



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“Identificación de proteínas asociadas a la biotransformación del Albendazol y su posible relación con la resistencia en *Giardia duodenalis* a este fármaco”

Tesis que presenta:

Biol. Edar Onam Pech Santiago

Para obtener el grado de:

Maestro en ciencias

En la especialidad de:

Genética y Biología Molecular

Director de tesis:

Dra. María Guadalupe Ortega Pierres

Ciudad de México

Agosto, 2018

El presente proyecto se realizó en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. María Guadalupe Ortega Pierres, la asesoría de la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz y el Dr. Luis Kameyama Kawabe, y con la participación del Dr. Raúl Argüello García.

Su realización fue posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante la beca con número de registro 536306.

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más profundo y especial agradecimiento a mis padres, José y Aída, quienes me han dado la lección de vida más importante: el amor incondicional, el valor del esfuerzo y el trabajo. De manera especial quiero agradecer a mi abuelita, Marina, por estar siempre presente y darme esas palabras de aliento para seguir mis sueños. Gracias a ustedes por todo lo que han dedicado a su familia, espero que este trabajo los haga sentir felices pues son parte de él.

Expreso mi gratitud a la Dra. Guadalupe Ortega Pierres, por confiar en mí y haberme aceptado para formar parte del equipo trabajo que llamamos familia.

Quisiera agradecer a un colega y amigo al Dr. Raúl el cual, con sus consejos, ideas y correcciones, permitió dirigir este trabajo hasta su conclusión con esta tesis.

Agradezco de forma especial Citlali del Departamento de Bioquímica en el Instituto Nacional de Cardiología, por haberme apoyado en el análisis de actividad específica. También le agradezco a la Dra. Iliana del laboratorio de Neuropsicofarmacología en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, por haberme apoyado en la cuantificación de metabolitos de ABZ.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Rodriguito, Iraís, Blanquita, Roció, Isa y Arturo, les agradezco por su amistad y el afecto que día a día compartieron conmigo. De forma especial le agradezco a Yéssica por su tiempo, amistad, y esos tips y secretos que me ayudaron a mejorar mis experimentos a lo largo de este trabajo.

Finalmente agradezco a los asesores de esta tesis, la Dra. Bermúdez y el Dr. Kameyama, por sus comentarios que contribuyeron de manera muy importante a la corrección final de esta tesis.

Contenido

Índice de Figuras	1
Índice de Tablas	3
Abreviaturas	4
Resumen	6
Abstract.....	7
1. Introducción.....	8
1.1. Generalidades de <i>Giardia</i>	8
1.2. Ciclo de vida	10
1.3. Epidemiología.....	14
1.4. Patogénesis	16
1.5. Tratamiento.....	19
1.5.1. Furazolidona.....	19
1.5.2. Metronidazol	20
1.5.3. Paromomicina	21
1.5.4. Nitazoxanida.....	21
1.5.5. Albendazol	22
1.5.6. Biotransformación del Albendazol.....	23
1.6. Resistencia a fármacos en <i>Giardia</i>	24
2. Antecedentes.....	27
3. Justificación	29
4. Hipótesis.....	29
5. Objetivo general	29
5.1. Objetivos particulares	30
6. Estrategia experimental	31
7. Metodología	32
7.1. Análisis <i>in silico</i>	32
7.2. Cultivo de Parásitos.....	33

7.3.	Actividad de la Flavohemoglobina (GdFIHb).....	33
7.3.1.	Purificación de la proteína recombinante GdFIHb.....	33
7.3.2.	Actividad NADH oxidasa de GdFIHb.....	34
7.4.	Cuantificación de metabolitos de GdFIHb por HPLC-MS/MS	36
7.4.1.	Fármacos y condiciones cromatográficas	36
7.4.2.	Cuantificación de metabolitos por la Flavohemoglobina	36
7.5.	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR).....	38
7.5.1.	Análisis densitométrico de los geles	38
7.6.	Clonación de la Flavohemoglobina de <i>G. duodenalis</i> en el vector pAC	39
7.7.	Análisis estadísticos.....	41
8.	Resultados.....	42
8.1.	Análisis <i>in silico</i>	42
8.2.	Actividad de la Flavohemoglobina de <i>G. duodenalis</i>	62
8.3.	Determinación de los metabolitos de ABZ por HPLC-MS/MS	70
8.4.	Niveles de expresión de genes involucrados en la biotransformación de ABZ.....	73
8.5.	Clonación de la Flavohemoglobina de <i>G. duodenalis</i> en el vector pAC	75
9.	Discusión.....	79
10.	Conclusiones	85
11.	Perspectivas.....	85
12.	Bibliografía.....	86

