos de *Giardia lamblia*. a) Observación en microscopía electrónica de barrido, b) Corte longitudinal de trofozoito visto por microscopía electrónica de transmisión.

El trofozoito de *G. lamblia* posee dos núcleos transcripcionalmente activos dispuestos en la región anterior del cuerpo, cada uno con su respectivo nucléolo (Jiménez-García *et al.*, 2008); en el citoplasma se encuentran vacuolas lisosomales, gránulos de glucógeno y el aparato de Golgi, cuya presencia ha sido sugerida durante el proceso de diferenciación (Adam 2001).

→ **Quiste**

El quiste es la fase infectiva del parásito; tiene una forma ovalada y mide hasta 10 μ de diámetro por 0.5 μ de ancho. Posee tres membranas internas que conforman la gruesa pared, cuya composición bioquímica ha sido pobremente caracterizada, pero se sabe que contiene N-acetilgalactosamida, quitina y proteínas de 29, 75, 88 y 102 kDa (Adam 2001; Chávez-Munguía 2004; 2007).

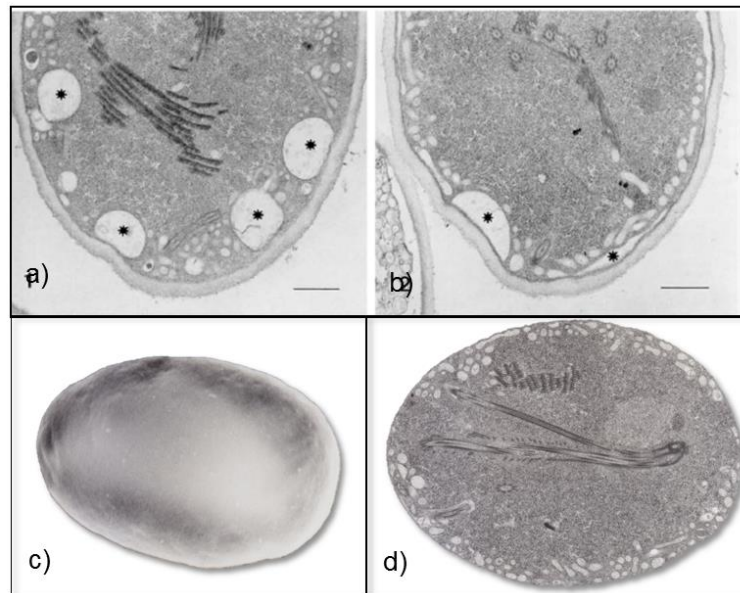


Fig. 2 Quistes de *G. lamblia*. a-b Micrografías de baja magnificación de quistes inmaduros que muestran la presencia de vacuolas en la formación del espacio peritrófico c) Observación en microscopía electrónica de barrido, d) Corte longitudinal de quiste visto por microscopía electrónica de transmisión (Fotografía: Dra. Bibiana Chávez).

Con base en diferencias en la morfología tanto del trofozoito como del quiste, a la fecha se reconocen alrededor de 40 especies del género *Giardia* según el proyecto del árbol de la vida (Tree of Life Web Project, 2008), sin embargo sólo siete han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas (*G. agilis*, *G. ardeae*, *G. microti*, *G. muris*, *G. lamblia*, *G. psittaci*, *G. varani*) (Adam 2001; Ryan & Caccio 2013).

Giardia lamblia es la especie que parasita al humano, siendo más prevalente en niños menores de 5 años, aunque los adultos mayores de 25 años, son los principales portadores. Para esta especie, se reconocen dos especies sinónimas, *G. duodenalis* y *G. intestinalis*, parásitas además de otros animales, como el ganado o las mascotas (Adam 2001). Debido a ello, la clasificación taxonómica para esta especie ha sido reorganizada en ocho ensambles, A-H, (Cuadro 1), de los cuales sólo el A y B, parasitan al ser humano (Adam 2001, Ryan and Caccio 2013).

Ensamble	Hospederos
A	Primates, ganado, cánidos, félidos
B	Primates, ganado, cánidos, félidos
C	Cánidos, principalmente perros
D	Cánidos, principalmente perros
E	Ganado
F	Gatos
G	Roedores
H	Pinnípedos

Cuadro 1 Ensambls de *G. lamblia* y sus hospederos

(Modificado de Ryan y Caccio 2013).

2.2 Ciclo de vida

La infección por *Giardia* ocurre tras la ingesta de quistes presentes en agua y comida contaminada, por lo que su principal vía de transmisión es la ruta fecal-oral (CDC, 2016). Posteriormente, en el intestino ocurre el desenquistamiento, liberándose un exisoíto que inmediatamente se divide dando lugar a dos trofozoitos; después, los trofozoitos se multiplican en la luz intestinal mediante fisión binaria y se adhieren por medio del disco ventral a la mucosa del intestino. El proceso de enquistamiento ocurre en el colon y los quistes son liberados al ambiente por medio de las heces. Los animales silvestres pueden ser reservorios de los quistes de *Giardia*, por lo que el contacto con mascotas o animales silvestres favorece la transmisión de este parásito (Adam 2001), CDC, 2016).

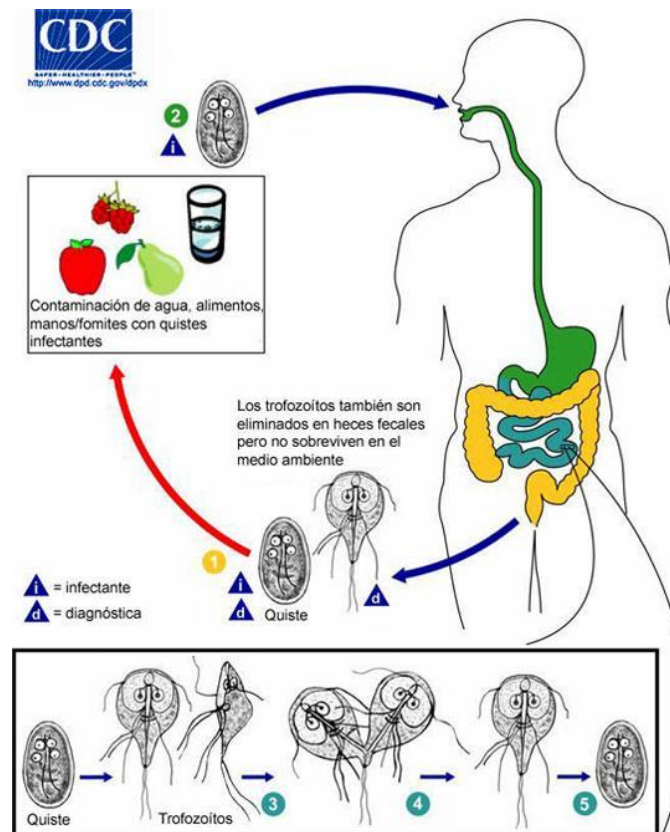


Fig. 3 Ciclo de vida de *G. lamblia*

(Tomado de CDC, 2016).

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de peroxisomas

Una de las diferencias significativas entre procariontes y eucariontes es la compartimentalización celular. Si bien la mayoría de los organelos celulares como el núcleo o las mitocondrias han sido ampliamente estudiados, organelos como los peroxisomas aún carecen de análisis detallado, debido en gran medida a la diversidad en tamaño, forma y componentes entre las diferentes especies.

A pesar de ser organelos ubicuos, al parecer los peroxisomas no están presentes en todos los organismos eucariontes; un ejemplo de ello es *G. lamblia* en el que aún no se han identificado peroxisomas, por lo que desde su descubrimiento, se ha descartado la idea de que los tengan (Adam, 2001; Gabaldón, 2014).

Desde que Rhodin (1954) descubrió los peroxisomas y de que De Duve & Baudhuin (1966) los caracterizaron bioquímicamente, se les había diferenciado de otros organelos celulares por la presencia de al menos una oxidasa y una catalasa. No obstante, hoy en día esa idea ha sido descartada, puesto que hay organismos que carecen de catalasa u oxidasas y tienen peroxisomas, como es el caso de algunos protozoarios parásitos (Smith & Aitchison, 2013).

Actualmente, las proteínas más importantes para que un organelo sea considerado como peroxisoma, es la presencia de proteínas que sean fundamentales para la biogénesis y mantenimiento del organelo, en particular, las peroxinas (PEX) (Moyersoen *et al.*, 2004, Gabaldón, 2010).

Los peroxisomas son organelos que miden entre 0.1 y 1 μm , tienen una membrana simple y una amplia variedad de proteínas metabólicas que son la base de la multifuncionalidad del organelo, como por ejemplo la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, la β -oxidación de ácidos grasos, la biosíntesis de precursores de esteroides, el metabolismo de retinol y de aminoácidos, entre otras; por lo que, a las proteínas de los peroxisomas se les divide en dos grupos: las que participan en la biogénesis y las involucradas en el metabolismo del organelo (Moyersoen *et al.*, 2004, Gabaldón, 2010; 2014).

3.2 Biogénesis y metabolismo de peroxisomas

→ Biogénesis del peroxisoma

Las peroxinas son las proteínas peroxisomales multifuncionales encargadas de la biogénesis, mantenimiento, transporte citoplásmico, división y comunicación de los peroxisomas con otros compartimentos celulares, como el retículo endoplásmico, el núcleo o el aparato de Golgi (Cuadro 2) (Thill, 2012; Smith & Aitchison, 2013).

La biogénesis de este organelo comprende la formación de la membrana simple, importe de proteínas de matriz así como la proliferación e inhiterancia del organelo (Eckert & Erdmann, 2003; Kaur *et al.*, 2009). Dependiendo del organismo y del tipo celular del que se trate, la biogénesis de los peroxisomas puede ocurrir por síntesis *de novo* a partir del retículo endoplásmico y por gemación, o bien a partir de la fisión de peroxisomas maduros pre-existentes en la célula (Fig.4) (Eckert & Erdmann, 2003; Kaur *et al.*, , 2009; Thill, 2012; Smith & Aitchison, 2013).

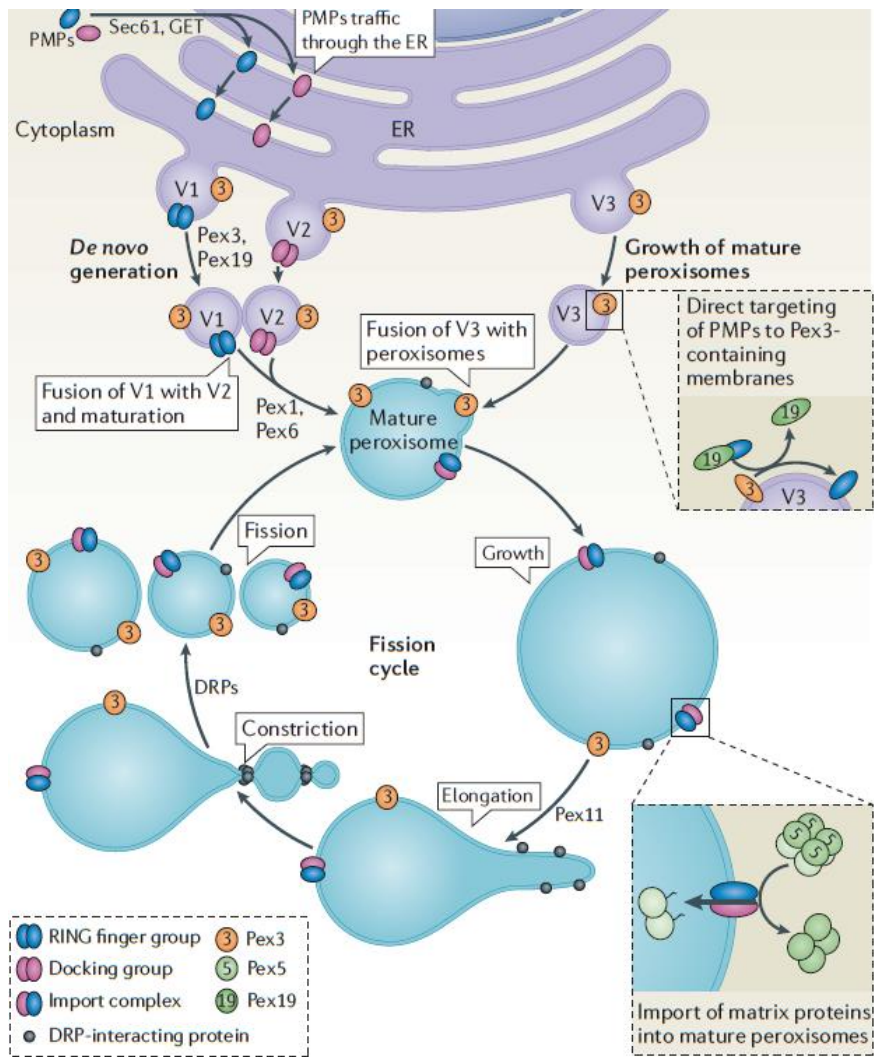


Fig. 4 Biogénesis del peroxisoma (Tomado de Smith & Aitchison, 2013).

Clasificación	Peroxinas	Característica funcional
Blanco de proteínas de matriz	Pex 7, Pex 20, Pex 21, Pex 18, Pex 5	Poseen señal PTS-2. Algunas participan en el reciclamiento del receptor o bien como co-receptor de otras proteínas
Maquinaria de importe de proteínas de matriz	Pex 5, Pex 14	Participan en el canal de translocación
	Pex 13, Pex 14, Pex 17, Pex 33	Receptores del complejo de acoplamiento
	Pex 8	Receptores del complejo de acoplamiento y exporte de proteínas
	Pex 4, Pex 22, Pex 2, Pex 10, Pex 12	Participan en el proceso de ubiquitinación del receptor
	Pex 1, Pex 6	Poseen la señal AAA-TIPO ATPasa. Participan en el reciclamiento y exporte del receptor
	Pex 15, Pex 26	
Blanco directo para PMP's [*]	Pex 3	Interviene en el acoplamiento del receptor
	Pex 19	Participa como chaperona y como co-receptor
Formación de membrana peroxisomal desde RE	Pex 3, Pex 19	Forman un complejo para la generación de peroxisomas <i>de novo</i>
	Pex 25	Requerido para la generación de peroxisomas <i>de novo</i> y es necesario para el reclutamiento de Rho1
	Pex 16	Recluta PMP's en el RE
	Pex 1, Pex 6	Son mediadores de la fusión de vesículas pre-peroxisomales en la formación <i>de novo</i>
	Pex 23, Pex 30	Reguladores de la fisión de peroxisomas en la formación <i>de novo</i>
	Pex 11, Pex 25	Participan en la elongación y remodelamiento de la membrana peroxisomal. También están involucrados en el reclutamiento de la maquinaria de fisión
	Pex 27	Regulador negativo de la fisión peroxisomal
	Pex 34	Regulador positivo de la fisión peroxisomal
Regulación de biogénesis	Pex 24, Pex 28, Pex 29, Pex 23, Pex 30, Pex 32	Forman un complejo con dominios específicos para la comunicación con RE. Participan en el establecimiento, contacto y fisión del peroxisoma

Cuadro 2 Características de las peroxinas descritas para *H. sapiens*, *A. thaliana*, *M. musculus*, *S. cerevisiae*, entre otros organismos (Modificado de Smith & Aitchison, 2013).

→ Metabolismo del peroxisoma

En lo que respecta a las proteínas metabólicas, la composición de los peroxisomas tiene una alta variedad intraespecífica, lo cual se debe a las características de cada uno de los organismos, así como las necesidades metabólicas de la célula en donde se encuentren; por ejemplo, en hepatocitos de rata se sabe que los peroxisomas albergan más de 50 proteínas, principalmente catalasas, peroxidasas, tranferasas, oxidoreductasas, peroxidoreductasas, por mencionar algunas.

3.3 Peroxisomas en diferentes eucariontes

Una de las principales características de los peroxisomas es la gran variedad de enzimas que los hacen altamente diferentes unos de otros en varios tipos celulares incluso dentro de un mismo organismo, por lo que no es sorpresa que exista una gran variedad de peroxisomas altamente especializados en los diferentes taxa eucariontes.

A pesar de que debieran tener ciertas características que los hacen semejantes, existen peroxisomas que son denominados de forma distinta con base en su alta especialización. Un ejemplo de ellos son los glioxisomas que poseen las plantas, nombrados así debido a que presentan enzimas del ciclo del glioxilato (Tolbert & Essner, 1981). De la misma forma, los gerontosomas son organelos involucrados en la senescencia de las plantas (Vicentini & Matile, 1993). Asimismo, está el caso de los Tripanosomátidos, que presentan glicosomas, llamados así por la presencia de enzimas glicolíticas (Opperdoes & Borst, 1977).

En 2010, Gabaldón realiza una revisión de las características de los diferentes tipos de peroxisomas en cinco grandes grupos de organismos, basándose en la clasificación propuesta por Keeling y colaboradores (2005) y utilizando la información de las diferentes bases de datos con los genomas completos de las especies (Anexo 1).

3.4 Evidencias de “peroxisoma-like” en *G. lamblia*

Como se ha mencionado anteriormente, toda la investigación en torno a *Giardia* tiene la misma premisa: éste parásito carece de peroxisomas. Es por ello que no ha habido estudios dirigidos a la búsqueda del organelo. Sin embargo, existen evidencias que podrían abrir paso en la búsqueda de peroxisomas en el parásito.

Un ejemplo de ello es la identificación de cuatro diferentes isoformas de la peroxirredoxina en extractos totales de *G. lamblia* por medio de Western blot (Mastronicola *et al.*, 2014).