Índice de Figuras

Figura 1.	Características estructurales del trofozoíto y quiste de <i>G. duodenalis</i>	11
Figura 2.	Ciclo de vida y ploidía en las distintas fases de <i>Giardia duodenalis</i>	13
Figura 3.	y reportes de casos clínicos de Giardiasis del 2015 al 2017 en la República Mexicana.	16
Figura 4.	Principales fármacos empleados en la giardiasis humana. .	19
Figura 5.	Biotransformación del Albendazol por el sistema CYP450.	24
Figura 6.	Alineamiento múltiple de secuencias de Flavohemoglobinas.	45
Figura 7.	Calidad estereoquímica y homología estructural de GdFIHb.	46
Figura 8.	Alineamiento múltiple de secuencias de CYPOR.	49
Figura 9.	Calidad estereoquímica y homología estructural de GdCYPOR.	50
Figura 10.	Alineamiento múltiple de secuencias de CYTb5.	52
Figura 11.	Calidad estereoquímica y homología estructural de las isoformas de GdCYTb5.	54
Figura 12.	Docking molecular con posibles sustratos en el sitio activo de la GdFIHb.	56
Figura 13.	Docking molecular de posibles inhibidores de GdFIHb, GdCYPOR y GdCYTb5.	58
Figura 14.	Docking molecular proteína-proteína de GdFIHb-GdCYPOR.	60
Figura 15.	Docking molecular proteína-proteína de GdFIHb-GdCYTb5_II.	62

Figura 16. Características del vector pET14b-H6-gFIHb.	63
Figura 17. Curva de consumo de NADH y NADPH por rGdFIHb.	64
Figura 18. Curva de consumo de NADH por rGdFIHb en presencia de ABZ y NONOato.	66
Figura 19. Actividad específica en porcentaje de rGdFIHb en presencia de diferentes fármacos.	68
Figura 20. Curva de calibración y cromatogramas del análisis de metabolitos.	71
Figura 21. Cuantificación de metabolitos de ABZ (ABZSO y ABZSOO) mediante HPLC-MS/MS.	72
Figura 22. Análisis semicuantitativo de RT-PCR.	74
Figura 23. Clonación de GdFIHb en el vector pJET1.2/blund.	76
Figura 24. Digestión de pJET_GdFIHb y candidatas de pAC_GdFLHb.	77
Figura 25. Alineamiento de la secuenciación de pJET_GdFIHb.	78

Índice de Tablas

Tabla 1.	Ensamblados reconocidos de la especie <i>G. duodenalis</i>	9
Tabla 2.	Proteínas hemo de <i>Giardia duodenalis</i> Ensamble A aislado WB.	10
Tabla 3.	Proteínas homologas de <i>G. duodenalis</i> al sistema de biotransformación de ABZ.	42
Tabla 4.	Lista de proteínas utilizada para el MSA de Flavohemoglobinas.	44
Tabla 5.	Listas de proteínas utilizada para el análisis de secuencia de CYPORs.	47
Tabla 6.	Listas de proteínas utilizada para el MSA de CYPOR.	51
Tabla 7.	Calidad estereoquímica de los modelos estructurales para las cuatro isoformas de GdCYTb5 empleando el gráfico de Ramachandran.	53
Tabla 8.	Interacción molecular de miembros de bencimidazoles contra la GdFIHb.	55
Tabla 9.	Interacción molecular de posibles inhibidores de GdFIHb, GdCYPOR y GdCYTb5.	57
Tabla 10.	Valores de interacción molecular proteína-proteína con el software ClusPro.	61
Tabla 11.	Actividad específica de rGdFIHb en presencia de NADH o NADPH.	64
Tabla 12.	Actividad específica de rGdFIHb en presencia de concentraciones crecientes de ABZ.	65
Tabla 13.	Actividad específica de rGdFIHb en presencia de ABZ y otros fármacos.	67
Tabla 14.	Cuantificación de metabolitos en las muestras analizadas.	71
Tabla 15.	Oligos utilizados para la RT-PCR.	73
Tabla 16.	Valores arbitrarios de expresión de RT-PCR.	74

Abreviaturas

ABZ	Albendazol
ABZSO	Sulfóxido de Albendazol
ABZSOO	Sulfona de Albendazol
amp	Ampicilina
BCA	Ensayo de Cuantificación de Proteína
CBZ	Carbamazepina
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
CWP	Proteínas de Pared Celular
CYP450	Citocromo P450
CYPOR o CPR	NADPH:Citocromo P450 Oxidoreductasa
CYTb5	Citocromo B5
DMF	N, N-Dimetilformamida
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleótidos Trifosfato
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ESV	Vesículas Secretoras
eV	Electronvoltios
FAD	Flavín Adenín Dinucleótido
FIHb	Flavohemoglobina
Fd	Ferredoxina
FMN	Flavín Mononucleótido
FMO	Monooxigenasas Dependientes de Flavina
GdCYPOR o GdCPR	NADPH:Citocromo P450 Oxidoreductasa De G. Duodenalis
GdFIHb	Flavohemoglobina de G. Duodenalis
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
HSP	Proteínas de Choque Térmico
IC50	Concentración Media Inhibitoria
IgA	Inmunoglobulina A
IPTG	Isopropil-B-D-1-Tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria Bertani
mg	Miligramo
min	Minuto
mM	Milimolar
MRM	Monitoreo De Reacción Múltiple
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensajero

MS/MS	Espectrometría de Masas en Tándem
MSA	Análisis Múltiples de Secuencias
MTZ	Metronidazol
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
ng	Nanogramos
nM	Nanomolar
NOS	Especies Reactivas De Nitrogeno
NRT1	Nitroreductasa-1
NTR2	Nitroreductasa-2
O ₂	Oxígeno Molecular
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDI	Proteínas Disulfuro Isomerasas
PFOR	Piruvato:Ferredoxina Oxidoreductasa
psi	Libra por Pulgada Cuadrada
rGdFIHb	Flavohemoglobina Recombinante
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Especies Reactivas De Oxígeno
rpm	Revoluciones por Minuto
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa de la Transcripción Reversa
SD	Desviación Estándar
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio
TB	Medio Terrific Broth
TrxR	Tiorredoxina Reductasa
U.A.	Unidades Arbitrarias
VSP	Proteínas Variantes De Superficie
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar

Resumen

El tratamiento contra la giardiasis incluye múltiples fármacos como Albendazol (ABZ) y Metronidazol (MTZ); sin embargo, existen fallas terapéuticas causadas por uso inadecuado, dosis subóptimas y posible presencia de trofozoítos resistentes. Hasta ahora, no se han caracterizado completamente los mecanismos implicados en la resistencia de *Giardia* al ABZ. En eucariontes el ABZ se metaboliza en sulfóxido (ABZSO) y sulfona (ABZSOO), por el sistema hemo-enzimático citocromo P450 (CYP450). Sin embargo, este proceso se desconoce en *Giardia duodenalis*.

En este trabajo se evaluó la posible metabolización de ABZ por la Flavohemoglobina de *G. duodenalis* (GdFIHb) y la presencia de otras proteínas como CYPOR posiblemente asociadas en este proceso en clonas sensibles y resistentes en este fármaco. El uso de alineamiento de secuencias, modelado y docking molecular no se identificó un homólogo de CYP450 en *G. duodenalis*; sin embargo, se predijo una interacción viable del ABZ con la proteína GdFIHb. Para ello se expresó la GdFIHb recombinante la cual presentó una mayor actividad específica en presencia de ABZ (0.692 nmol/min*mg) en comparación con su actividad basal (0.232 nmol/min*mg). Al cuantificar los metabolitos por HPLC-MS/MS se observó la presencia de ABZSO en 15, 20 y 25 nM de ABZ (10.69, 342.53, y 664.98 nmol/L, respectivamente), mientras que la ABZSOO se observó a concentraciones de 20 y 25 nM de ABZ (25.81 y 148.32 nmol/L, respectivamente). Los niveles de expresión de transcrito de la GdFIHb y CYPOR disminuyeron significativamente en las clonas resistentes a 250 µM de ABZ.

Los resultados obtenidos sugieren la participación de la Flavohemoglobina de *G. duodenalis* en la metabolización el ABZ. Así mismo, la GdFIHb y la CYPOR podrían tener un papel en un mecanismo pasivo de resistencia a la droga. Así, esta información ofrece alternativas para el desarrollo de nuevas estrategias para contrarrestar la infección de este parásito

Abstract

The treatment against giardiasis includes multiple drugs such as Albendazole (ABZ) and Metronidazole (MTZ); however, there are therapeutic failures caused by inappropriate use, suboptimal doses and possible presence of resistant trophozoites. Until now, the mechanisms involved in the resistance of *Giardia* to ABZ have not been fully characterized. In eukaryotes, ABZ is metabolized into sulfoxide (ABZSO) and sulfone (ABZSOO), by the cytochrome P450 heme-enzyme system (CYP450). However, this process is unknown in *Giardia duodenalis*.

In this work we evaluated the possible metabolism of ABZ by the Flavohemoglobin of *G. duodenalis* (GdFIHb) and the presence of other proteins such as CYPOR possibly associated in this process in sensitive and resistant clones in this drug. The use of sequence alignment, modeling and molecular docking did not identify a CYP450 homologue in *G. duodenalis*; however, a viable interaction of ABZ with GdFIHb was predicted. For this, the recombinant GdFIHb was produced, which showed a higher specific activity in the presence of ABZ (0.692 nmol/min*mg) compared to its basal activity (0.232 nmol/min*mg). When quantifying the metabolites by HPLC-MS/MS the presence of ABZSO was observed in 15, 20 and 25 nM of ABZ (10.69, 342.53, and 664.98 nmol/L, respectively), while the ABZSOO was observed at concentrations of 20 and 25 nM of ABZ (25.81 and 148.32 nmol/L, respectively). The transcript expression levels of GdFIHb and CYPOR decreased significantly in the clones resistant to 250 μ M of ABZ.

The results obtained suggest the participation of Flavohemoglobin of *G. duodenalis* in the metabolization of ABZ. They also suggest that GdFIHb and CYPOR could play a role in a passive mechanism of resistance to the drug. Thus, this information offers alternatives for the development of new strategies to counteract the infection of this parasite.

1. Introducción

Los parásitos son extremadamente diversos, incluso parásitos relacionados tienen comportamientos distintos, difieren en la capacidad infectiva, causan diferentes patologías o infectan distintos tejidos. Estas características especializadas de los parásitos son adquiridas por la interacción íntima con el huésped, el tiempo de generación corta y por el gran número de individuos que constituyen la población, provocando una tasa evolutiva mayor que sus huéspedes. Estos organismos han desarrollado mecanismo de adaptación que les han permitido la supervivencia en condiciones “desventajosas” y cambiantes que de otro modo no permitiría su supervivencia (Kochin et al. 2010). Durante la infección, la supervivencia del patógeno depende de la habilidad de colonizar un individuo y su capacidad para contrarrestar los mecanismos de defensa del huésped. Asimismo, la virulencia de los parásitos refleja la interacción dinámica entre huésped y la capacidad de respuesta a los sistemas de defensa, un proceso de adaptación necesaria para la supervivencia, mantenimiento y transmisión del parásito. En la presente tesis se aborda el estudio de mecanismo de resistencia en *Giardia duodenalis*, uno de los protozoarios parásitos considerados como modelo evolutivo y patógeno intestinal de importancia clínica y veterinaria