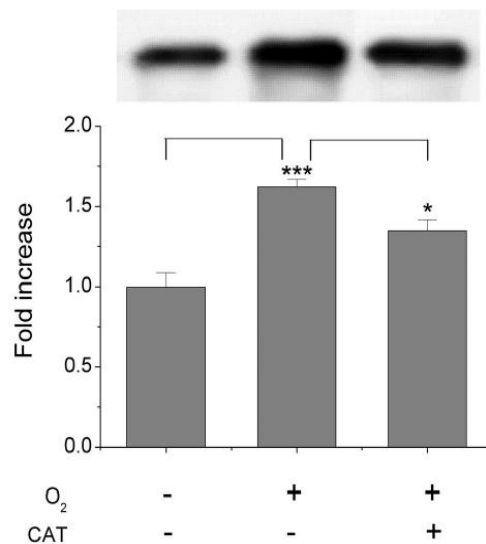


Fig. 5 Western blot de la expresión de peroxirredoxinas en trofozoítos de *Giardia lamblia* (Mastronicola, 2014).

Las peroxirredoxinas son proteínas antioxidantes que se encuentran dispersas en el citoplasma o que pueden estar presentes en compartimentos celulares como mitocondria, núcleo, membrana, cloroplastos, peroxisomas e incluso pueden ser exportadas de la célula (Rhee, 2016). Se encuentran altamente conservadas a lo largo de la evolución, ya que están presentes desde las bacterias hasta los vertebrados superiores, incluido el humano. Estas proteínas metabólicas se encargan principalmente de la oxidación y reducción del peróxido en el sistema antioxidante de los peroxisomas (Rhee, 2012; Rhee, 2016).

Mediante Western blot, Mastronicola (2014) demostró la expresión de las peroxirredoxinas de *G. lamblia* en trofozoítos cultivados durante 24 horas en condiciones anaerobias y en presencia/ausencia de catalasa (Fig. 5). Con base en estos resultados, en nuestro laboratorio se mandó sintetizar un anticuerpo α -PRDX1. Por western blot se identificó una proteína del tamaño esperado en el lisado total de trofozoítos. La proteína se localizó en el citoplasma en ensayos de inmunofluorescencia, y también dentro de vesículas rodeadas de una membrana (peroxisoma-like) por inmunomicroscopía electrónica (Fig. 6a).

De igual forma, se buscó la localización celular por microscopía confocal e inmunoelectrónica de transmisión y electrónica de la proteína, identificando la presencia de cúmulos de proteína en la inmunofluorescencia, así como una marca en citoplasma y dentro de unas vesículas en el inmunomarcaje (Fig. 6b).

Mediante microscopía inmunoelectrónica de transmisión, la Dra. Bibiana Chávez identificó vesículas de una sola membrana en las cuales se pudo localizar a la peroxirredoxina-1 dentro de ellas, siendo esta la primera evidencia de “peroxisoma-like”.

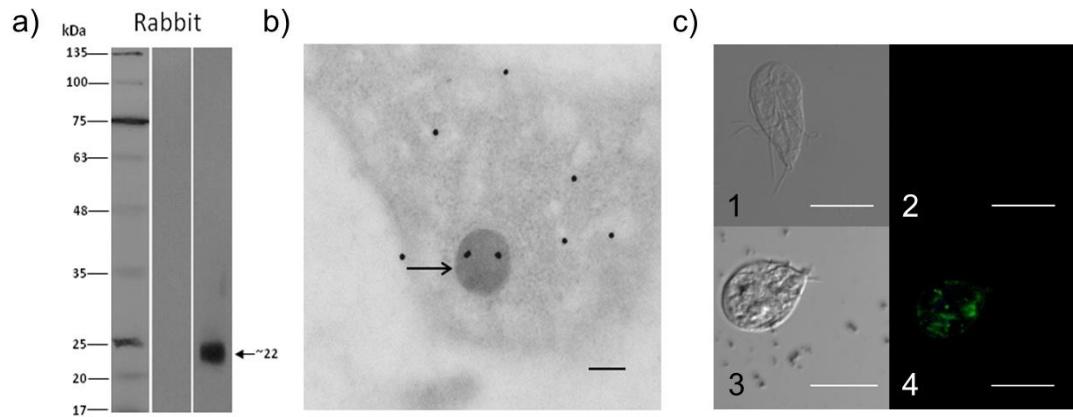


Fig. 6 Identificación de un anticuerpo α -PRDX1 en *Giardia lamblia*. a) Western blot de extractos totales de *G lamblia*; b) Localización del anticuerpo α -PRDX1 en “peroxisoma-like”; c) Ensayo de inmunofluorescencia 1) control campo claro, 2) control sin α -PRDX1, 3) campo claro del anticuerpo α -PRDX1, 4) anticuerpo α -PRDX1 más segundo anticuerpo acoplado a FITC.

Aunado a los ensayos anteriores, tanto en trofozoito como en quiste, se probaron dos diferentes técnicas citoquímicas que evidencian la presencia de reacciones que ocurren en peroxisomas de otros organismos, que son la reacción de cerio y la de diaminobencidina (Fig. 7-8) (Angermüller S & D. Fahimi, 1981; 1988).

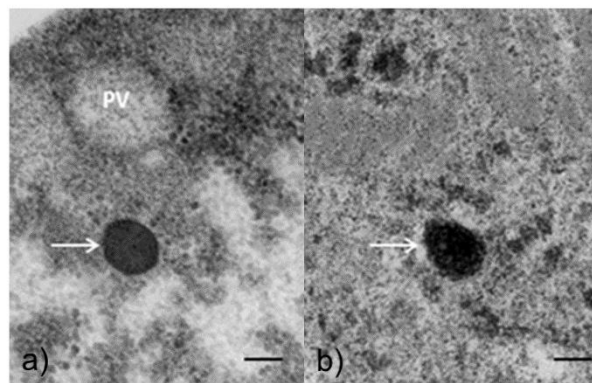


Fig. 7 Reacciones de Cerio en trofozoítos.

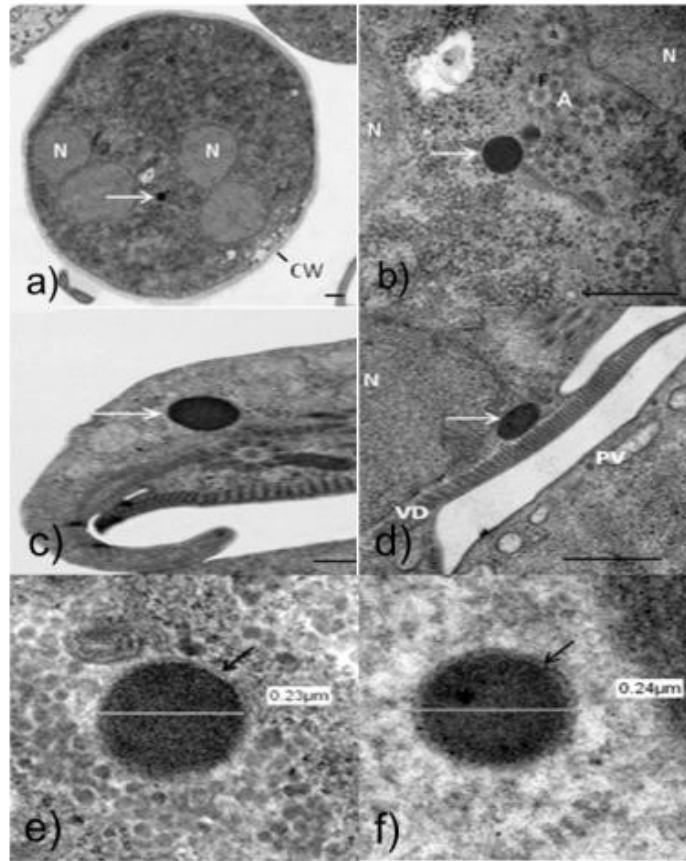


Fig. 8 Reacciones de Diaminobencidina: a-b en quistes; b-e en trofozoítos.

4. JUSTIFICACIÓN

Históricamente se ha considerado que *Giardia* carece de peroxisomas. No obstante, Mastronicola y colaboradores (2014) encontraron cuatro diferentes peroxirredoxinas, que en otros organismos, están presentes en diferentes compartimentos celulares, entre ellos los peroxisomas. Evidencias bioquímicas de nuestro laboratorio muestran la presencia de peroxirredoxina-1 (PRDX-1) en vesículas (denominadas “peroxisoma-like”), lo que podría sugerir la presencia de un organelo similar al peroxisoma en *G. lamblia*. Es por ello que en este trabajo nos dimos a la tarea de identificar proteínas características del peroxisomas utilizando herramientas bioinformáticas y subsecuentemente, identificarlas mediante la producción de anticuerpos específicos para dichas proteínas, para localizarlas por diferentes tipos de microscopía. Con lo anterior se espera obtener evidencias que sustenten la presencia de peroxisomas en este parásito.

5. HIPÓTESIS

G. lamblia tiene organelos con características similares a los peroxisomas de otros eucariontes.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Identificar proteínas características de peroxisomas en *Giardia lamblia*

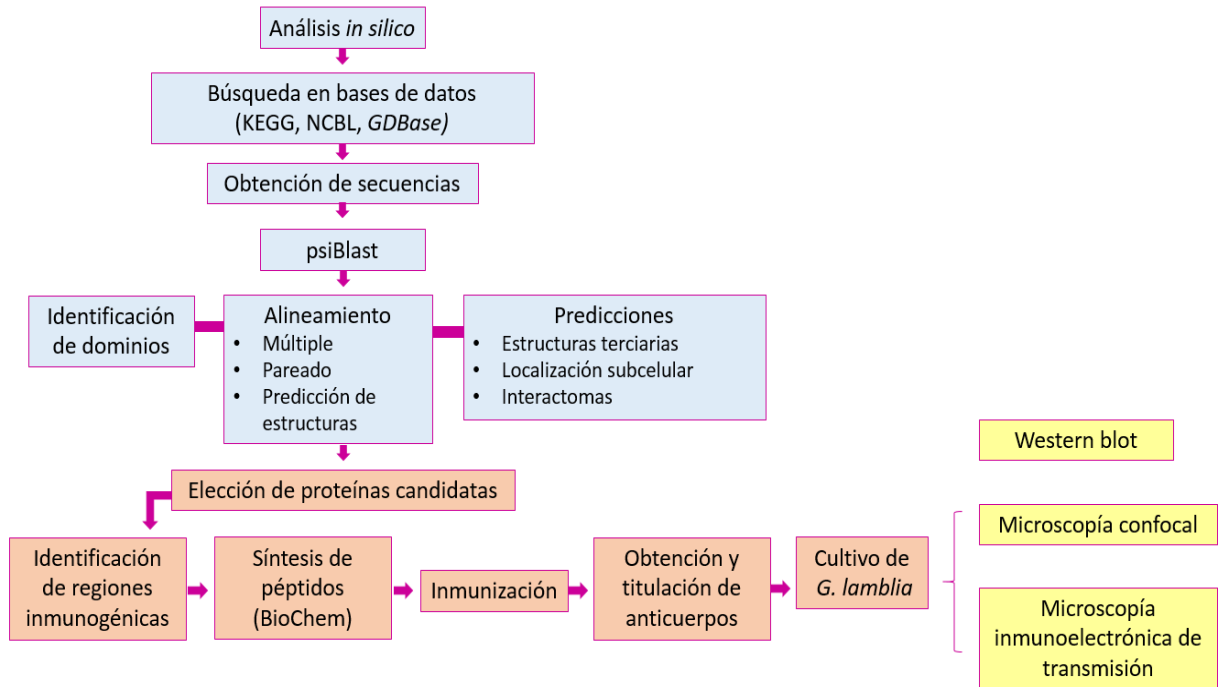
6.2. Objetivos particulares

6.2.1 Realizar la búsqueda bioinformática de proteínas que pudieran que participan en la biogénesis y metabolismo de peroxisomas en *G. lamblia*

6.2.2 Producir anticuerpos policlonales de las proteínas candidatas e identificarlas por Western blot.

6.2.3 Localizar a las proteínas candidatas por microscopía confocal e inmunomicroscopía electrónica.

7. Estrategia experimental



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Análisis *in silico*

Se utilizaron diferentes bases de datos (KEGG, NCBI, PDB, GDB) para la obtención de secuencias de proteínas características de peroxisomas en organismos filogenéticamente cercanos y lejanos a *G. lamblia*.

A las proteínas identificadas, se les realizó un blast para la búsqueda en el proteoma de *Giardia*, obteniendo secuencias de proteínas con mayor score¹.

Las proteínas candidatas y las secuencias de referencia en otros organismos fueron analizadas utilizando los programas HMMSCAN (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>) y PFAM (<http://pfam.xfam.org/search#tabview=tab0>) para la identificación de dominios.

La predicción de estructuras terciarias se hizo mediante RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/predict/>). Las secuencias obtenidas en *Giardia* y las de referencia fueron alineadas utilizando Muscle (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) y Promals 3D (<http://prodata.swmed.edu/promals3d/promals3d.php>).

Para la predicción de la localización subcelular de las proteínas candidatas, se utilizó el servidor PSORTII (<https://psort.hgc.jp/form2.html>) y para los interactomas *in silico*, se utilizó el programa STRING 2.0. (<https://string-db.org/>). Asimismo, se realizaron empalmes de estructuras terciarias predichas en Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) a partir de las estructuras obtenidas en formato PDB en RaptorX.

¹ Score: Valor numérico que describe la calidad general de un alineamiento, dependiendo del sistema en el que se haya hecho el mismo (algoritmo, matriz de sustitución, gaps, etc.)

Una vez obtenidas las proteínas candidatas, se utilizó el programa ABCPred (http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html) para la identificación de regiones inmunogénicas para la síntesis de péptidos (Anexo 2).

8.2 Procedimientos experimentales

8.2.1 Cultivo de *G. lamblia*

Se cultivaron trofozoitos de la cepa IMSS: 1 de *G. lamblia* en medio TYI-S33 (Keister, 1983) suplementado con suero bovino adulto al 10%, una mezcla de vitaminas de Diamond al 10% (JRH, Biosciences) y antibiótico al 1% (estreptomocina-penicilina). Se dejaron incubar a 37°C por 72 horas para que alcanzaran su fase logarítmica de crecimiento. Una vez que alcanzaron su crecimiento óptimo, los trofozoitos fueron despegados por choque térmico con hielo durante 15 min. A los trofozoitos despegados, se les eliminó el medio por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos y se lavaron con PBS estéril. El conteo de *Giardia* se realizó utilizando una cámara de Neubauer.

8.2.2 Preparación de extractos y cuantificación de proteínas

Se utilizaron ocho tubos de *G. lamblia* en medio TYI-S33 (80×10^6 trofozoitos). Las células se despegaron por choque térmico en hielo durante 15 min y los tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el medio y las pastillas re-suspendieron en 1.5 ml de PBS estéril. Las células se lisaron en amortiguador de lisis RIPA (Tris-HCl pH 7.5-60mM, NaCl 450Mm, Na₂EDTA 3Mm, EGTA 3Mm, NP40 3% y Deoxicolato de sodio 3%) adicionado con se utilizaron seis inhibidores de proteasas (leupetina 3mM, PMSF 3Mm, TLCK 3mM, aprotinina 100µM, iodoacetamida 100 µM y NEM 3mM) en volumen 1:1 (v/v) con el de la pastilla. En este caso, se añadieron 200 µl de amortiguador de lisis-inhibidores por cada pastilla celular de 200 µl. Las células se lisaron mediante cinco ciclos de sonicación-hielo (30"sonicación- 1' en hielo). Se tomó 1µl del extracto crudo para la cuantificación de proteínas y el resto se mantuvo en a -70° C hasta su uso.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante un método fluorométrico utilizando el dispositivo Qubit® en el cual se coloca 1µl de la muestra con 199 µl de la solución de trabajo.

8.2.3 Inmunización, obtención y titulación de anticuerpos

Para la inmunización se eligieron dos conejas de la raza Nueva Zelanda provenientes la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Cinvestav de entre 6-7 semanas de edad, a las cuales se les realizó la colecta de sangre para la obtención del suero pre-inmune. Se administraron cuatro dosis de 500 µl de inóculo (1:1 péptido-adyuvante TiterGoldMax) durante un periodo de tres meses (ver anexo 3).

Dos semanas después de la cuarta inmunización, se realizó el sangrado total, para lo cual previamente se administró 1.5 ml de sulfato de atropina como estimulante cardiaco vía intramuscular y se dejó actuar por 10 minutos. Después se inyectaron 2.5 ml de pentobarbital sódico como método anestésico y se dejó reposar al animal por 10 minutos; se revisaron los signos vitales durante la espera conforme lo estipulan las recomendaciones y normas del CICUAL, para evitar un paro cardiaco.

Posteriormente se realizó una punción cardiaca en el tercer espacio intercostal con una aguja calibre 18 colocada en una jeringa de 50 ml. Se obtuvieron aproximadamente 80 ml de sangre de cada animal inmunizado.

La sangre fue incubada a 36° durante 30 minutos para la separación del plasma. Se eliminó el coágulo de sangre y se centrifugó el suero a 1500 rpm durante 10 minutos y se colectó el suero, mismo que se centrifugó dos veces a 3000 rpm durante 10 minutos para eliminar los restos celulares.

Del suero obtenido se hicieron alícuotas y se mantuvieron a -20° hasta su uso (Anexo 4).