1.1. Generalidades de *Giardia*

Giardia duodenalis (sinónimos *Giardia lamblia* o *Giardia intestinalis*) es un protozoario microaerófilo flagelado perteneciente al orden Diplomonadida (Arisue et al. 2005; Adl et al. 2012) que parasita el intestino delgado del hospedero y es el agente causal de la parasitosis más común en todo el mundo, la giardiasis (Koehler et al. 2014). Este organismo ha atraído mucho interés no solo por su importancia médica y veterinaria, sino también por su divergencia temprana y se ha descrito como un “eucariota verdadero con

características de procariota ancestral” (Upcroft & Upcroft 1998). *G. duodenalis* infecta principalmente a los mamíferos, incluyendo al humano, mascotas y al ganado, invadiendo la parte superior del intestino delgado y causa síntomas gastrointestinales como náuseas, diarrea, hinchazón y malabsorción de nutrientes (Escobedo et al. 2016).

En el género *Giardia* se han descrito seis especies acorde con criterios morfogenéticos (Plutzer et al. 2010). Para la especie *G. duodenalis* se han descrito ocho grupos o ensamblajes morfológicamente homogéneos pero distinguibles genéticamente (A-H), aislados de diferentes especies de mamíferos. Los ensamblajes A y B se han encontrado en humano y en otros animales, se consideran que su transmisión es zoonótica, mientras que los otros ensamblajes muestran una especificidad en el huésped y no infectan a humanos (Monis et al. 2009; Ryan & Cacciò 2013). Existe controversia en el manejo de la nomenclatura de la especie *G. duodenalis*, por lo cual actualmente se hace referencia a los ensamblajes que se han caracterizado para su clasificación.

Tabla 1. Ensamblajes reconocidos de la especie *G. duodenalis*.

Ensamble	Huésped	Especie*
A	Humanos y otros primates, Ganado, perros, gatos y algunas especies de mamíferos salvajes.	<i>Giardia duodenalis</i>
B	Humanos y otros primates, perros, gatos y algunas especies de mamíferos salvajes.	<i>Giardia enterica</i>
C	Perros y otros cánidos.	<i>Giardia canis</i>
D	Perros y otros cánidos.	<i>Giardia canis</i>
E	Animales ungulados	<i>Giardia bovis</i>
F	Gatos	<i>Giardia cati</i>
G	Ratones	<i>Giardia simondi</i>
H	Animales marinos (pinnípedos)	SD

*Las especies se nombraron de acuerdo con el huésped donde se aisló el parásito. SD: sin denominación

Giardia presenta características particulares que incluyen dos núcleos activos transcripcionalmente, ausencia de mitocondrias y peroxisomas. Su posición filogenética lo colocan como un eucariota basal, aunque en otras clasificaciones lo refieren como un organismo con divergencia temprana simultáneamente con opisthokonta y plantas (Arisue et al. 2005; Morrison et al. 2007; Adl et al. 2012). La ausencia de respiración mitocondrial y la falta de una ruta biosintética del grupo hemo refleja su adaptación a su estilo de vida microaerófilo, aunque presenta cinco genes que codifican a proteínas con grupo hemo, cuatro citocromos b5 y una Flavohemoglobina (Rafferty & Dayer 2015; Pyrih et al. 2014; Alam et al. 2012).

Tabla 2. Proteínas hemo de *Giardia duodenalis* Ensamble A aislado WB.

Proteína	Peso molecular	Longitud	Giardia DB
Flavohemoglobina	53.0	458 aa	GL50803_15009
Citocromo B5-I	15.1	131 aa	GL50803_9089
Citocromo B5-II	15.3	136 aa	GL50803_27747
Citocromo B5-III	14.4	129 aa	GL50803_33870
Citocromo B5-VI	28.9	258 aa	GL50803_2972

Las rutas metabólicas de *Giardia*, comparadas con otros eucariotas son simples, su genoma codifica para procesos celulares simplificados que poseen menos subunidades, sin proteínas redundantes y únicas que se relacionan con bacterias y arqueas, lo cual evidencia la adquisición de genes por transferencia horizontal (Morrison et al. 2007; Monis et al. 2009).

1.2. Ciclo de vida

G. duodenalis presenta dos estadios en su ciclo de vida, el trofozoíto y el quiste. El trofozoíto tiene una estructura piriforme, mide alrededor de 10-12 µm de largo y entre 5-7 µm de ancho, y se caracteriza por la presencia de

dos núcleos, la superficie dorsal es convexa, mientras que la ventral es cóncava, tiene un disco adherente en la parte anterior y cuenta con ocho flagelos. El quiste tiene un tamaño de 8-12 μm de largo y de 5-10 μm de ancho, el cual presenta una pared de 0.3-0.5 μm de espesor compuesto principalmente por proteínas y carbohidratos, y en este estado puede tener entre dos a cuatro núcleos (Ankarklev et al. 2010; Lujan & Svard 2011).

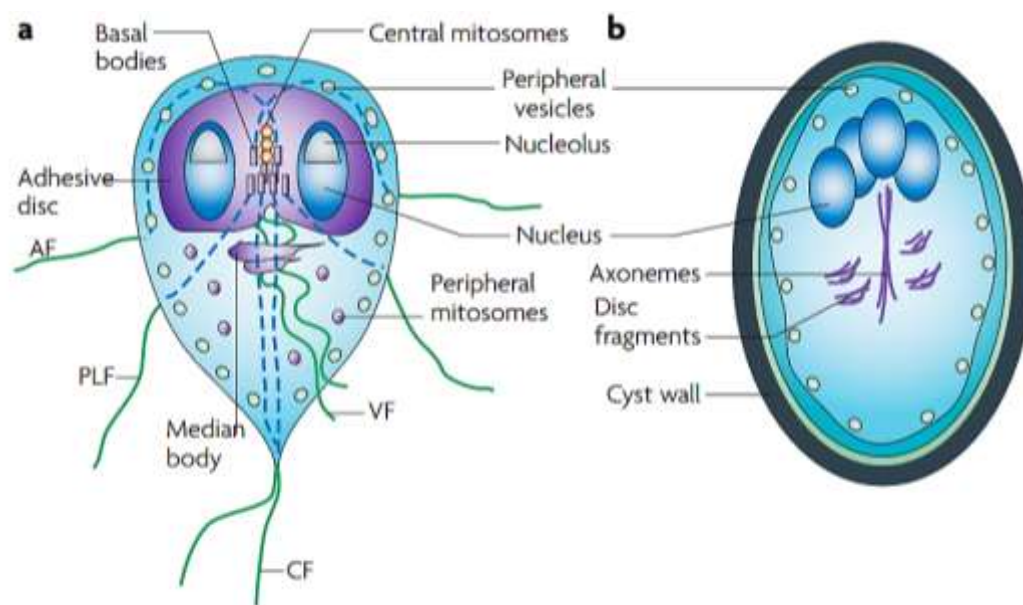


Figura 1. Características estructurales del trofozoito y quiste de *G. duodenalis*. **a)** Características del trofozoito de una vista dorsal, presenta ocho flagelos organizados en cuatro pares: flagelo anterior (AF), flagelo ventral (VF), flagelo posterior/lateral (PLF) y flagelo caudal (CF) (Ankarklev et al. 2010). **b)** El quiste, presenta dos estructuras de protección una pared y una membrana celular.

El mecanismo de adaptación de *Giardia* conocido como enquistamiento es esencial para la supervivencia del parásito fuera del intestino del huésped, dado que los trofozoitos son sensibles a los cambios de temperatura, humedad y la presencia de agentes químicos (Adam 2001). Los quistes son la forma resistente y el desenquistamiento se propicia por los fluidos estomacales que junto con otros mecanismos dan lugar a la liberación de

los trofozoítos. A diferencia del quiste, los trofozoíto necesitan ambientes con mínima presencia de oxígeno o completamente anaeróbico para su supervivencia y reproducción, además de que requiere condiciones particulares de temperatura, pH y salinidad (Ankarklev et al. 2010).

La infección se inicia con la ingestión de los quistes por el huésped, los cuales inician el desenquistamiento por acción de los jugos gástricos en el estómago del hospedero y concluye en la parte distal del intestino superior en donde se liberan los trofozoítos, los cuales se dividen por fisión binaria y colonizan el duodeno y yeyuno del huésped. El establecimiento de los trofozoítos es responsable de los síntomas de la enfermedad. El proceso de desenquistamiento consta de dos etapas: la primera es cuando el quiste se expone al pH ácido del estómago y la segunda donde se encuentra con un ambiente rico en proteasas y ligeramente alcalino en la parte superior del intestino delgado. Durante la primera etapa el quiste detecta los estímulos a través de la pared, lo cual desencadena una respuesta altamente coordinada cambiando los niveles de RNAm, hay ligeros cambios del pH intracelular y se da a aparición de pliegues de membrana que podría ser importantes para determinar la polaridad por donde emergerán los trofozoítos. El proceso de desenquistamiento se completa cuando del quiste emerge el exquizoíto, una célula oval, sin disco adhesivo, con cuatro núcleos (16N) y con un metabolismo intermedio entre trofozoíto y quiste; el exquizoíto rápidamente se divide dos veces sin replicación del DNA, para generar un total de cuatro trofozoítos que colonizaran el duodeno a partir de un quiste (Svärd et al. 2003; Bernander et al. 2001).