8.2.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para conocer el patrón de proteínas de los extractos totales, se realizó una electroforesis en la cual se separan las bandas con base en su peso molecular. Al extracto total se añadió buffer de muestra 1X (Glicerol, SDS 10%, buffer concentrador pH 6.8, β -mercaptoetanol y azul de bromofenol) en un volumen 1:1 (v/v). Las muestras se cargaron en dos geles de poliacrilamida al 10 % (para la proteína ACSL-4) y al 12.5 % (para la PEX-4) en tres diferentes concentraciones de proteínas (20, 40 y 60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). En cada gel se incluyó un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad).

La corrida electroforética se realizó en una cámara que contenía buffer de corrida 1X (SDS, Tris y glicina) durante dos etapas: la primera de 15 minutos a 150 V que permite que la muestra corra en el gel concentrador y la segunda de 45 a 55 minutos a 80 V para que corrieran las proteínas en el gel separador. Uno de los geles se tiñó con azul de Coomasie durante toda una noche y se destiñó con solución desteñidora (Metanol, ácido acético y agua bidestilada) en agitación constante (45 minutos y después cambios de solución a tiempos de 15-20 min). Se hizo un lavado final en agua destilada, para mantenerlo en dicha solución donde se puede conservar a 4°C. Los geles se colocaron en un fotodocumentador (Gel Doc™ EZ Gel Documentation System) para la captura de imagen de los mismos.

8.2.5 Western Blot

El segundo gel se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa o PVDF con poro de 0.22 μm durante 2 horas a 80 V, utilizando buffer de transferencia 1X (Metanol, SDS, Tris y glicina) en el cuarto frío. La transferencia se corroboró tiñendo una parte de la membrana con rojo de Ponceau y el gel en azul de coomasie.

El resto de la membrana se bloqueó con leche baja en grasa al 5% durante toda la noche en agitación constante a 4 °C o 1 hora a 37°C. La

membrana bloqueada se lavó con TBS-Tween²⁰ en agitación constante. Después del último lavado, se incubó la membrana con el anticuerpo primario (1:500 para α -PEX4 y 1:1000 para α -ASCL) preparado en leche baja en grasa al 5%, durante toda la noche en agitación constante a 4°C.

Después de la incubación, se lavó el anticuerpo con TBS- Tween²⁰ durante al menos 1 hora. Tras el último lavado se colocó el anticuerpo secundario HRP (Horseradish Peroxidase goat anti-rabbit de Jackson ImmunoResearch) durante 45 minutos a temperatura ambiente, en una dilución 1:10000 en TBS-Tween²⁰. El anticuerpo secundario se lavó con TBS-Tween²⁰ al menos 10 veces de 10 minutos cada una.

La membrana incubada con ambos anticuerpos se reveló inmediatamente o se conservó a 4°C en TBS- Tween²⁰.

El revelado se realizó utilizando la técnica convencional por placas autorradiográficas en cuarto oscuro con revelador y fijador (GBX-Carestream) o bien, en el equipo de quimioluminiscencia; utilizando en ambos casos el kit Sustrato Immobilon quimoiluminiscente de HRP para transferencias (luminol-H₂O₂) en volumen 1:1.

8.3 Inmunofluorescencia y microscopía confocal

En una placa de cultivo de seis pozos se colocó un cubreobjetos estéril con 3×10^6 trofozoítos por pozo, los cuales se dejaron adherir durante una hora; posteriormente, se lavaron con PBS estéril y se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante una hora. El exceso de fijador se eliminó con lavados de PBS y se permeabilizaron las células con Tritón al 0.2 %. Las células adheridas fueron lavadas y bloqueadas con suero fetal bovino al 5% durante una hora. El exceso de bloqueador se eliminó con lavados de PBS.

Subsecuentemente, los trofozoitos fueron incubados con el anticuerpo primario (α -PEX4 o α -ASCL) durante 12 horas, probando tres diluciones

diferentes (1:50, 1:100 y 1:200). El exceso de anticuerpo se eliminó con lavados de PBS previo a la incubación con el anticuerpo secundario acoplado a FITC durante una hora. Se eliminó el anticuerpo secundario y se lavó con PBS. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (dilución-1:7500). Los cubreobjetos se lavaron con PBS y se montaron en un portaobjetos con 10 μ l de Vectashield y se cubrieron de la luz hasta su observación en el microscopio confocal LSM700 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemania).

8.4 Inmunomicroscopía electrónica

A partir de 8×10^6 trofozoítos se formó una pastilla, misma que se fijó con paraformaldehído al 4 % más glutaraldehído al 0.5 % durante una hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, se eliminó el fijador y se hicieron lavados con PBS. Las células se deshidrataron en cambios de alcoholes graduales (50, 70, 90 y 100 %) de 10 minutos cada uno, excepto el OH 100%, del que se hicieron dos cambios.

Las células deshidratadas fueron pre-incluidas en resina LR-White proporción 1:1 con etanol al 100 % toda la noche. Posteriormente, la pastilla fue incluida en resina pura con tres cambios de una hora cada uno y se dejó durante 24 horas en este último cambio. Finalmente, el pellet de trofozoítos en resina pura se dejó polimerizar en luz UV a 4° C por dos días y los cortes fueron depositados en rejillas de Ni cubiertas con formvan, del que se hicieron cortes finos (60 nm) utilizando un ultramicrotomo. Las rejillas fueron bloqueadas con suero fetal bovino al 10 % durante una hora y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario (1:10 tanto para α -PEX4 como para α -ASCL) durante 24 horas en cámara húmeda a 4°C.

Los cortes fueron lavados con PBS y agua bidestilada previo a la incubación con el anticuerpo secundario α -Rabbit acoplado a una partícula de oro de 20 nm, preparado en dilución 1:30 en PBS.

Posterior a la incubación con el anticuerpo secundario, se realizan lavados con PBS y los cortes se contrastaron con acetato de uranilo y plomo; finalmente, los cortes contrastados se observaron al microscopio JEOL-JEM-1011.

9. Resultados

9.1 Análisis bioinformático de proteínas del peroxisoma y búsqueda de secuencias proteínas peroxisomales de *Giardia lamblia*

La base de datos KEGG tiene dos proteínas metabólicas del peroxisoma **MVK** y **ACSL**, identificadas para *G. lamblia*. Dichas proteínas fueron analizadas en diferentes programas y servidores en línea para su caracterización: alineamientos, predicción de estructura terciaria y de localización celular, identificación de dominios, empalme de estructuras en PDB, formación de interactomas y búsqueda de regiones inmunogénicas. Los resultados se muestran por proteína.

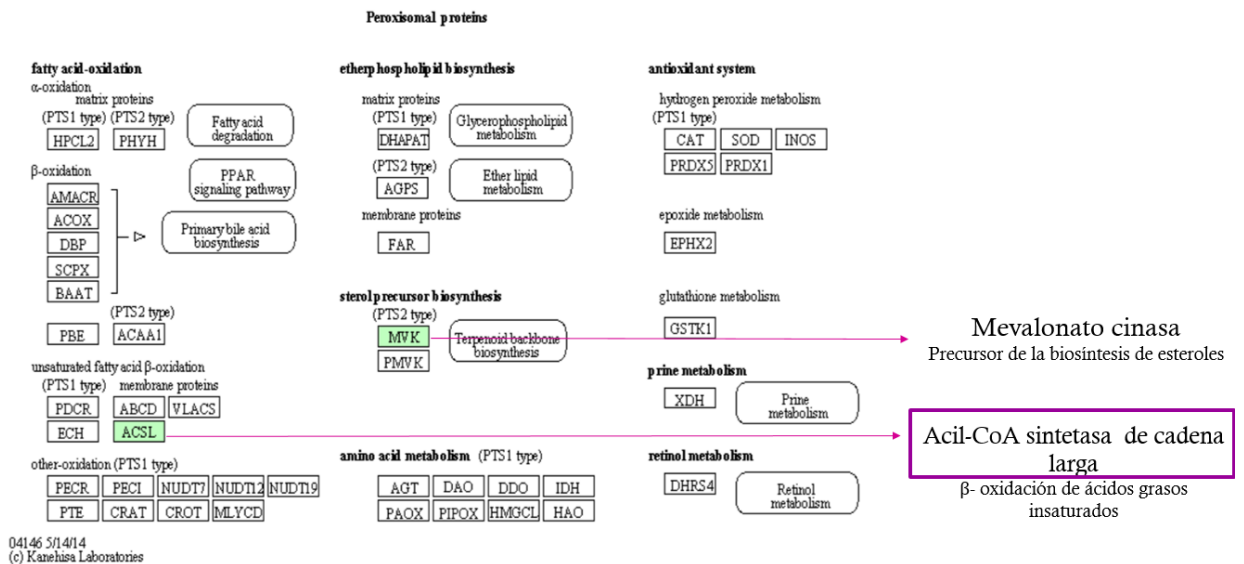


Fig. 9 Proteínas metabólicas que participan en diferentes funciones del peroxisoma (Vía modelo de la base de datos KEGG).

→ **MVK**

La mevalonato cinasa es una proteína multifuncional que participa en el metabolismo de terpenoides y poliquétidos, transporte celular, catabolismo y tiene funciones enzimáticas, principalmente como fosfotransferasa (Cuisset *et al.*, 2001; Hoffman *et al.*, 1986; 1993).

Esta enzima homodimérica se encuentra principalmente en peroxisomas de mamíferos y participa en la síntesis de colesterol mediante la vía 3-hidroxi-3-Metilglutaril-CoA donde transforma el mevalonato 5-fosfomevalonato (Cuisset *et al.*, 2001). Asimismo, participa en la biosíntesis de terpenoides, particularmente en relación a la formación de precursores de esteroides en donde también participa la enzima Fosfomevalonato cinasa (PMVK) (Biardi *et al.*, 1994).

La deficiencia de esta enzima causa aciduria mevalónica y el síndrome de hiperinmunoglobulemia D (Simon *et al.*, 2004; Haas *et al.*, 2001; Haas & Hoffmann 2006)

Tras realizar el blast utilizando la secuencia de *Trichomonas vaginalis* (tva) y de *Homo sapiens* (hsa) como referencia, identificamos a la MVK de *G. lamblia* (gla-K00869) que está constituida por 341 aminoácidos y su secuencia nucleotídica está compuesta por 1026 nucleótidos. La proteína cuenta con dos dominios GHMP, uno en el amino terminal y otro similar en la región carboxilo terminal.

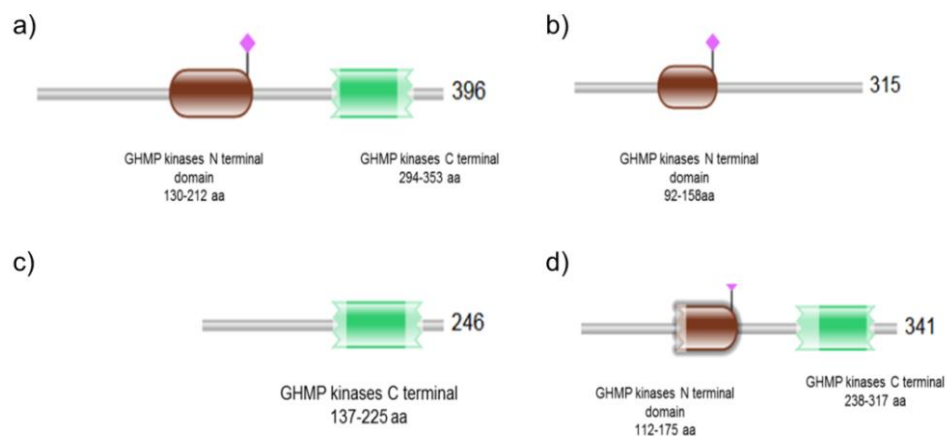


Fig. 10 Dominios de las proteínas MVK: a) *Homo sapiens*, b) *Trichomonas vaginalis*, c) *Naegleria gruberi*, d) *Giardia lamblia*.

Tomando como referencia la secuencia del humano y de *Giardia*, se realizó un alineamiento pareado en el servidor Needle, resultando 21.8% de identidad y 32.5% de similitud entre ambas secuencias (Fig. 11).

GL50803_4964	1	MPSLGPCLP---	LYVNTPLKALLSGEHSVYGHPCIAMALDLYTSGHARV	48
4598	1	-----MLSEVLLVSAPGKVLHGEHAVVHGKVALAVSLNLR	-----FLRL	41
GL50803_4964	49	AKDPTCPSSLPPPTL-----	LDIRTERLDSLSSMTEAIRLI	85
4598	42	QPHSNGRVDLPLNIGIKRAWVARIQSLDTSFLEQGDV	TFTSEQVEKL	91
GL50803_4964	86	NE-----EVLTRLP-----	TIKRSDAACHHCFEVIAVHWG	117
4598	92	KEVAGLPDDCAVTERLAVLAFLYLYLSICRKQALPS	LDIVV-----WSE	136
GL50803_4964	118	--LKGKLGSSASILVHTHALLAASNSYSPMLFD	-----	150
4598	137	LPPGAGLGSSAAYSVCLAAALLTVCEEI-FNPKDGD	CVNRWTRKEDLELI	185
GL50803_4964	151	--IALLGERNHGRTTGMDLKTVIYGGIYIYSHGALCNAKISPDIFAARM	-----	198
4598	186	NKWAFAQGERMIHGNPSGVDNAVSTWGGALRYHGKISLKRSP	-----A	229
GL50803_4964	199	IQVLIADSGIAKSTAQAVELVVSQGENNDLTAHIGETS	SKDLIELLTA--	245
4598	230	LQILLNTRKVERNTRALV----	AGVNRLLKFE----PEIVAPLLTSIDA	270
GL50803_4964	246	-----STPGKISNDSFYLLSALVQRNHLLCSLGVSVPE	TERSKE	286
4598	271	ISLECEVRLGEMGEAPAFQYLVLEELIDMNGHNLN	ALGVGHASLDQLCQ	320
GL50803_4964	287	LLYHMGCTAKLTGAGLGCCCGIFRTQHNLVVDSPDRHVI	AVGEGGLIM	336
4598	321	VTPAG-LHSKLTGAGGGCCITL-----	LRGL--	348
GL50803_4964	337	TDPQ-----		341
4598	349	-EQEVEATKQALTSQGFDCLETSIGAFVSIHSATS	LDLSDSRVQALDGL	396

Fig. 11 Alineamiento pareado de las proteínas mevalonato cinasa de *Homo sapiens* y *G. lamblia*.

Posteriormente, se tomaron los ortólogos de la mevalonato cinasa de 11 organismos para la realización de un alineamiento múltiple en Muscle (Fig.11). Asimismo, se realizó un alineamiento en Promals 3D para conocer las regiones más parecidas entre la secuencia del humano con la de *Giardia* y para ver la predicción de su estructura secundaria (Fig. 13).

gla:GL50803_4964 dme:Dme1_CG33671 ngr:NAEGRDRAFT_76883 mmu:17855 ssc:100152230 hsa:4598 ecu:ECU09_1780 ein:Eint_091800 tva:TVAG_424580 lma:LMF_31_0560 tcr:436521.9	--SMLFDIALLGERNHGRTTGMDLKTVIYGGIYIYSHGALCNA---KISPDIFAARMIQ NQALISWAYEERVNHTGTPSGLDNTVCTYGGMLRYVGGQ--FQSLRIQK-----PIN VLKYNMWSVFEELHGTFSGIDNSVTFGGVIFBQQKIQEFISFQILP-----NMR DKSINKWAFEGERYIHGNPSGVDNAVSTWGGALRFQCGTMSL---KSLD-----BLQ NLELINKWAFQGERMIHGNPSGVDNAVSTWGGALRYHGGKISPL---KRLP-----TLE DLELINKWAFQGERMIHGNPSGVDNAVSTWGGALRYHGGKISL---KRLP-----ALQ --PNMREAVAMENTFHKRSVGVSTCYSGGLISFKGVVKEKLVSDH---L--SQFK --SMTRELAIDMNGHNLNAGVGHASLDQLCVVTAHG--LHSLKLTGAGGGCGGITLLRPF --DFIORTKLELEKRFVGNPSGIDPATVYGGIIRNENRTLQVVK---L--PEVP --EENVLSAFVGGGGYHTPSGADNATAATYGLLILYRRNGKSVKFI---AFQORLY --DEVNLSAFVGGGGYHTPSGADNATAATYGLLILYRRNGVSNFCRV---LITRPLF : : : * * * * * :	gla:GL50803_4964 dme:Dme1_CG33671 ngr:NAEGRDRAFT_76883 mmu:17855 ssc:100152230 hsa:4598 ecu:ECU09_1780 ein:Eint_091800 tva:TVAG_424580 lma:LMF_31_0560 tcr:436521.9	VLIADSGIAKSTAQAVELVVSQGEN-NDT----LAHIGETSKDLIELLTA SPTPKISND ILLVDSRVSRTADIYAKVRLHGDAPFQLEIAEQACEELVAAPVL--YESFGNAQDSDS ILIVNTRVERNTKLIYQVRRERENNFYEKCLNDIONISEYLN--LKINSHLPSN ILLNTKVRPRSTKALVAVRSLRFPPEIVAPLLTSDAISELCERV--LGM-VAAPVP ILLNTKVRPRSTKALVAVRNRLKFPPEIVAPLLTSDAISELCERV--LGM-VAAPVP ILLNTKVRPRSTKALVAVRNRLKFPPEIVAPLLTSDAISELCERV--LGM-VAAPVP ILLNTKVRPRSTKALVAVRNRLKFPPEIVAPLLTSDAISELCERV--LGM-VAAPVP ILIFNSRIKNTFAAVRL-----GELNRELYDEIGRVSEAYWLLQ-----RE ILIFNSRIKNTFAAVRL-----GELNRELYDEIGRVSEAYWLLQ-----RE LLIVGTNRENRTRAVSHVRDLDTYPRVFKPLIKNSGDIINSFLEKSD-----SD LVVYGTGINSASTAKYVNDVHMGKQQQVQVFRILYDNYTHIVSGAREALQ-----KG LVVYGTGINSASTAKYVNDVHMGKQQQVQVFRILYDNYTHIVSGAREALQ-----KG : : : * * * * * :	gla:GL50803_4964 dme:Dme1_CG33671 ngr:NAEGRDRAFT_76883 mmu:17855 ssc:100152230 hsa:4598 ecu:ECU09_1780 ein:Eint_091800 tva:TVAG_424580 lma:LMF_31_0560 tcr:436521.9	SFYLTLSALVQRNHLLCSLGVSPETERSKELLYHMGCTAKLTGAGGGCGGIFRTQH SKFEQLERLQFINNLLKAIQVSHBPKLEQIPTAFKRG--FPELRTGAGGGYIVLLPEN ELRLKMEELIDMNGHNLNAGVGHASLDQLCVVTAHG--LHSLKLTGAGGGCGGITLLRPF EQYLVLEELIDMNGHNLNAGVGHASLDQLCVVTAHG--LHSLKLTGAGGGCGGITLLRPF EHLVLEELIDMNGHNLNAGVGHASLDQLCVVTAHG--LHSLKLTGAGGGCGGITLLRPF EQYLVLEELIDMNGHNLNAGVGHASLDQLCVVTAHG--LHSLKLTGAGGGCGGITLLRPF FTLELYLKRKSDLLDLGVCPDEMRKRVVRMRK--LGIEARTGTGAGGGHVTVVRKG FTLELYLKRKSDLLDLGVCPDEMRKRVVRMRK--LGIEARTGTGAGGGHVTVVRKG --RQVMDHLYFAHCLLSFGLSCHESEDIVKIA--VNNLSAKISGAGGIMLVTDGPDV --DLQRLGQLMNANHDLCRQIDVSCRELESIVOTCHTYGALGRLSGTGRGGIAVALAASS --NVRVFGELMNHNLKQELLTVSCAELDTIVNFCEGALGARMSTGRGLIVVALAASS : : * * * * * :
---	---	---	--	---	--

Fig. 12 Fragmento más conservado del alineamiento múltiple de las proteínas MVK.