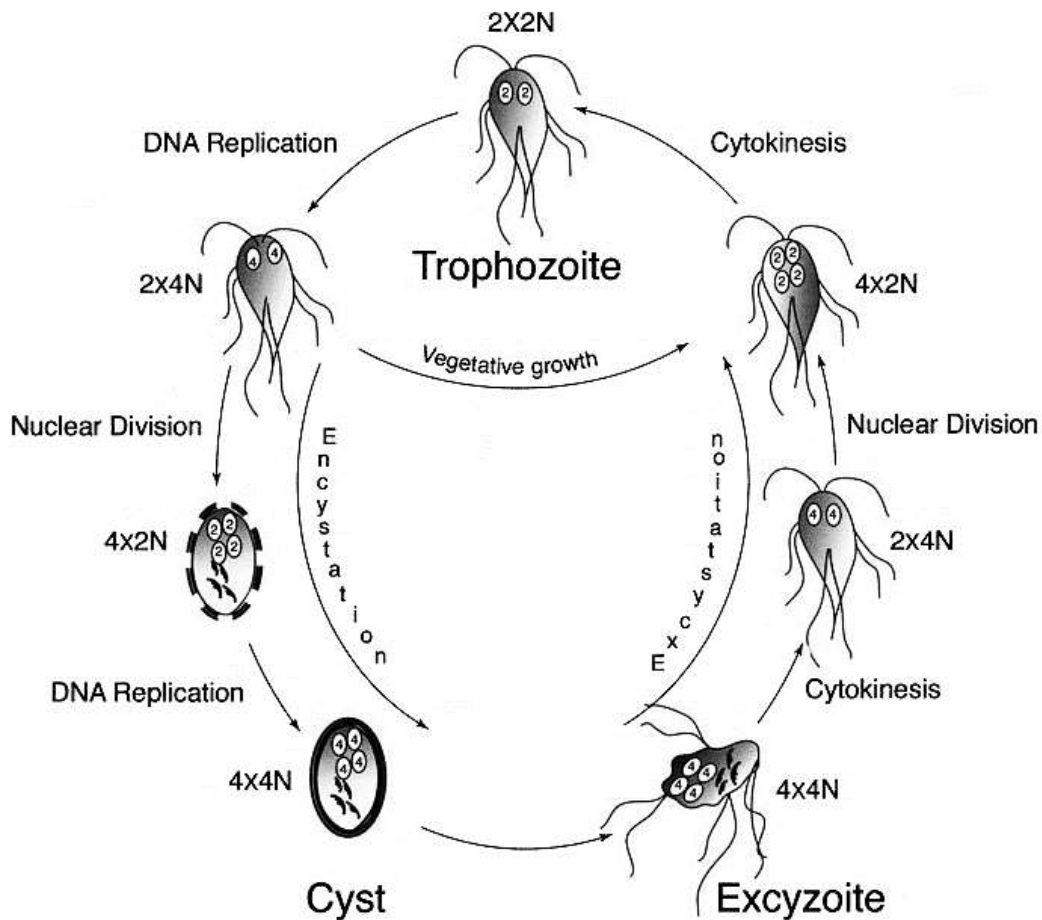


Figura 2. Ciclo de vida y ploidía en las distintas fases de *Giardia duodenalis* (Svärd et al. 2003).

Cuando los trofozoítos alcanzan la parte media del intestino delgado, el yeyuno, inicia el enquistamiento; este proceso es estimulado por el exceso de sales biliares y la disminución de colesterol provocando cambios bioquímicos y morfológicos importantes que se pueden dividir en tres etapas: *i)* recepción de estímulos para la formación del quiste y la consecuente activación de genes; *ii)* biogénesis de organelos secretores y la síntesis, empaquetamiento, transporte y liberación de materiales de la pared celular; y *iii)* el ensamble de la pared extracelular (Luján et al. 1996; Arguello-García et al. 2002).

Durante el enquistamiento se expresan las proteínas de la pared celular (CWP1, CWP2 y CWP3) que se caracterizan por tener regiones con alto porcentaje de identidad. Estas proteínas son transportadas en vesículas secretoras (ESV) en las cuales sufren modificaciones importantes, como el rompimiento del extremo C-terminal de la CWP2 en el cual participa una cistein proteasa (ESCP), importante para el proceso de formación de la pared celular (Lujan et al 1998). En esta etapa también se observan dos rondas sucesivas de replicación de los cromosomas sin un evento de citocinesis, y el desensamble y empaquetamiento de organelos como el disco ventral y los flagelos. Así se genera un quiste con cuatro núcleos y con una ploidía 16N (Ankarklev et al. 2010). Cuando se completa el enquistamiento los quistes son expulsados a través de las heces y se inicia un nuevo ciclo en el mismo huésped o en otro que es susceptible (Adam 2001).

1.3. Epidemiología

La infección causada por *G. duodenalis* se denomina giardiasis. Algunos reportes estiman que afecta a 200 millones de personas en Asia, África y América latina, con 500 mil nuevos casos cada año (Plutzer et al. 2010). En las zonas endémicas de esta parasitosis, la infección es más común en niños menores de 10 años, y disminuye con la edad debido a la inmunidad adquirida y al disminuir la exposición a quistes. La prevalencia en la infección está influenciada por varios factores sociales, hacinamientos, la alta densidad poblacional, la falta de servicio de agua y alcantarillado. En México la prevalencia va de 7.4 a 68.5% dependiendo del rango de edad. Las incidencias más altas se encuentran entre lactantes, preescolares y escolares (Cedillo-Rivera et al. 2009).

Desde 1960 existen reportes de epidemias humanas asociadas a *G. duodenalis*. De manera similar, este parásito infecta gran variedad de mamíferos, aves, reptiles y anfibios. Aun cuando no se han presentado evidencias contundentes sobre la naturaleza zoonótica de la infección, el hecho de que el ganado se infecte con este parásito puede ser potencialmente un problema de zoonosis (Ryan & Cacciò 2013). También se ha documentado evidencia de la presencia de quistes de *G. duodenalis* en cuerpos de agua, superficies y alimentos en zonas urbanas (De Man et al. 2014).

De acuerdo con los datos reportados de la Secretaría de Salud de México, en el Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica desde el año 2015 al 2017 los casos de giardiasis han aumentado en el país de 11 575 casos en el 2015 (de los cuales F: 6 381 y M: 5 194), 11 388 casos en el 2016 (de los cuales F: 6 568 y M 4 820) y 13 029 casos en el 2017 (de los cuales F: 6 967 y M: 6062). La giardiasis tiene una distribución en todos los estados de la República Mexicana. Por otro lado, Cedillo-Rivera y colaboradores (2009) reportaron 55.3% de seropositividad (n=3461) en anticuerpos IgG anti-*G. duodenalis* en toda la República Mexicana y en personas de 1-98 años de edad.



Figura 3. Distribución y reportes de casos clínicos de Giardiasis del 2015 al 2017 en la República Mexicana.

Aunado a estas características epidemiológicas, las actividades laborales son uno de los factores de riesgo más importante en el desarrollo de la giardiasis, por ejemplo, los trabajadores de riego y desagüe pueden ser más susceptibles a adquirir la infección debido a su exposición a los quistes de *Giardia*. En las guarderías y otras situaciones en las que los niños se agrupan, la incidencia de la infección por *Giardia* es alta (Painter et al. 2015).

1.4. Patogénesis

La adhesión del trofozoíto al epitelio es el primer paso en la patogénesis de la giardiasis, ésta se lleva a cabo mediante la unión del disco adhesivo y es

crucial para iniciar la colonización, así como para mantener la infección. El disco adhesivo está constituido por proteínas relacionadas a las anexinas llamadas alfas giardinas, que son altamente expresadas en *Giardia*, y un citoesqueleto muy bien organizado (Yoshida et al. 2011). Al unirse al epitelio que esta recubierto por las capas mucosas, *Giardia* puede inducir alteraciones en las células epiteliales intestinales a través de los productos secretados principalmente proteasas (De Carvalho et al. 2008).

Giardia puede causar malabsorción y diarrea principalmente por un acortamiento difuso de las microvellosidades epiteliales y la interrupción de uniones estrechas del intestino, que a su vez aumenta la permeabilidad intestinal (Buret 2008). Además, existen otros factores que participan en la patogénesis que incluyen varios mecanismos como la reducción de las actividades de disacaridasas intestinales y proteasas intestinales, el acortamiento de las vellosidades, hiperplasia de las criptas, aumento de la permeabilidad epitelial, toxinas, inflamación de la mucosa, el crecimiento bacteriano e hipermotilidad intestinal (Koot et al. 2009).

La respuesta inmune a patógenos, incluyendo a *G. duodenalis*, depende de los sistemas inmunes innato y adaptativo (Solaymani-Mohammadi & Singer 2010). Aunque en la actualidad los mecanismos de defensa del huésped responsables de controlar la infección por *Giardia* no ha sido totalmente descritos, varios estudios han demostrado el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa así como de mecanismos innatos en humanos y otros animales (Roxström-Lindquist et al. 2006).

La presencia de infecciones asintomáticas se puede deber a una respuesta eficaz del huésped, así como la modulación del sistema inmune por el parásito. Como parte del sistema inmune innato, en el intestino se secretan productos antimicrobianos (defensinas y lactoferrinas) con actividad anti-giardial que pueden participar en la defensa contra *Giardia*. Recientemente

se ha reportado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NOS) tienen un efecto citotóxico y actividades inmunomoduladoras durante la infección intestinal por *Giardia* (Eckmann et al. 2000; Mastronicola et al. 2011). En la respuesta inmune adaptativa existe evidencia sobre la participación de los anticuerpos IgA en la inmunidad contra *Giardia*, sin embargo, en pacientes con infecciones crónicas no se presentan anormalidades inmunes y no está claro si los factores epidemiológicos o la inmunosupresión juegan un papel importante (Stark et al. 2009).

Recientemente se ha identificado que la microbiota puede participar en la infección y colonización de *Giardia*, este parásito participa en la organización de la microbiota así como en la interacción con las células intestinales (Singer & Nash 2000; Pérez et al. 2001; Salzman et al. 2007).

Entre el 35-70% de los individuos infectados con *Giardia* permanecen asintomáticos. Una porción mucho menor desarrolla enfermedades diarreicas aguda con fiebre, dolor epigástrico, náuseas y vómito. La giardiasis también se ha asociado con el síndrome del intestino irritable post-infección, dispepsia y trastornos gastrointestinales funcionales, y manifestaciones alérgicas de la piel como urticaria y angioedema (Grazioli et al. 2006).

El amplio espectro de la sintomatología de la infección de *Giardia* se ha atribuido a factores tales como el tamaño del inóculo, la respuesta específica del huésped y la diferencia genotípica del parásito. La infección persistente y la enfermedad crónica en algunos pacientes puede explicarse por la evasión inmune debido a la variación antigénica en proteínas variantes de superficie (VSP), un proceso que es regulado por un mecanismo similar al RNA de interferencia (Prucca et al. 2008; Prucca et al. 2011).

1.5. Tratamiento

Debido a la ausencia actual de vacunas para uso en humanos, el empleo de agentes farmacológicos es el principal recurso para el control de las infecciones causadas por *G. duodenalis*. En el tratamiento clínico de esta infección se han empleado una gran variedad de compuestos, muchos de los cuales en un principio han sido utilizadas para tratar otras parasitosis.