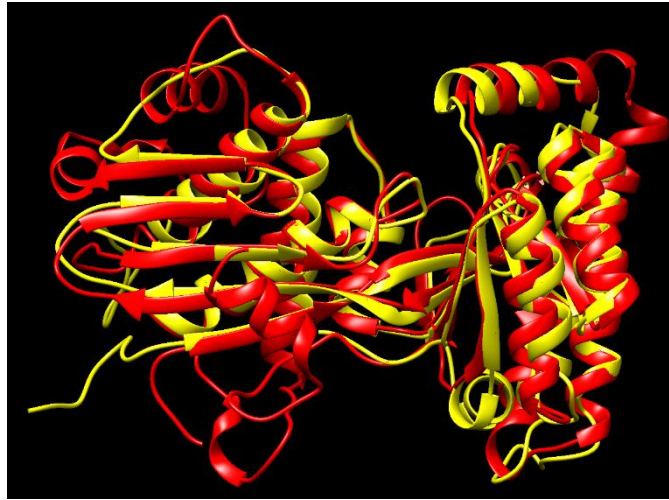


Fig. 15 Empalme en Chimera de las mevalonato cinasa de *H. sapiens* (rojo) y *G. lamblia* (amarillo).

El programa PSORT II nos indica el porcentaje de probabilidad que tiene una secuencia de localizarse en algún compartimento celular. Para el caso de la mevalonato cinasa el programa nos indica que la proteína tiene un 56.5% de localizarse en citoplasma, 30.4 % de estar en núcleo y 13 % de presentarse en mitocondria.

La mevalonato cinasa de *G. lamblia* tiene la capacidad de interactuar con proteínas relacionadas con la biosíntesis de precursores de esteroides como la hidroximetilglutaril CoA sintetasa, la acetil CoA acetiltransferasa, la farnesil difosfato sintasa, isopentenil difosfato delta-isomerasa (Fig. 16).

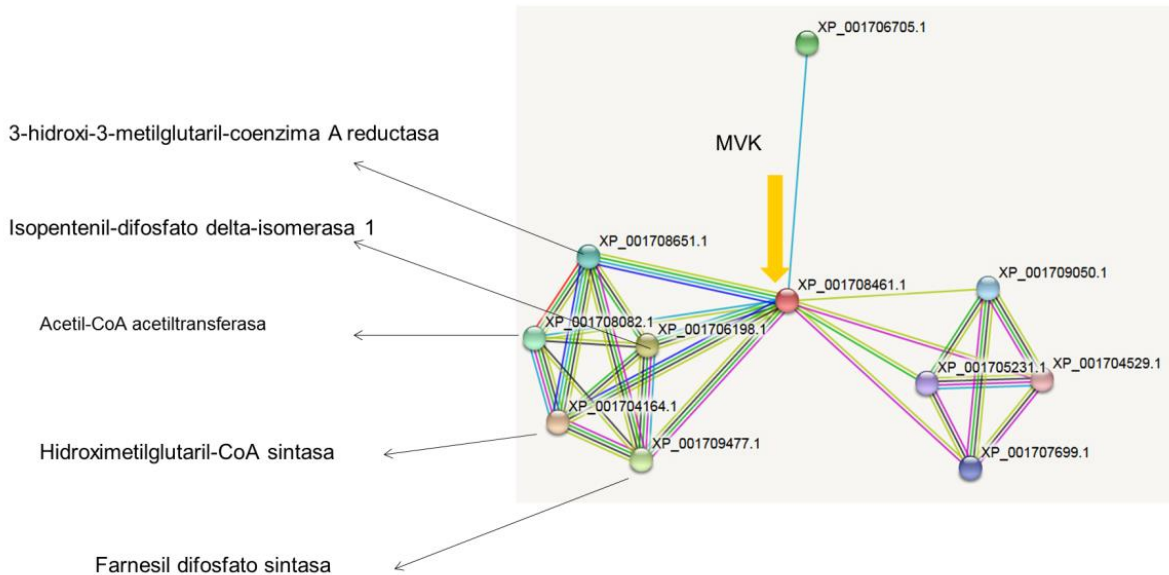


Fig. 16 Interactoma de la mevalonato cinasa de *G. lamblia* (String 2.0).

En este estudio se descartó a la mevalonato cinasa como candidata para la síntesis de péptidos, debido a que no presentó regiones altamente inmunogénicas.

→ **ACSL**

Las acil- CoA sintetasas de cadena larga son enzimas multifuncionales que participan principalmente en la degradación y metabolismo de ácidos grasos en mitocondria; en la biosíntesis y metabolismo de lípidos en exosomas y también tienen funciones en el peroxisoma. Conforman una familia de alrededor de 25 miembros, las cuales son sustrato y tejido específicas. La ACSL-4 se encuentra anclada a membranas en peroxisomas de hepatocitos de rata y en humanos se expresa en órganos productores de esteroides, principalmente en glándulas suprarrenales; su sustrato específico es el ácido araquidónico (AA) (Mashek, 2007; Yan *et al.*, 2015).

Para este trabajo, se utilizaron las secuencias de *H. sapiens*, *T. vaginalis* y *N. gruberi* como secuencias de referencias para blast (Fig. 17), encontrando en *G.lamblia* una proteína de 804 aa codificada por un gen de 2415 nucleótidos que está conformada por dos dominios de unión a AMP,

mismos que están presentes en la secuencia del humano, que está constituida por un solo dominio de unión a AMP (Fig. 18).

BLASTP Search Result

Database: gla

Protein sequence database entries related to hsa:2182 - 10 hits

Show alignment

Entry		K number	bits	E-val
Top 10	<input type="button" value="Clear"/>	Select operation	<input type="button" value="Exec"/>	
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_30476	Long chain fatty acid CoA ligase 4	K01897	212	6e-59
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_9062	Long chain fatty acid CoA ligase 5	K01897	203	5e-56
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_21118	Long chain fatty acid CoA ligase 5		160	1e-41
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_15063	Long chain fatty acid CoA ligase 5		155	2e-40
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_113892	Long chain fatty acid CoA ligase, putative		154	1e-39
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_17174	hypothetical protein		38.9	0.003
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_114609	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase		32.7	0.24
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_137748	hypothetical protein		28.1	5.7
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_4365	26S protease regulatory subunit 6A	K03065	27.7	5.9
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_113213	High cysteine membrane protein EGF-like		28.1	6.4

Fig. 17 Blast para la búsqueda de Acil-CoA sintetasas de cadena larga en *G. lamblia*.

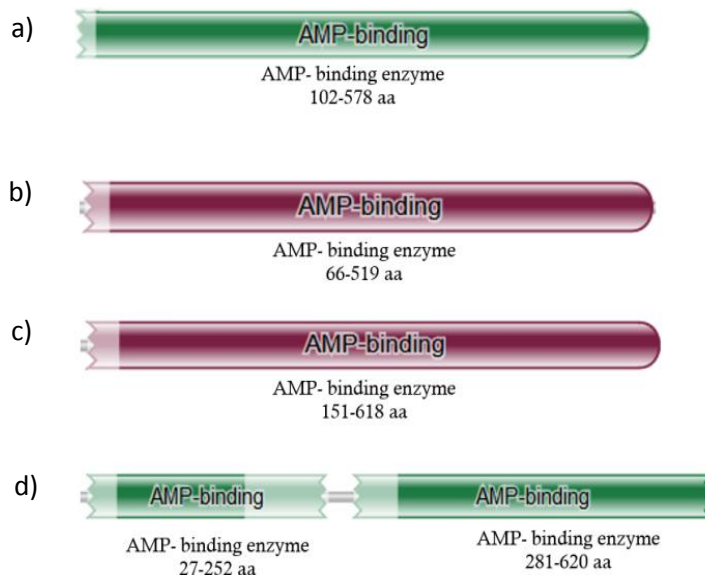


Fig. 18 Dominios de unión a AMP de las ACSL-4 de: a) *H. sapiens*, b) *T. vaginalis*, c) *N. gruberi*, d) *G. lamblia*.

Una vez que se identificaron los dominios para todas las secuencias, se hizo un alineamiento pareado para ver la similitud entre las mismas y posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple en MUSCLE (Fig. 19c).

Por otra parte, se realizó el alineamiento pareado en el servidor EMBOSS Needle, entre la secuencia de *G. lamblia* y la del humano, en el que comparten 21.8 % de identidad y 36.7 % de similitud. Asimismo, se hizo el mismo análisis pero comparando la secuencia de *G. lamblia* con la de *T. vaginalis*, donde comparten 22.8 % de identidad y 35 % de similitud (Fig.19 a-b).

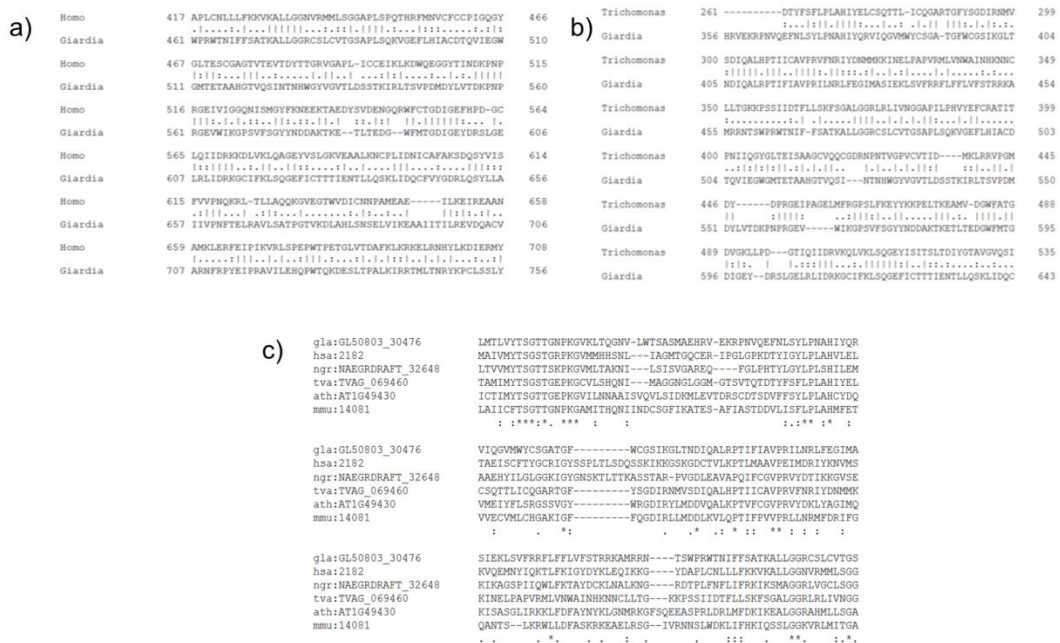


Fig. 19 Fragmentos de los alineamientos pareados de las ACSL-4 de: a) *H. sapiens* vs *G. lamblia*, b) *T. vaginalis* vs *G. lamblia*. c) Fragmento del alineamiento múltiple en Muscle: *G. lamblia* (gla), *H. sapiens* (hsa), *N. gruberi* (ngr), *T. vaginalis* (tva), *Arabidopsis thaliana* (ath), *Mus musculus* (mmu).

Para conocer la predicción de la estructura de ambas proteínas se realizó un alineamiento en PROMALS 3D (Fig. 20).

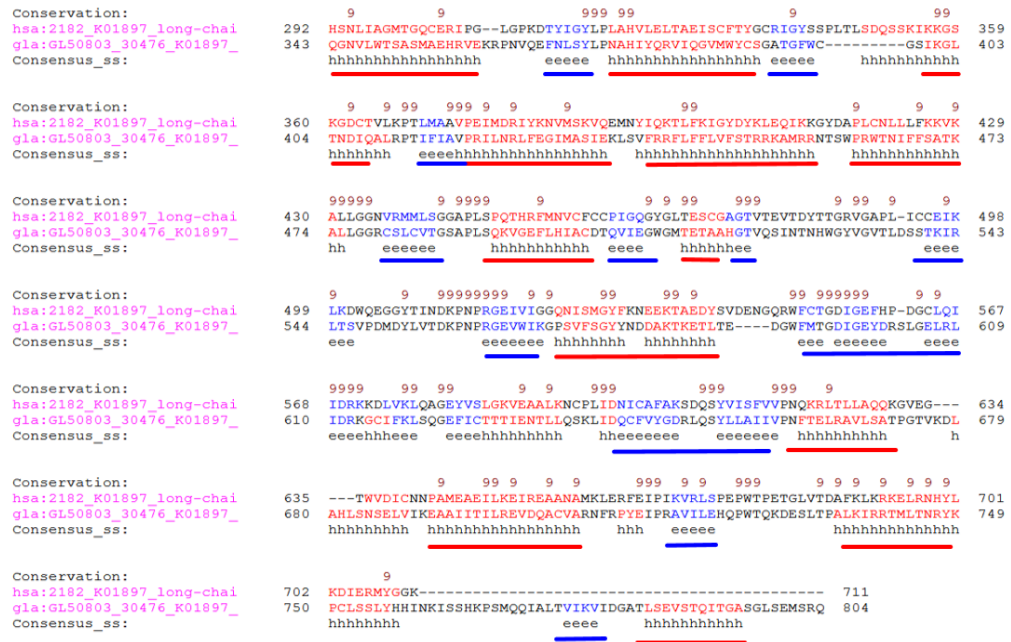


Fig. 20 Alineamiento en Promals 3D de las secuencias de *H.sapiens* y *G. lamblia* (9 es el valor más alto de identidad entre aminoácidos; rojo (h) son α -Hélices, azul (e) β -plegadas).

Asimismo, se realizó la predicción de las estructuras terciarias de las ACSL-4 de *H. sapiens*, *T. vaginalis*, *N. gruberi* y *G. lamblia* (Fig. 21); de igual forma, utilizando el programa PSORT II se buscó la predicción de la localización celular *in silico* encontrando que la ACSL-4 de *G. lamblia* tiene una gran posibilidad de asociarse a membranas, ya que tiene 33.3 % de probabilidad de asociarse a retículo endoplásmico, al aparato de Golgi o a la membrana plasmática.

Una vez obtenidos los PDB de la predicción de estructuras terciarias, se realizó el empalme de las proteínas utilizando el programa Chimera (Fig. 22).

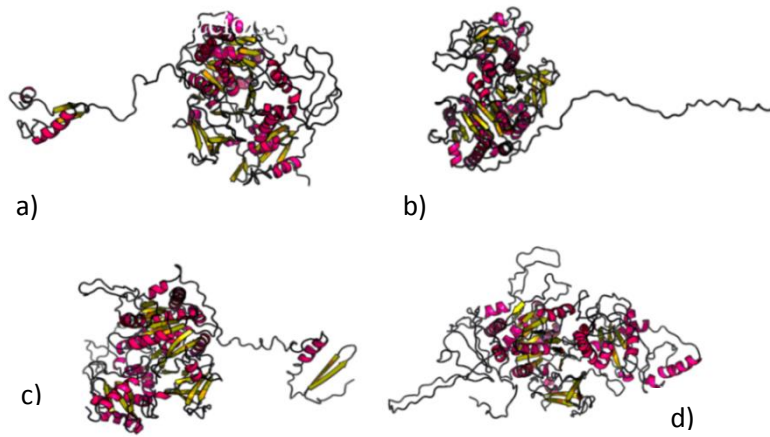


Fig. 21 Predicción de estructuras terciarias a) *H. sapiens*, b) *T. vaginalis*, c) *N. gruberi*, d) *G. lamblia*.