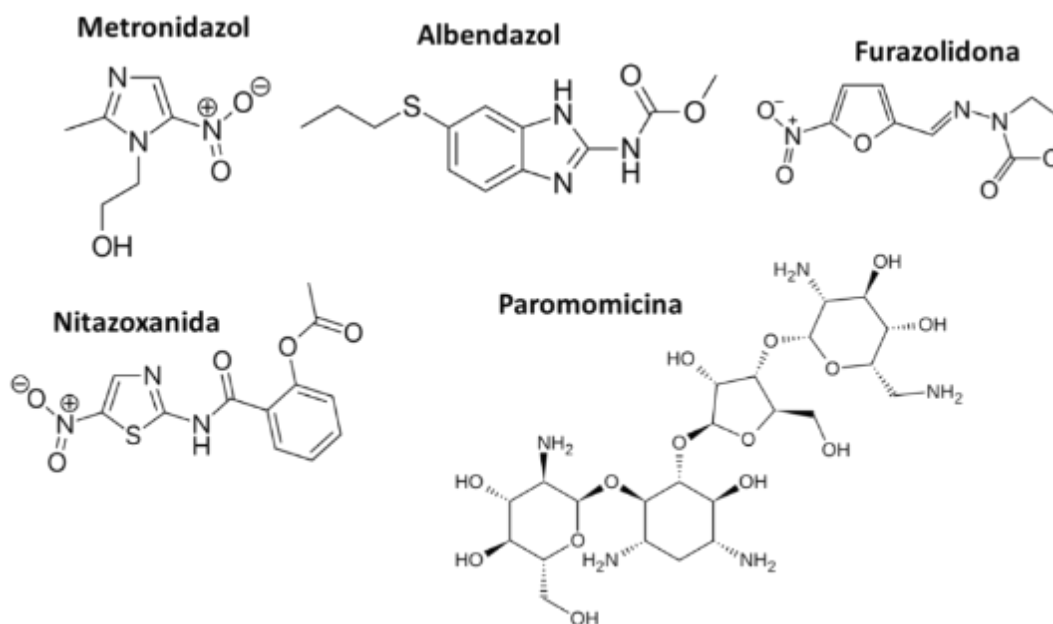


Figura 4. Principales fármacos empleados en la giardiasis humana (Leitsch 2015).

1.5.1. Furazolidona

Furazolidona es un compuesto sintético perteneciente a los grupos de los nitrofuranos y fue introducido en los 1960s para el tratamiento contra la giardiasis. La furazolidona es una prodroga, en el cual el grupo nitro debe ser reducido para ser activo. Su poder citotóxico es contra el DNA y las proteínas, en este último se une a grupo tiol principalmente de las cisteínas (Maya et al. 1997; Díaz et al. 2004). La dosis de furazolidona (nombre

comercial Furoxona) es de 100 mg cada 6hrs por 7-10 días, y se ha reportado una efectividad alrededor del 80% (Upcroft & Upcroft 2001).

1.5.2. Metronidazol

El metronidazol fue uno de los primeros fármacos utilizados contra parásitos microaerófilos en los 1950s, y también fue uno de los primeros usados contra la giardiasis (Cosar and Julou 1959; Schneider 1961). El metronidazol es una prodroga que necesita ser reducida en su grupo nitro para ser tóxica, produce estrés oxidativo severo por la unión a grupos tioles libres o en proteínas creando aductos de cisteínas principalmente en la proteína tiorredoxina reductasa (Leitsch et al. 2012). Se absorbe completamente después de la administración oral, se metaboliza principalmente en el hígado y se excreta en la orina. Se ha reportado que el estrés oxidativo causado por este fármaco afecta al DNA de los trofozoítos, produciendo rupturas de doble cadena (Ansell et al. 2015).

El metronidazol se activa principalmente por la nitroreductasa-1 (NRT1) y la vía de reducción mediada por la ferredoxina (Fd), que a su vez es reducida por piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) la cual transfiere los electrones producidos durante la descarboxilación oxidativa del piruvato a la ferredoxina. Otra enzima que reduce directamente al metronidazol es la flavoenzima tiorredoxina reductasa (TrxR) que utiliza equivalente reductores provenientes del NADPH (Ansell et al. 2015). En el 14^o reporte de carcinogénicos del Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, se colocó al metronidazol como un agente carcinogénico por causar tumores en ratones cuando se administran en altas dosis. Sin embargo, no hay una vinculación directa entre el tratamiento con metronidazol y cáncer en humanos a pesar de su uso frecuente (National Toxicology Program 2016). La dosis de metronidazol (nombre comercial Flagyl) es de 250 mg cada 8 hrs por 5-10 días con una eficacia entre 80-95%.

1.5.3. Paromomicina

La paromomicina es un aminoglucósido que inhibe la síntesis de proteínas de *G. duodenalis*, por la interacción con las subunidades ribosomales 30S y 50S resultado en un mal acomodamiento de los codones del RNAm. Su primer reporte utilizado contra *G. duodenalis* fue 1989 (Edlind 1989). Se absorbe pobremente y la eficacia contra la giardiasis es muy variada de 60-70%, y en algunos casos su efecto no es significativo contra *G. duodenalis* (Boreham et al. 1985; Rossignol 2010). La paromomicina se considera como un fármaco de elección contra las infecciones por *Giardia* en mujeres embarazadas, debido a que se absorbe pobremente en el intestino y se excreta sin ser metabolizado (Leitsch 2015). La dosis de paromomicina (nombre comercial Humatin) es de 500 mg cada 8hrs durante 10 días (