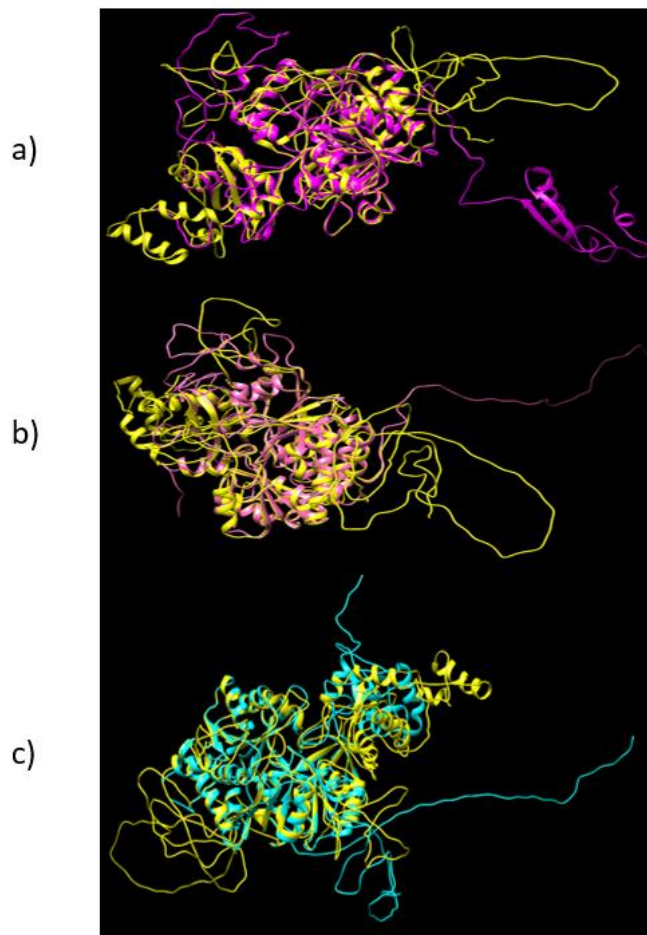


Fig. 22 Empalme de estructuras terciarias de las ACSL-4 *H. sapiens* (morado); *T. vaginalis* (rosa); *Mycobacterium* (azul); *G. lamblia* (amarillo).

Se generó el Interactoma para la ACSL-4 de *G. lamblia*, encontrando que esta proteína tiene la posibilidad de interactuar con otras relacionadas con la síntesis y degradación de ácidos insaturados, como la enzima alcohol deshidrogenasa, la acetil CoA acetiltransferasa y a la ACSL-5, entre otras.

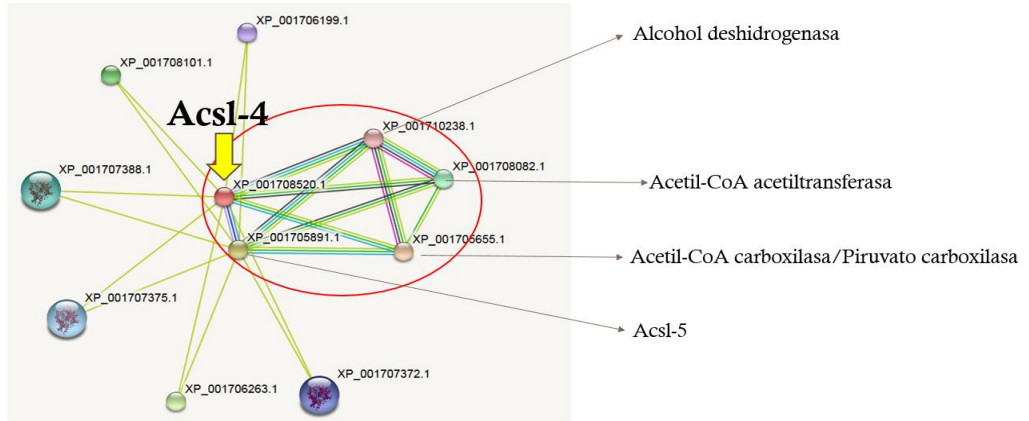


Fig. 23 Interactoma de la proteína ACSL-4 de *G. lamblia*.

PEROXINA 4

En las bases de datos donde se buscaron las secuencias de referencia, se encontraron alrededor de 34 diferentes peroxinas, no obstante en la vía de referencia del KEGG, aparentemente no existe ninguna peroxina reportada en *G. lamblia*. Por lo anterior, se hizo un blast para las 34 secuencias de peroxinas reportadas, encontrando en el proteoma de este parásito a la peroxina 4 (Fig. 24).

PEX-4 de *Giardia* es una proteína de 158 aminoácidos constituida por un dominio E2 enzima de conjugación a ubiquitina y de igual forma que otros organismos, carece del dominio típico de las peroxinas PEX (Fig. 25). Para *Arabidopsis thaliana* se ha descrito que esta enzima es muy importante para la biogénesis del peroxisoma, ya que es necesaria para la eliminación de proteínas obsoletas del peroxisoma y se encarga de la ubiquitinación de la Peroxina 5 y de su reciclaje.

BLASTP Search Result

Database: gla

Protein sequence database entries related to ath:AT5G25760 - 17 hits

Show alignment

Entry	K number	bits	E-val
Top 10 - Clear Select operation - Exec			
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_3978 Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	K10689	118	4e-34
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_15252 Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa 3		111	2e-31
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_12950 Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	K10573	103	5e-28
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_2876 UBC2, putative		97.8	4e-26
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_15162 Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa		94.7	4e-25
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_3171 UBCE14	K10575	86.7	5e-22
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_24068 UBC3	K10577	73.2	6e-17
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_27055 Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa 3		62.8	2e-13
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_31576 Ubiquitin-conjugating enzyme E2-21.2 kDa		58.5	8e-12
<input checked="" type="checkbox"/> gla:GL50803_5921 Ubiquitin-conjugating enzyme E2-28.4 kDa	K10578	46.6	3e-07

Fig. 24 Blast para la búsqueda de peroxina-4 en *G. lamblia*.

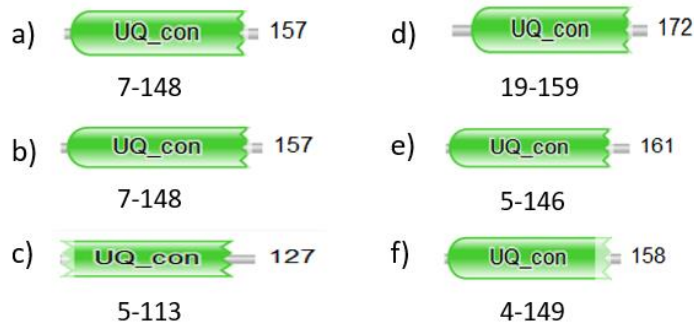


Fig. 25 Dominio ubiquitina en la peroxina-4 de a) *Arabidopsis thaliana*, b) *Fragaria vesca*, c) *Acanthamoeba castellanii*, d) *Trypanosoma brucei*, e) *N. gruberi*, f) *G. lamblia*

Además, se realizó un alineamiento pareado entre la secuencia de *Arabidopsis* y la de *Giardia*, encontrando entre ellas una identidad de 36.9 % y una similitud del 54.4 % (Fig 26).

Giardia	1	MENRLRNEYRVNKMKDALAKEGITIFPTASDNLSAWTISILTKDKDSPY	50
		.: .	
Arabidopsis	1	MAARLMKEYKVLQNEE----FEDILLYPRDESDLYRW-VAIIKGPDPPTY	45
Giardia	51	SGQTHTISVKIPRDYPLSPPECNFTTPMFHPNVKFANGEICLNILTKDDW	100
	: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .	
Arabidopsis	46	ENGFELDISVPTNYPLQPPTIKFVTKIFHPNIHFKTGEICLDLL-KTSW	94
Giardia	101	SPAISLISLAQSIAGLCSAPNTDSPINCSDASNLVKNGDVRAVRCICQYYY	150
		.: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .	
Arabidopsis	95	SAIYTLQSVCSRITALLSLPEADSPINCSDAGNLIRNGDVKGHDSLARM--	142
Giardia	151	KGEYTKVK--	158
		.: .: .	
Arabidopsis	143	---YTRLYGC	149

Fig. 26 Alineamiento pareado entre *Arabidopsis thaliana* y *Giardia lamblia*.

Por otra parte, se obtuvieron las secuencias de cinco organismos y se realizó un alineamiento múltiple en Muscle, obteniendo con las secuencias de *N.gruberi*, *T. vaginalis* y *A. thaliana* (Fig. 27). Asimismo, se realizó un alineamiento en Promals 3D para a la par de alinear, obtener la predicción de la estructura secundaria (Fig. 28).

```

Giardia          ---MENRLRNEYRNVNKMKDALAKEGITIFPTASDNLSAWTISILTKDKDSPYSGQTHTI
tva:TVAG_114480 -MRDAQRIKELRQKKDNDSD---E--IWLESEEDIRHW-YGMIKAPEDTAFAGHYFKL
ngr:NAEGRDRAFT_63289 --MASKRIMKEYNEIQKANQA---D--LVLQPDENNIYLW-YAKCIGPKGTCYEDGVFEL
Arabidopsis      ---MAARLMKEYKVLQNEEFE---DI--LLYPRDESPLYRW-VAIIKGPDPDTPYENGKFFEL
fve:101307268    MQASRARLFKEYKEVQREKVA---DPDIQLVCDSDSNIFKW-TALIKGPSETPFEGGIFQL
                  *: :* .  .: . :   :   .: : * .   : . . . :

Giardia          SVKIPRDYPLSPPECNFTTPMFHPNVKFANGEICLNILTKDDWSPAISLISLAQSIAGLC
tva:TVAG_114480 DIVLKDGYPIEPPQAKFITKIFHPNISFKDGTICLDIL-KTEWTPAWTINSLCTAIRLLL
ngr:NAEGRDRAFT_63289 KIQVPKEYPISAPKVEFITKIFHPNVHFESGEICMDIL-KDKWSPVWTLNVCRAIVSMM
Arabidopsis      DISVPTNYPLQPPTIKFVTKIFHPNIHFKTGEICLDLL-KTSWSAIYTLQSVCRSIIALL
fve:101307268    AFAVPEQYPLQPPQVRFLTKIFHPNVHFKTGEICLDIL-KNAWSPAWTLQSVCAIIALM
                  . :   **..*  * * :****: * * **::* * *.. :. :. :* :

Giardia          SAPN--TDSPLNCDASNLVKNGDVRVAVRCICQYYYKGEYTKVK-----
tva:TVAG_114480 SHPE--PDSPLNLAGNLLRYNDQIGYDSMAKFYAD-TYAPIKNTMKEAANNE
ngr:NAEGRDRAFT_63289 SNPKEGSDSPLNCDAGNLRNDDRGFNSMAKMYTK-LYATEKNLF--CRYNQ
Arabidopsis      SLPE--ADSPLNCDAGNLRNGDVKGHDSLARMYTR-LYG-----C----
fve:101307268    AHPE--PDSPLNCDSGNLLRAGDIKGYHSMARMYTRLAAMPKKG-----
                  : * : .***** :.**..* . . . . . *

```

Fig. 27 Alineamiento múltiple de la PEX-4 en Muscle: *Giardia lamblia* (gla), *Naegleria gruberi* (ngr), *Trichomonas vaginalis* (tva), *Arabidopsis thaliana* (ath), *Fragaria vesca* (fve).

```

Conservation:          9    99 99 9 9 9          9 99 9    99 9    9 999
gla:GL50803_3978_K10689_p 1 M---ENRLRNEYRNVNKMKDALAKEGITIFPTASDNLSAWTISILTKDKDSPYSGQTHTISVKIPRDYPL 67
ath:AT5G25760_K10689_per 1 MQASRARLFKEYKEVQREKVA---DIQLICDDTNIFKWTALIKGP-SETPYEGGVFLAFSVPEPYPL 66
Consensus aa:         M...csRL.pEY+pVp+bKsA.s...hbh.hsssNL..WTh.Ibs..p-oPYpG.h@plthpI PcsYPL
Consensus ss:         hhhhhhhhhhhhhhh eeeee eeeeeeee eeeeeeee

Conservation:          99 9 9 99999 9 99999 99 9999 9 9 9 9 9999999 99 9
gla:GL50803_3978_K10689_p 68 SPPECNFTTPMFHPNVKFANGEICLNILTKDDWSPAISLISLAQSIAGLCSAPNTD SPLNCDASNLVKNG 137
ath:AT5G25760_K10689_per 67 QPPQVRFLTKIFHPNVHFKTGEICLDILK-NAWSPAWTLQSVCAIIALMAHPEPDSPLNCDSGNLLRSG 135
Consensus aa:         pPPpPhFhT.hFHPNV+F.sGEICLsILp.ssWSPAhoLbSltptIhtLhthPpsD SPLNCDttNLl+sG
Consensus ss:         eeeee eee hh hhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhh

Conservation:          9    9
gla:GL50803_3978_K10689_p 138 -DVRVAVRCICQYYYKGEYTKVK 158
ath:AT5G25760_K10689_per 136 DVRGFSMAQMYTRLAAMPKKG 157
Consensus aa:         .s..hsphh.bYh.bt.hsK..
Consensus ss:         hhhhhhhhhhhhhhh hh

```

Fig. 28 Alineamiento pareado y predicción de estructura secundaria de la peroxina-4.

Además, se tomaron las secuencias de *A. thaliana*, *T. vaginalis*, *N. gruberi* y *G. lamblia* para realizar la predicción de sus estructuras terciarias, utilizando Raptor X (Fig. 29). A partir de esas predicciones, se obtuvieron los PDB para la realización del empalme de las peroxina-4 de *A. thaliana* y *G. lamblia* (Fig. 30).

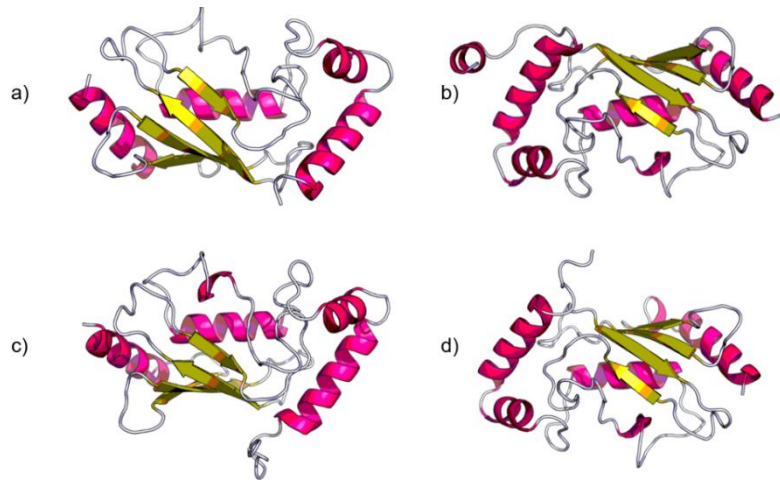


Fig. 29 Predicción de estructuras terciarias de la Pex-4 en Raptor X: a) *A. thaliana*, b) *T. vaginalis*, c) *N. gruberi*, d) *G. lamblia*.

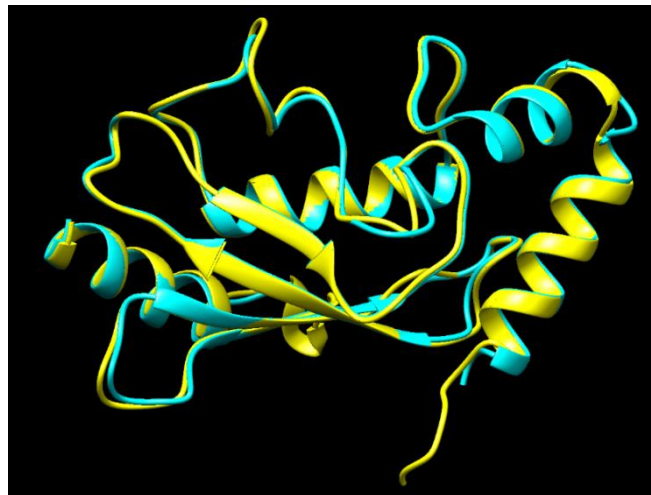


Fig. 30 Empalme de estructuras terciarias de *A. thaliana* y *G. lamblia*.

Finalmente, se realizó la predicción de la localización celular de la peroxina-4 de *Giardia* encontrando que tiene un 56.5 % de posibilidades de localizarse en el núcleo, 26.1 % en citoplasma, 13 % en la mitocondria (mitosomas) o en el citoesqueleto con 4.3%. Asimismo, se realizó un Interactoma para la PEX-4 de *Giardia* encontrando que esta proteína tiene la posibilidad de interactuar con las proteínas del sistema de ubiquitinación como la E1, E3A y ubiquitina (Fig. 31).

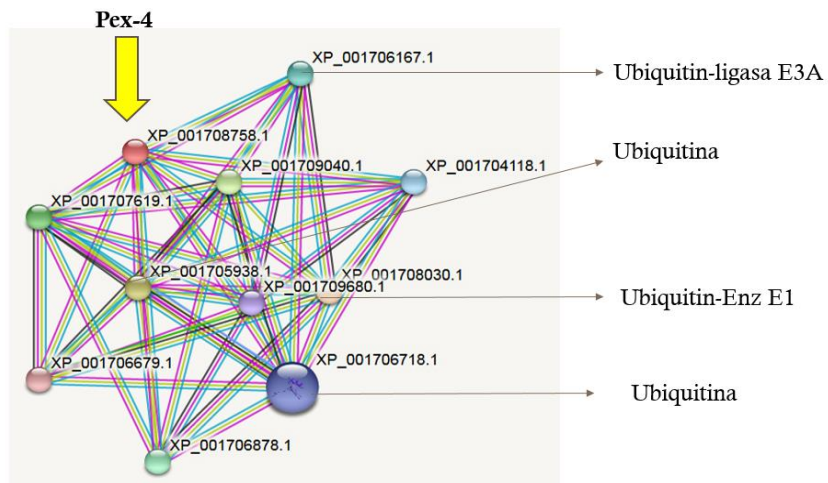


Fig. 31 Interactoma de la peroxina-4 de *G. lamblia*.

9.2 Identificación de regiones inmunogénicas para la síntesis de péptidos candidatos para anticuerpos

Las secuencias de las proteínas candidatas (ACSL-4 y PEX-4) fueron analizadas en el programa ABCPred para la identificación de regiones inmunogénicas, resultando una región de 16 aminoácidos (aa) para la ACSL-4 y de 20 aa para la PEX-4 (Fig.32). Dichas regiones fueron identificadas en la predicción de la estructura terciaria utilizando el programa Chimera.

>gla:GL50803_30476 Long chain fatty acid CoA ligase 4 [EC:6.2.1.3]; K01897 long-chain acyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.3] (A)

```
MTFLIPFEAFEFVDDSIATISRLFCQRALKTPRRRCLGTRFLARNDENPEARQDYEYWSYLDVLRMSSELYGLQAIQIGQGDHAGI
MSANRVEWALVDLACSGALGVVTPYDITLSLDTDFIANDSHVTVFLDLTLHTWSTAALSCPMMVKTVLFDYDRYDRWFLHKAWA
HATKIKHPLPSSVPVAYKSFEECDADDRVDGIAFERALTPAEKAKHAGTKIRYPRRLVCNSIPSEQVDDPFTCQYTYLPSLEVSHDLDKT
GSPINVLHLVSYLHGVMACGRKASAYRQVDFRKAAYLSPDTLTPVYALDLTGDDLMTLVYTSQTTGNPKGVKLTQGNVNLWTSAS
MAEHRVEXKRPNVQEFNLISYLPNAHIYQRIQGVMMWYCSGATGFVWCGSISKGLTNDIQALRPTFIAPRILNRLFEGIMASIEKLSVFR
RFLFFLVFSTRKAMRRINTSWPRWTFNIFSATKALLGGRCSLCVTGSAPLSQKVGFEFLIACDTQVIEGWGMTETAHGTQVQSINT
NIHWGYGVTLDSSTKIRLTSVPDMYLDKPNPRGEVWIKGPFVSGYNDDAKTETLEDGWFMTGDIGEYDRSLGELRLIDR
KGCIFKLSQGEFCTTIENTLLQSKLIDQCIFYGDRLQSYLLAIIVNPFTELRAVLSATPGTVKDLAHLNSSELVKEAAITILREVDDQACV
ARNFRPYEIPRAVILEHQPWTQKDESLTPALKIRRTMLTNRYPCLSSLYHHINKISHKPSMQQALTVIKVIDGATLSEVSTQITGAS
GLSEMSRQ
```



>gla:GL50803_3978 Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa [EC:6.3.2.19]; K10689 peroxin-4 [EC:2.3.2.23] (A)

```
MENRLRNERNVNMKDALAKEGITTPASDNLSAWTSILTCKDKDPSYSGQHTHSIKIPRDYPLSPPECNFTFPMFH
NVKFMGEICLNLTKDDWSPAISLISLAQSIAGLCSAPNTDNLNCDASNLKNGDVRVRAVICQYYKGEYTKVK
```

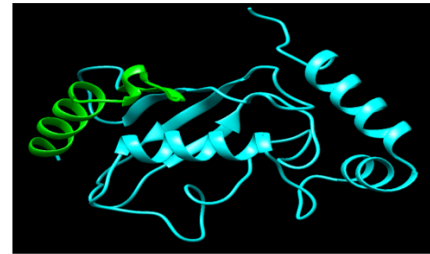


Fig. 32 Regiones inmunogénicas de ACSL-4 (morado) y Pex-4 (azul) de *Giardia lamblia*.

Los péptidos se sintetizaron en la compañía bioquímica BioChem en Shanghái, China. Ambos fueron producidos con una pureza del 98% y están acoplados a KLH (hemocianina de la lapa californiana *Megathura crenulata*, del inglés keyhole limpet hemocyanin) para hacerlos más inmunogénicos.

Para el péptido de la ACSL-4 se utilizó glutaraldehído como agente de acoplamiento y fue liofilizado en urea, mientras que la proteína PEX-4 se acopló con glutaraldehído y se liofilizó en PBS pH 7.4.

9.3 Producción y titulación de anticuerpos policlonales

Se inmunizaron dos conejas de la raza Nueva Zelanda con los péptidos producidos para las proteínas ACSL-4 y PEX-4, administrándose 485.5 µg y 285 µg respectivamente en cada inmunización. De la punción cardiaca se obtuvieron 80 ml de sangre total y de ésta se colectaron 37 ml para la proteína ACSL-4 y 35 ml para la PEX-4.

Los anticuerpos fueron titulados mediante Western blot probando diferentes diluciones (1:500, 1:1000, 1:3000 y 1:5000), resultando 1:3000 el mejor título para la ACSL-4 y 1:500 para la PEX-4.

9.4 Electroforesis y Western blot en extractos totales

Se probaron extractos totales de *G. lamblia* en tres concentraciones de proteína (20, 40 y 60 µg/µl) en una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% para ver el patrón proteico. Para el caso de la ACSL-4 se hicieron geles al 10% y para la pex 4 al 12.5 % (Fig. 33). Para ambas proteínas se hicieron tres réplicas con su duplicado para Western blot.

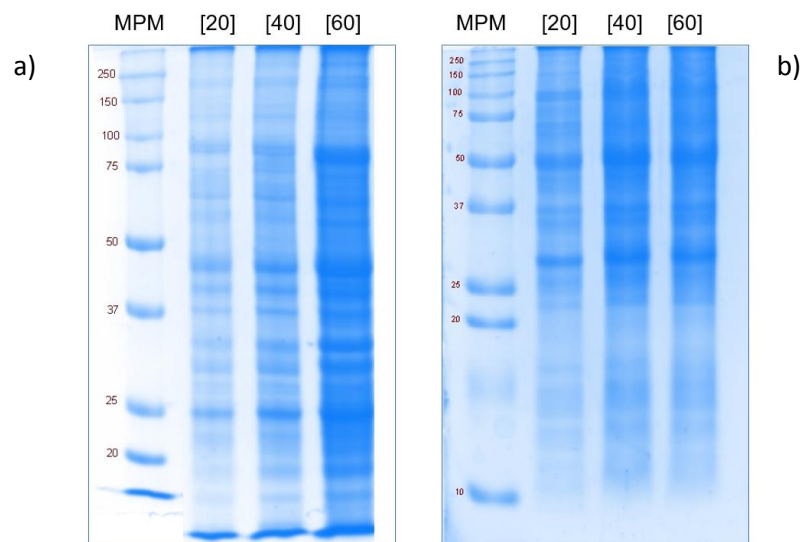


Fig. 33 Perfil proteico de extractos totales de *Giardia lamblia*: a) ACSL-4, b) Pex-4.

Mediante Western blot se detectó una proteína de 90 kDa para la ACSL-4 en las tres concentraciones probadas, mientras que para la PEX-4, se identificó una banda de 17 kDa, siendo para ambos casos, los pesos esperados según el análisis bioinformático en Expasy. Para los ensayos de Western blot, se utilizó un anticuerpo anti β -tubulina como control de carga (1:1000), que tiene un peso de 55 kDa.

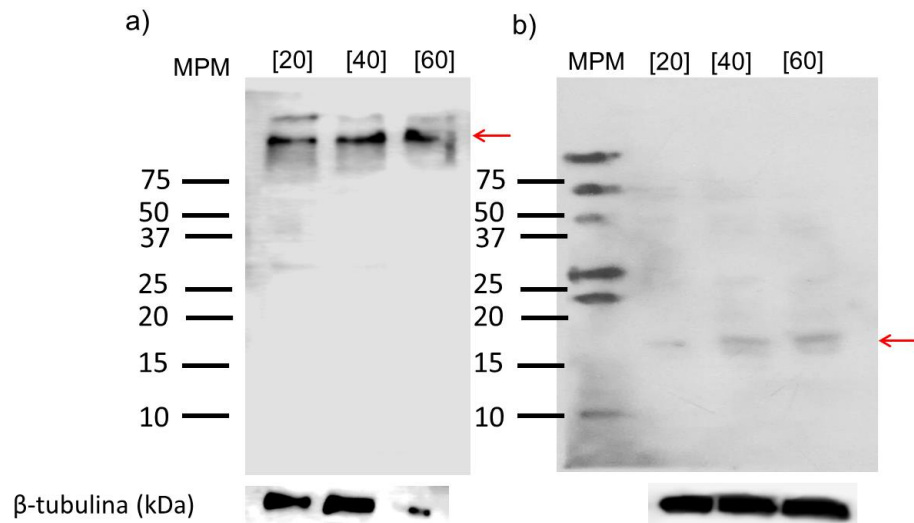


Fig. 34 Western blot de las proteínas candidatas: a) ACSL-4 (90 kDa), b) PEX-4 (17 kDa), c) Control de carga (β -tubulina).

9.5 Microscopía confocal

Se realizaron inmunofluorescencias por triplicado utilizando tres diluciones (1:50, 1:100 y 1:200) del suero inmune ACSL-4 y PEX-4, utilizando en ambos casos, el anticuerpo secundario isotiocianato de fluoresceína (FITC por sus siglas en inglés), fluorocromo cuya longitud de onda de excitación es 490nm y de emisión de 525 nm.

La proteína ACSL-4 se localizó de manera abundante en el citoplasma, con acumulaciones en algunas regiones que podrían sugerir que se encuentra en algún sitio compartimentalizado. Si bien en las tres diluciones probadas hubo marca, consideramos que la mejor dilución para este ensayo es 1:50 (Fig. 35).

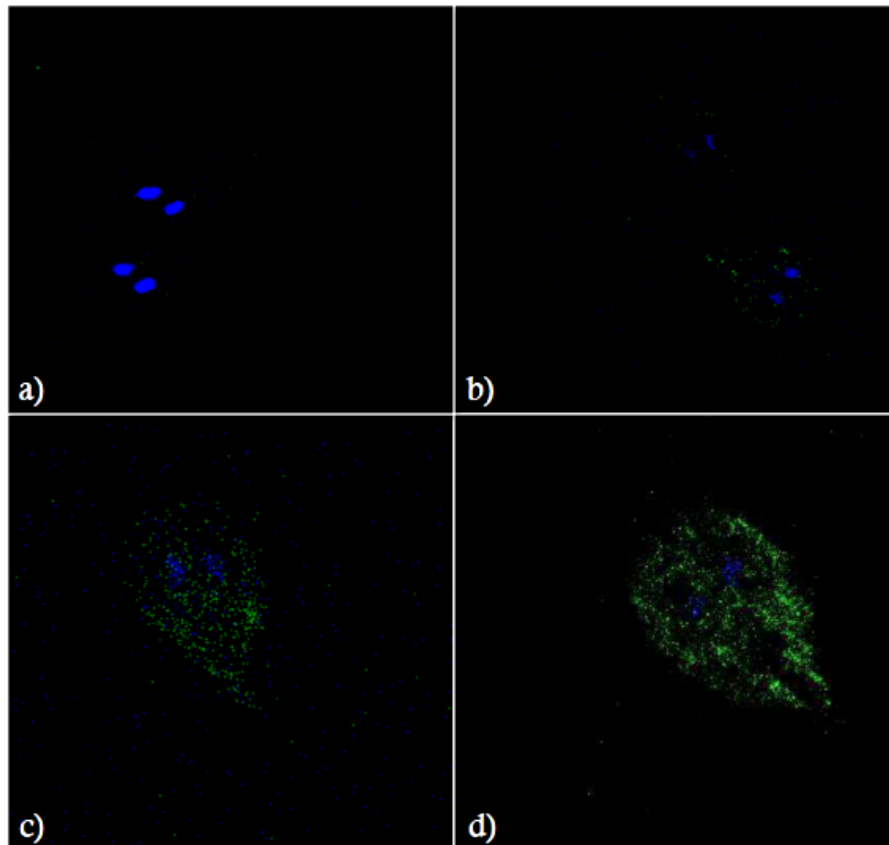


Fig. 35 Inmunofluorescencia para identificar la proteína ACSL-4 de *G. lamblia*: a) control sin anticuerpo primario, b) dilución 1:200, c) dilución 1:100, d) dilución 1:50. Núcleos teñidos con DAPI.

Como era de esperarse por la predicción de la localización celular por bioinformática, la PEX-4 se encuentra mayormente distribuida en la región citoplásmica y a los núcleos. Al igual que con la ACSL-4, la mejor dilución fue 1:50.

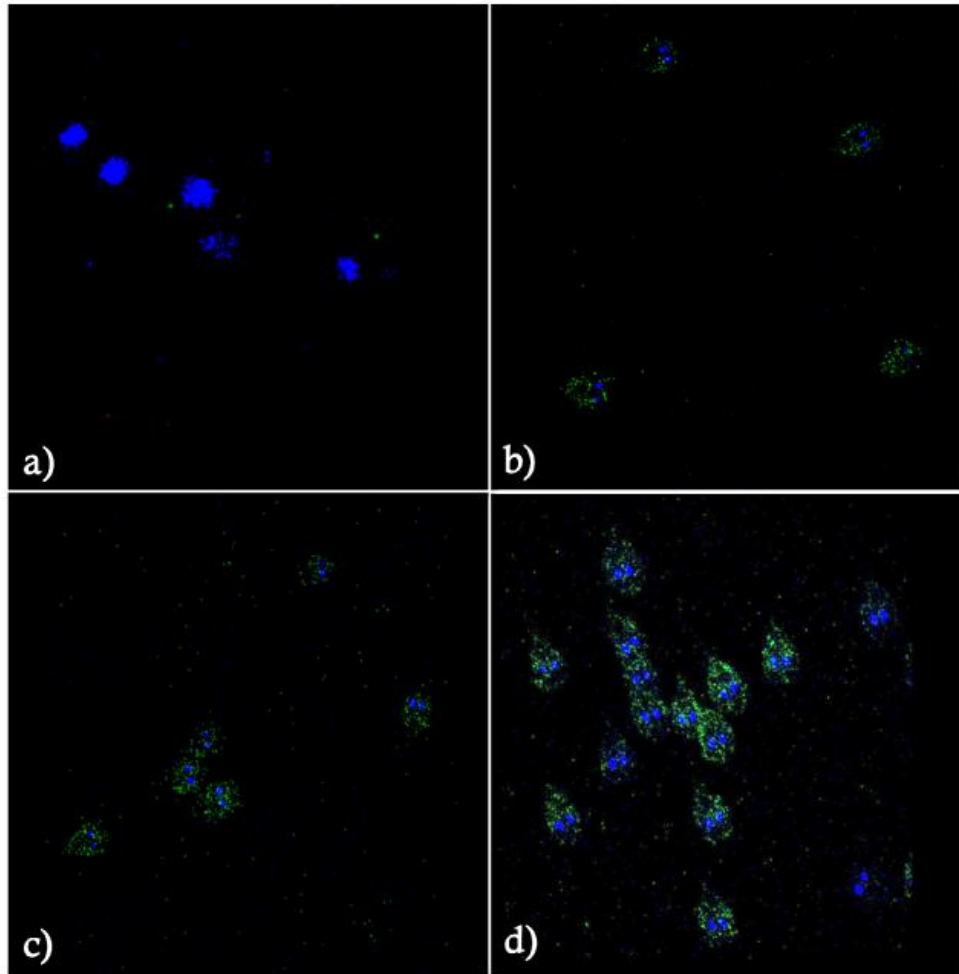


Fig. 36 Inmunofluorescencia para identificar a la PEX-4 de *G. lamblia*: a) control sin anticuerpo primario, b) dilución 1:200, c) dilución 1:100, d) dilución 1:50. Núcleos teñidos con DAPI.

9.6 Inmunomicroscopía electrónica

Para asegurar la especificidad de la localización las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a oro como control. Como se muestra en la Fig. 37 a-b, no se detectó ninguna marca. La proteína ACSL-4 se identificó en citoplasma (Fig. 37 c-d) y adosada a la membrana de una estructura “peroxisoma-like” (Fig. 37 e-f).

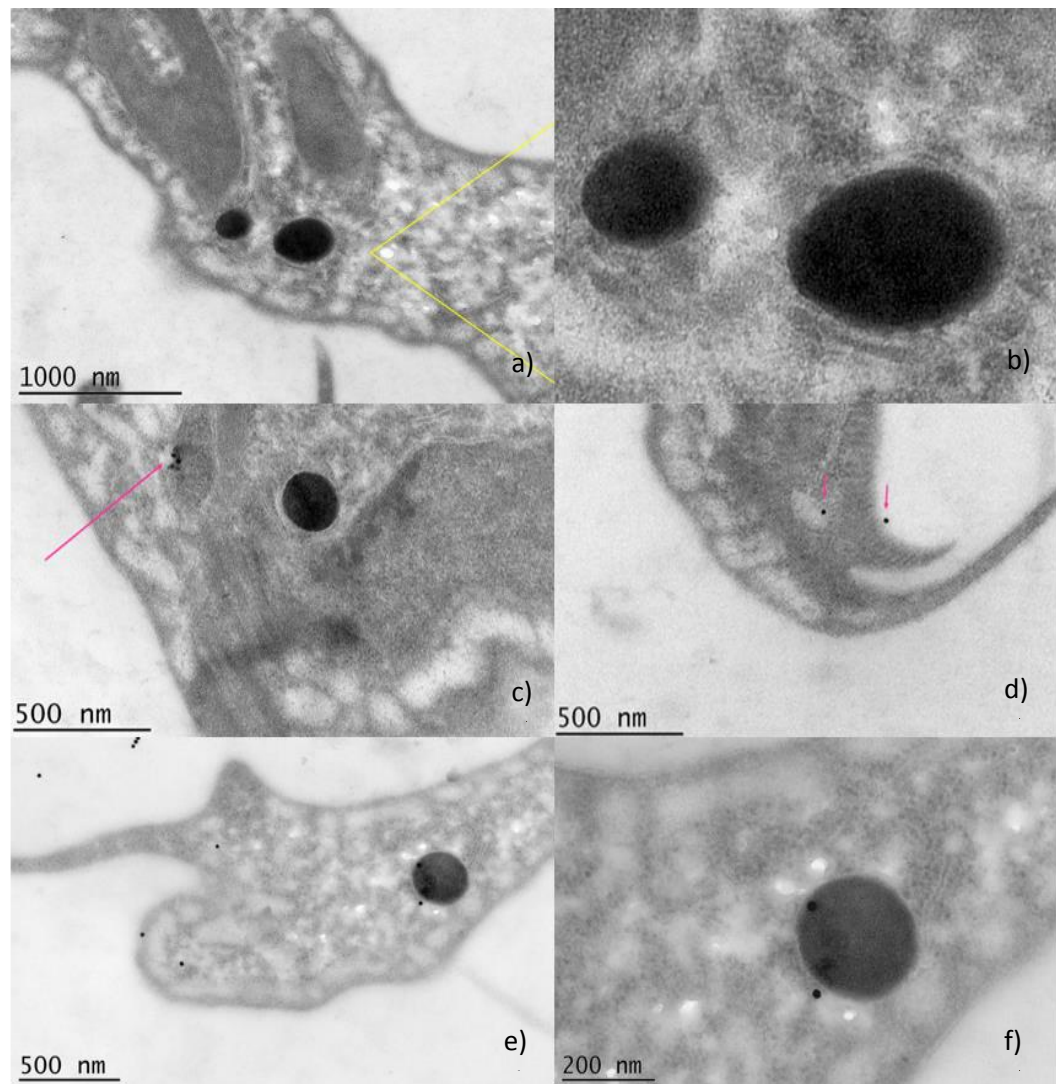


Fig. 37 Inmunomarcage de la proteína ACSL-4 de *G. lamblia*: a-b trofozoitos control sin anticuerpo primario, c-f: Trofozoitos con anticuerpo primario.

La PEX-4 fue localizada en citoplasma, encontrándose en retículo endoplásmico y cerca de la membrana de la célula (Fig. 38 a-b) y cercana a los sitios donde están los “peroxisoma-like”, así como dentro de ellos (Fig. 38 c-f).

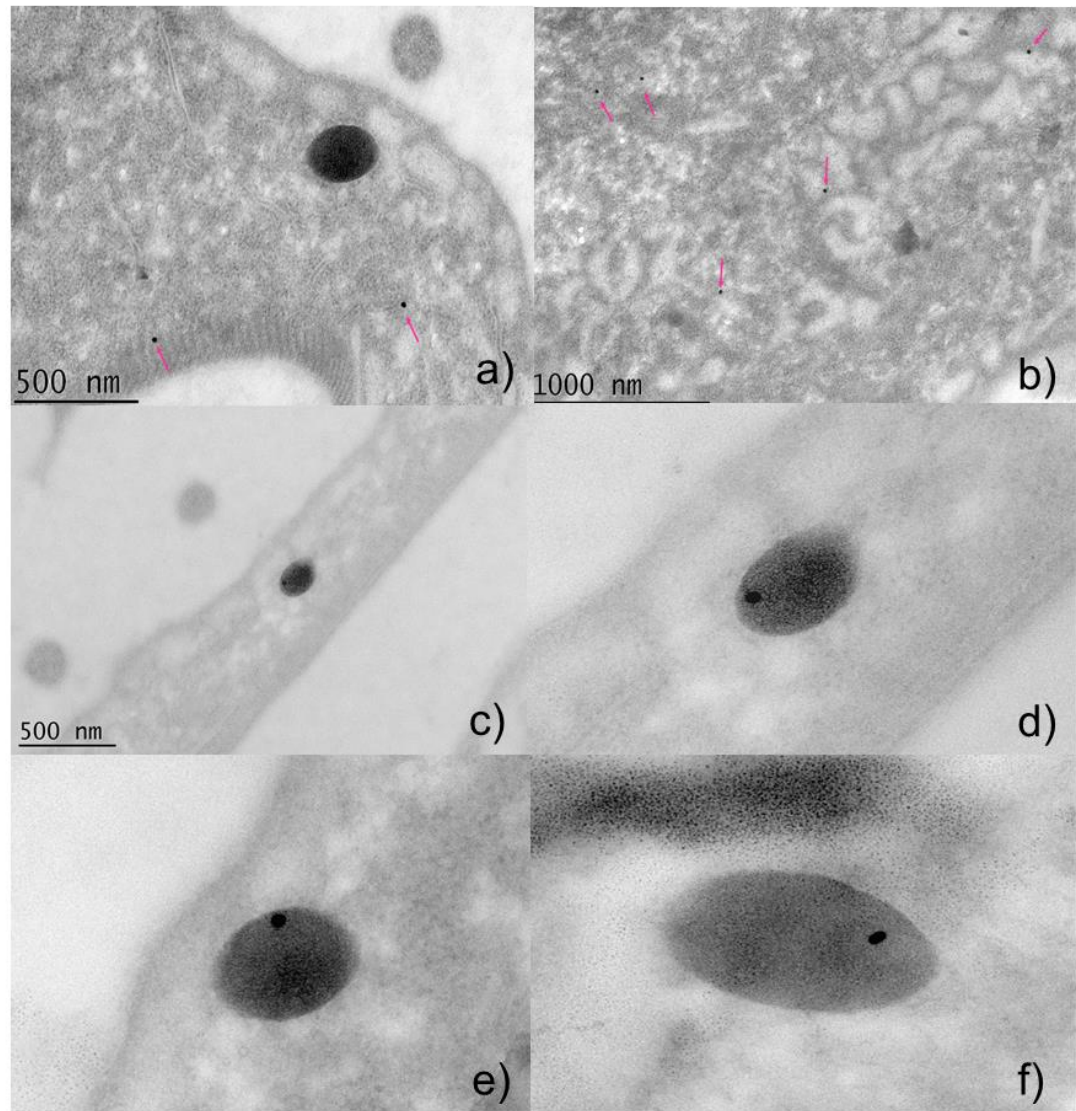


Fig. 38 Inmunomarcaje de la proteína PEX-4 de *G. lamblia*: a-b trofozoitos control sin anticuerpo primario, c-d Trofozoitos con anticuerpo primario.

10. DISCUSIÓN

La compartimentalización en organelos celulares ha sido clave para el entendimiento de la evolución de las células eucariontes y es una diferencia fundamental con las células procariotas. Dependiendo del tipo celular y el organismo del que se trate, los organelos pueden variar en forma, tamaño, función y presencia o ausencia, incluso en un mismo organismo.

A diferencia de otros organelos, los peroxisomas carecen de caracterizaciones particulares, debido principalmente a su gran diversidad y multifuncionalidad intraespecífica. Los peroxisomas son organelos de membrana simple encargados de hasta más de diez funciones en una misma célula, por ejemplo, en vertebrados, se sabe que se encargan principalmente de la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, de la β -oxidación de ácidos grasos y del metabolismo de aminoácidos, purinas y retinol, etcétera; por lo que estos organelos son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis celular.

Desde su descubrimiento y caracterización bioquímica, los peroxisomas fueron denominados así por la presencia de al menos una enzima catalasa y una oxidasa (Rhodin, 1954; de Duve & Baudhuin, 1966). Mediante el uso de herramientas bioinformáticas se sabe que hay organismos que carecen de una u otra proteína y tienen peroxisomas, como es el caso de algunos protistas parásitos (Gabaldón, 2016). Por lo anterior, en la actualidad, se considera que, para que un organelo sea denominado peroxisoma debe tener proteínas que participen en la biogénesis del mismo, en particular, las peroxinas (Moyersoen *et al.*, 2004; Gabaldon, 2010; Smith and Aitchison, 2013).

A la fecha se han identificado alrededor de 34 diferentes peroxinas, que solas o en conjunto, participan en los diferentes mecanismos de biogénesis del organelo (importación de proteínas de membrana a partir del retículo endoplásmico, el reciclamiento de proteínas obsoletas y de receptores de membrana, importe de proteínas de matriz y la división peroxisomal).

Estos mecanismos participan en la síntesis *de novo* o en la fisión de peroxisomas maduros, vías típicas para la formación de peroxisomas (Moyersoen *et al.*, 2004; Schlüter *et al.*, 2006; Smith & Aitchison, 2013).

Históricamente se ha dicho que el enteroparásito *Giardia lamblia* carece de peroxisomas (Adam, 2001, Gabaldon, 2014). No obstante, Matronícola *et al.*,(2014) encontraron cuatro diferentes isoformas de la peroxirredoxina (PRDX), proteína típica del sistema antioxidante de los peroxisomas, que también se encuentra en alta proporción en mitocondrias y dispersa en citoplasma de las células de algunos organismos, como el humano.

Por su parte, mediante inmunomarcaje de fluorescencia y electrónico, la Dra. Bibiana Chávez encontró la localización subcelular de la PRDX-1 asociada a unas vesículas que denominó “peroxisoma-like” (datos no publicados). Este hallazgo sugeriría la presencia de organelos similares a peroxisomas en *G. lamblia*.

Con base en lo anterior, en este trabajo realizamos la búsqueda bioinformática en diferentes bases de datos (KEGG, NCBI, *GiardiaDB*, etc.) de las proteínas típicas de peroxisomas presentes en eucariontes filogenéticamente cercanos y lejanos a *G. lamblia*, con la finalidad de identificar proteínas peroxisomales que pudieran sustentar la presencia del organelo en este parásito.

Se analizaron las secuencias de proteínas típicas de peroxisomas por blast, identificación de dominios funcionales, alineamientos pareados y múltiples, predicción y empalme de estructuras terciarias, predicción de la localización subcelular e interactoma para la elección de proteínas candidatas en *G lamblia*.

En la base KEGG identificamos a la mevalonato cinasa (MVK) y la Acil-CoA sintetasa de cadena larga- 4 (ACSL-4) en *Giardia lamblia* (Fig. 8), ambas, proteínas metabólicas de peroxisomas involucradas en la biosíntesis de precursores de esteroides y en la β -oxidación de ácidos grasos insaturados, respectivamente.

Debido a que ninguna base de datos identifica proteínas peroxisomales de biogénesis para este parásito, se realizó blast para las secuencias de las 34 peroxinas disponibles en la literatura, identificando la presencia de la peroxina-4 (Enzima E2 de conjugación a ubiquitina) en *G. lamblia*, proteína involucrada en la biogénesis del organelo principalmente en plantas.

De las proteínas identificadas por bioinformática, se buscaron las mejores regiones inmunogénicas para evaluar su efectividad en la producción de anticuerpos policlonales, resultando como nuestras mejores candidatas la ACSL-4 y la PEX-4.

Se sintetizaron péptidos específicos para las dos proteínas y se produjeron anticuerpos policlonales en conejos. Con los sueros inmunes se identificó la presencia de ACSL-4 y la PEX-4 en extractos totales de trofozoítos, mediante Western blot. Además, se realizó la búsqueda de la localización subcelular de ambas proteínas tanto por inmunofluorescencia como por inmunomicroscopía electrónica.

La acil- CoA sintetasa de cadena larga-4 (ACSL-4) es una proteína multifuncional involucrada en las vías de degradación y biosíntesis ácidos grasos, en el metabolismo de proteínas para salida por exosomas y también tiene funciones en el peroxisoma. La ACSL-4 es una proteína que en hígado de rata se encuentra adosada a la membrana del peroxisoma (Mashek, 2007).

En *G. lamblia* la ACSL-4 está constituida por 804 aa y tiene dos dominios de unión a AMP (Fig. 17d). Mediante el análisis por microscopía confocal encontramos que esta proteína se encuentra principalmente en el citoplasma, dispersa y en cúmulos, lo que podría sugerir su presencia en algún compartimento celular. Por otra parte, por medio de inmunomicroscopía electrónica, fue localizada en la membrana de los “peroxisoma-like”, dispersa en citoplasma y cercana a retículo endoplásmico en los trofozoítos de *Giardia*.

En células de mamífero, las membranas de los peroxisomas contienen al menos dos ACSL sintetasa: una acil CoA sintetasa de cadena larga que activa ácidos grasos de cadena larga y una acil CoA sintetasa de cadena muy larga, la cual activa ácidos grasos de cadena muy larga, ambas con la capacidad de catalizar el metabolismo de los ácidos grasos con sus sitios activos expuestos hacia el citosol; estas proteínas también pueden encontrarse en mitocondrias o en retículo endoplásmico (Reddy & Mannaerts, 1994).

Con base en nuestros resultados, podemos inferir la importancia que tiene la ACSL-4 en el metabolismo de ácidos grasos en *Giardia lamblia*. Aunado al hallazgo de la localización celular de esta proteína en el parásito, podemos establecer que en conjunto con las proteínas identificadas en el Interactoma (Fig. 22) la ACSL-4 participa en la degradación de ácidos grasos en conjunto con la ACSL-5 y que, de igual forma que la ACSL-4 de rata, se encuentra en la membrana de los “peroxisoma-like”.

Ninguna base de datos identifica la presencia de alguna proteína involucrada en el proceso, lo cual pudiera deberse a la premisa de que este parásito carece de peroxisomas. No obstante, tras realizar el análisis con las secuencias de las diferentes peroxinas que se encuentran en la literatura, identificamos a la PEX-4 de *G. lamblia*. Esta proteína está constituida por 158 aminoácidos y contiene un único dominio E2 enzima de conjugación de ubiquitina y de igual forma que otros organismos, carece del dominio PEX, típico de las peroxinas.

Arabidopsis thaliana es el eucariote superior en el que se encuentra esta proteína y de la que se sabe es indispensable para la biogénesis del peroxisoma, debido a que se encarga de la eliminación de proteínas obsoletas del peroxisoma y se encarga de la ubiquitinación de la Peroxina 5 y de su reciclaje (Baker & Graham, 2002; Mano & Nishimura, 2002; Nito *et al.*, 2007; Lingard *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2012).

En este trabajo la PEX-4 de *G. lamblia* se encontró dispersa en citoplasma por microscopía confocal (Fig. 34) y por inmunomicroscopía electrónica, se identificó dispersa en citoplasma, cercana a retículo endoplásmico y membrana plasmática, así como cercana a las estructuras “peroxisoma-like” e incluso dentro de ellos (Fig. 36).

Las peroxinas son proteínas importantes en la biogénesis del peroxisoma, ya que solas o en complejos, participan funciones esenciales como la formación de la membrana, el mantenimiento de receptores de superficie, tráfico de proteínas, interacción con el retículo endoplásmico, entre otras (Moyersoen *et al.*, . 2004; Schlüter *et al.*, ., 2006; Smith & Aitchison 2013). Si bien una característica importante de las peroxinas es la presencia de un dominio PEX en la región amino terminal, se ha reportado en la literatura que existen algunas peroxinas que carecen de este dominio como es el caso de la peroxina-4 (Nito *et al.*, 2007; Lingard *et al.*, 2009).

La historia evolutiva de *G. lamblia* la ha situado como uno de los organismos eucariontes más antiguos, debido principalmente a que se encuentra en la rama basal del árbol de la vida, por lo que incluso ha sido considerada como una especie clave en la transición de los procariontes y los eucariontes. Por tal motivo, este parásito ha sido catalogado como un “fósil viviente” (Graczyk, 2005) o una célula simple y desprovista de muchas de las características que tienen células eucariontes superiores (filogenéticamente hablando) como los hongos, las plantas y los vertebrados.

Gracias a herramientas bioinformáticas, hoy sabemos que *Giardia* tiene un inventario de genes meióticos que son la evidencia de eventos sexuales en *Giardia*, datos con los que se pudo establecer un origen temprano de la meiosis (Ramesh *et al.*, 2005). De igual forma, se pudo evidenciar la ausencia de mecanismos de endocitosis (Zamponi *et al.*, 2016). Aunado a ello, mediante tinción de plata y microscopía confocal, se descubrió la presencia de nucléolo en el parásito (Jiménez-García *et al.*, 2008).

En este trabajo fue posible identificar proteínas peroxisomales en *G. lamblia*, con herramientas bioinformáticas, destacando dos proteínas, la ACSL-4 y la PEX-4. Elaboramos anticuerpos policlonales contra ellas y describimos su localización subcelular en el citoplasma y en estructuras denominadas “peroxisoma-like”.

Nuestro laboratorio ha identificado la presencia de al menos cuatro proteínas peroxisomales en *Giardia lamblia*, tres de las cuales son metabólicas: PRDX-1 (Datos no publicados, Chávez-Munguía *et al.*), MVK (identificada únicamente por bioinformática) y ACSL-4 (presente trabajo), así como la proteína de biogénesis PEX-4. Nuestra perspectiva a futuro es la obtención y purificación de las estructuras “peroxisoma-like”, para su análisis por espectrometría de masas para determinar si *G. lamblia* tiene un organelo similar a los peroxisomas de otras células eucariontes.

11. CONCLUSIONES

Mediante herramientas bioinformáticas, se identificaron las proteínas metabólicas mevalonato cinasa y a la acil CoA sintetasa de cadena larga-4 (ACSL-4); esta última además, fue identificada por Western blot en extractos totales del parásito, y se localizó subcelularmente por microscopía confocal e inmunomicroscopía electrónica en citoplasma, retículo endoplásmico y en la membrana de “peroxisoma-like”.

Asimismo se identificó a la proteína Peroxina-4 (PEX-4) mediante el mismo procedimiento experimental que la ACSL-4, pero localizándose dispersa en citoplasma, retículo endoplásmico y dentro de los “peroxisoma-like”.

Aunado a la identificación de la peroxirredoxina-1 estas proteínas conformarían el primer repertorio de proteínas identificadas en *Giardia lamblia* bajo la perspectiva de los peroxisomas, poniendo en controversia la premisa de que este parásito carece de tal organelo.

Las perspectivas de este trabajo abarcan la obtención y purificación de los “peroxisoma-like”, así como su análisis por espectrometría de masas, para su profunda caracterización en conjunto con imágenes de microscopía confocal e inmunoelectrónica de transmisión. Además, se pretende analizar las funciones que se verían afectadas en el parásito si se silenciaban los genes que codifican para las proteínas identificadas en este trabajo.

11. REFERENCIAS

- Adam, R. D. (2001). The *Giardia lamblia* genome. *International Journal for Parasitology*, 30, 475-484.
- Angermüller S., H.D. Fahimi. (1981). Selective cytochemical localization of peroxidase, cytochrome oxidase and catalase in rat liver with 3,3'-diaminobenzidine. *Histochemistry* 71: 33-44.
- Angermüller S., H.D. Fahimi. (1988). Heterogenous staining of d-amino acid oxidase in peroxisomes of rat liver and kidney. *Histochemistry* 88, 277-285.
- Baker A. & Graham I. (2002). Plant Peroxisomes. Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, the Netherlands.
- Biardi, L., A. Sreedhar, A. Zokaei, N. B. Vartak, R. L. Bozeat, J. E. Shackelford, G. A. Keller, and S. Krisans. (1994). Mevalonate kinase is predominantly localized in peroxisomes and is defective in patients with peroxisome deficiency disorders. *The Journal of Biological Chemistry*. 269: 1197–1206.
- Chávez-Munguía, B. (2004). The Ultrastructure of the Cyst Wall of *Giardia lamblia*. ed. A. M. P. Roberto Cedillo Rivera,. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 220-226.
- Chávez-Munguía, B., M. Omaña-Molina, M. González-Lázaro, A. González-Robles, R. Cedillo-Rivera, P. Bonilla & A. Martínez-Palomo.(2007).Ultrastructure of cyst differentiation in parasitic protozoa. *Parasitology Research*, 100, 1169-1175.
- Cuisset L., Drenth J.P., Simon A. Molecular analysis of MVK mutations and enzymatic activity in hyper-IgD and periodic fever syndrome. *European Journal of Human Genetics*. 9:260–266.
- de Duve C., Baudhuin P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiological Reviews*. 46, 323–357.
- Eckert, J. H. and Erdmann, R. (2003). Peroxisome biogenesis. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 147, 75-121

- Galeh, T. M., A. Kazemi, M. Mahami-Oskouei, B. Baradaran, A. Spotin, S. Sarafraz & M. Karamat (2016) Introducing nitazoxanide as a promising alternative treatment for symptomatic to metronidazole-resistant Giardiasis in clinical isolates. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9, 866-871.
- Gabaldón T, Capella-Gutiérrez S. (2010). Lack of phylogenetic support for a supposed actinobacterial origin of peroxisomes. *Gene*. 1; 465:61-5.
- Gabaldón T., M.L. Ginger & P.A. Michels. (2016). Peroxisomes in parasitic protists. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 465(1–2):61–65
- Gabaldón, T. (2014). Evolutionary considerations on the origin of peroxisomes from the endoplasmic reticulum, and their relationships with mitochondria. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 71: 2379–2382.
- Graczyk T.K. (2005). Is *Giardia* a living fossil?. *Trends in Parasitology*. 21(3):104-7.
- Haas D, Kelley RI, Hoffmann GF. (2001). Inherited disorders of cholesterol biosynthesis. *Neuropediatrics*.32:113–122.
- Haas D., G. F. Hoffmann. (2006). Mevalonate kinase deficiencies: from mevalonic aciduria to hyperimmunoglobulinemia D syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 1: 13.
- HGNC. HUGO Gene Nomenclature Committee <http://www.genenames.org>
- Hoffmann G, Gibson K.M., Brandt I.K., Bader P.I., Wappner R.S., Sweetman L. (1986). Mevalonic aciduria-an inborn error of cholesterol and nonsterol isoprene biosynthesis. *The New England Journal of Medicine*.314:1610–1614.
- Hoffmann G.F, Charpentier C, Mayatepek E. (1993). Clinical and biochemical phenotype in 11 patients with mevalonic aciduria. *Pediatrics*. 91(5):915-21

- Hu J., A. Baker, B. Bartel, N. Linka, R.T. Mullen, S. Reumann, B.K. Zolman. (2012). Plant Peroxisomes: Biogenesis and Function. *The Plant Cell Online*. Vol. 24, Issue 6
- Jarrad, A. M., A. Debnath, Y. Miyamoto, K. A. Hansford, R. Pelingon, M. S. Butler, T. Bains, T. Karoli, M. A. T. Blaskovich, L. Eckmann & M. A. Cooper (2016) Nitroimidazole carboxamides as antiparasitic agents targeting *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 120, 353-362.
- Jiménez-García, L. F., G. Zavala, B. Chávez-Munguía, M. D. P. Ramos-Godínez, G. López-Velázquez, M. D. L. Segura-Valdez, C. Montañez, A. B. Hehl, R. Arguello-García & G. Ortega-Pierres (2008). Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. *International Journal for Parasitology*, 38, 1297-1304.
- Kaur N., Reumann S., Hu J. (2009). Peroxisome biogenesis and function, in The Arabidopsis Book, Rockville, MD: *American Society of Plant Biologists*.
- Keeling P. J., Burger G., Durnford D. G., Lang B. F., Lee R. W., Pearlman R. E., Roger A. J., Gray M. W. (2005). The tree of eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution*. 20, 670–676.
- Keister D.B. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 77(4):487-8.
- Lingard M.J., Monroe-Augustus M., Bartel B. (2009). Peroxisome-associated matrix protein degradation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:4561-4566.
- Litleskare, S., K. A. Wensaas, G. E. Eide, K. Hanevik, G. E. Kahrs, N. Langeland & G. Rortveit (2015). Perceived food intolerance and irritable bowel syndrome in a population 3 years after a *Giardiasis*-outbreak: a historical cohort study. *Bmc Gastroenterology*, 15.

- Mano, S., Nakamori, C., Hayashi, M., Kato, A., Kondo, M. and Nishimura, M. (2002) Distribution and characterization of peroxisomes in Arabidopsis by visualization with GFP: dynamic morphology and actin-dependent movement. *Plant and Cell Physiology*. 43: 331–341.
- Mastronicola D., M. Falabella, F. Testa, L. P. Pucillo, M. Texeira, P. Sarti, L. M. Saraiva & A. Guiffrè. (2014). Functional Characterization of Peroxiredoxins from the Human Protozoan Parasite *Giardia intestinalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 8(1): e2631.
- Mashek D.G., L. O. Li, R. A. Coleman. (2007). Long-chain acyl-CoA synthetases and fatty acid channeling. *Future Lipidol*. 2(4): 465–476.
- Moyersoer 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.
- Nito K., Kamigaki A., Kondo M., Hayashi M., Nishimura M. (2007). Functional classification of Arabidopsis peroxisome biogenesis factors proposed from analyses of knockdown mutants. *Plant and Cell Physiology*. 48:763-774.
- Opperdoes F. R., Borst P. (1977). Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Letters*. 80, 360–364.
- Parasites: *Giardia*, Prevention & Control". Centers for Disease Control and Prevention. CDC. Retrieved February 16, 2017
- Ramesh M.A., S.B. Malik, J.M. Jr. Logsdon. (2005). A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Current Biology*. 26; 15(2):185-91.
- Reddy J.K., G.P. Mannaerts. (1994). Peroxisomal lipid metabolism. *Annual Review of Nutrition*. 14:343-70.

- Rhee S.G., Woo H.A., Kil I.S., Bae S.H. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. (2012). *Journal of Biological Chemistry*. 287:4403–4410.
- Rhee, S.G. (2016). Overview on Peroxiredoxin. *Molecules and Cells*. 31; 39(1): 1–5.
- Rhodin J. (1954). Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal tubule cells of the mouse kidney Stockholm, Sweden. Thesis. Karolinska Institutet
- Ryan, U. & S. M. Caccio (2013) Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*, 43, 943-956.
- Simon A, Kremer HP, Wevers RA, Scheffer H, De Jong JG, Van Der Meer JW, Drenth JP. (2004). Mevalonate kinase deficiency – Evidence for a phenotypic continuum. *Neurology*. 62:994–997.
- Schluter A., S. Fourcade., R. Ripp, J.L. Mandel, O. Poch & A. Pujol. (2006). The evolutionary origin of peroxisomes: An ER-peroxisome connection. *Molecular Biology and Evolution*. 23:838–845
- Smith, J.J. & J. D. Aitchison (2013). Peroxisomes take shape. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 14:803–817.
- Till A., Lakhani R., Burnett S. F., Subramani S. (2012). Pexophagy: the selective degradation of peroxisomes. *International Journal of Cell Biology*. 512721 10.1155/2012/512721
- Tolbert, N.E. & E. Essner. (1981). Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *The Journal of Cell Biology*. 91:271-283.
- Tree of Life Web Project. 2008. *Giardia* Kunstler. Version 02 September 2008 (temporary). <http://tolweb.org/Giardia/97370/2008.09.02> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- Vicentini, F., P. Matile. (1993). Gerontosomes, a multifunctional type of peroxisome in senescent leaves. *The Journal of Plant Physiology*. 142, 50-56.
- Yan S., X.F. Yang, N. Fu, Y. Ouyan, K. Qing. (2015). Long-chain acyl-CoA

synthetase in fatty acid metabolism involved in liver and other diseases: an update. *World journal of gastroenterology*. 21(12):3492-8.

Zamponi N., C. Feliziani, M.C. Touz. (2016). Endocytosis in *Giardia*: Evidence of Absence. *Trends in Parasitology*.32 (11), 838-840.

13. ANEXO 1 Proteínas peroxisomales presentes en diferentes organismos

	Representante	P. de biogénesis	P. metabólicas
Mammalia	<i>Homo sapiens</i>	Pex 1, Pex 2, Pex 3, Pex 5, Pex 6, Pex 7, Pex 10, Pex 11a, Pex 11b, Pex 11g, Pex 12, Pex 13, Pex 14, Pex 16, Pex 19, Pex 26	HPCL2, PHYP, AMACR, ACOX, DBP, SCPX, BAAT, PBE, ACAA1, PDCR, ABCS, VLACS, ECH, ACSL, PECD, PECD, NUDT7, NUDT12, NUDT19, PTE, CRAT, CROT, MLYCD, AGPS, FAR, MVK, PMVK, AGT, DAO, DDO, IDH, PAOX, PIPOX, HMGCL, HAO, CAT, SOD, INOS, PRDX, EPHX2, GSTK1, XDH, DHRS4
	<i>Mus musculus</i>	Pex 1, Pex 2, Pex 3, Pex 5, Pex 6, Pex 7, Pex 10, Pex 11a, Pex 11b, Pex 11g, Pex 12, Pex 13, Pex 14, Pex 16, Pex 19, Pex 26	HPCL2, PHYP, AMACR, ACOX, DBP, SCPX, BAAT, PBE, ACAA1, PDCR, ABCS, VLACS, ECH, ACSL, PECD, PECD, NUDT7, NUDT12, NUDT19, PTE, CRAT, CROT, MLYCD, AGPS, FAR, MVK, PMVK, AGT, DAO, DDO, IDH, PAOX, PIPOX, HMGCL, HAO, CAT, SOD, INOS, PRDX, EPHX2, GSTK1, XDH, DHRS4
Plantae	<i>A. thaliana</i>	Pex 4, Pex 1, Pex 2, Pex 3, Pex 5, Pex 6, Pex 7, Pex 10, Pex 12, Pex 13, Pex 14, Pex 16, Pex 19	HPCL2, PHYH, ACOX, ACAA1, PDCR, ECH, ACSL, NUST12, MYLCD, FAR, MVK, AGT, IDH, PIPOX, HMGCL, HAO,
Fungi	<i>S. cerevisiae</i>	PEX1, PEX3, PEX5, PEX6, PEX2, PEX10, PEX12, PEX13, PEX14, PEX7, PEX14, PEX19, MVP17	HPCL2, ACOX, ACAA1, PDCR, ABCD, ACSL, PECD, NUD12, CRAT, AGT, IDH, MVK, CAT, SOD
Protista	<i>Neospora caninum</i>	Pex1, Pex 5	CTA1, FOX1, FOX 2, PXA1/2, FAA1

<i>Toxoplasma gondii</i>	Pex 1, Pex 5	CTA1, FOX1, FOX 2, PXA1/2, FAA1
<i>Babesia bovis</i>		FAA1
<i>Paramecium tetraurelia</i>	Pex 1, Pex 5, Pex 10	CTA1, FOX1, FOX 2, PXA1/2, FAA1
<i>Tetrahymena thermophila</i>	Pex 1, Pex 2, Pex 5, Pex 10	CTA1, FOX1, FOX 2, PXA1/2, FAA1
<i>Albugo laibachii</i>	Pex 1, Pex 2, Pex 5	CTA1, FOX1, FOX 2, PXA1/2
<i>Phytophthora ramorum</i>	Pex 2, Pex 10	CTA1, FOX1, FOX 2, PXA1/2
<i>Phytophthora infestans</i>	Pex 1, Pex 2, Pex 5, Pex 10	CTA1, FOX1, FOX 2, PXA1/2, FAA1
<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	Pex 2, Pex 5, Pex 10	CTA1, FOX1, FOX 2, PXA1/2, FAA1
<i>Pythium ultimum</i>	Pex 1, Pex 2, Pex 5, Pex 10	CTA1, FOX1, FOX 2, PXA1/2, FAA1
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Pex 1, Pex 5, Pex 10	CTA1, FOX1, FOX 2, PXA1/2
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Pex 1, Pex 5, Pex 10	FOX1, FOX 2, FAA1
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Pex 1, Pex 2, Pex 5, Pex 10, Pex 14	CTA1, FOX1, FOX 2, PXA1/2, FAA1
<i>Dictyostelium discoideum</i>	Pex 1, Pex 2, Pex 5, Pex 10,	CTA1, FOX1, FOX 2, PXA1/2, FAA1
<i>Monosiga brevicolis</i>	Pex 1, Pex 5	FOX1, FOX 2, PXA1/2, FAA1
<i>Leishmania sp.</i>	Pex 1, Pex 2, Pex 5, Pex 10, Pex 14	FOX 2, PXA1/2, FAA1

	<i>Trypanosoma</i> sp.	Pex 1, Pex 2, Pex 5, Pex 10, Pex 14	CTA1, FOX1, FOX 2, FAA1
	<i>Naegleria gruberi</i>	Pex 1, Pex 5, Pex 10	CTA1, FOX1, PXA1/2, FAA1
	<i>Trichomonas vaginalis</i>		PXA1/2, FAA1
	<i>Giardia lamblia</i>	-	FAA1

(Modificado de Gabaldón, 2016; HGNC).

ANEXO 2 Herramientas bioinformáticas utilizadas

Programa	Función	Dirección
KEGG	Base de datos Genes y Genomas de Kioto (Compila genomas de organismos completamente secuenciados)	http://www.genome.jp/kegg/
GiardiaDB	Genoma completo de <i>G. lamblia</i>	http://giardiadb.org/giardiadb/
NCBI	Base de datos de genomas completos y parciales	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
HMMSCAN	Identificación de dominios funcionales	http://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan
PFAM		http://pfam.xfam.org/search#tabview=tab0
RaptorX	Predicción de estructuras terciarias	http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/predict/
Muscle	Alineamiento múltiple	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/
Needle	Alineamiento pareado	http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/
Promals 3D	Alineamiento múltiple y predicción de estructura secundaria	http://prodata.swmed.edu/promals3d/promals3d.php
PSORTII	Predicción de localización subcelular	https://psort.hgc.jp/form2.html
STRING 2.0	Interactomas	https://string-db.org/
Chimera	Modelaje de proteínas	https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/
ABCPred	Identificación de regiones inmunogénicas	http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html

ANEXO 3

Esquema de inmunización

INMUNIZACIÓN



Anexo 4 Exanguinación

SANGRADO TOTAL

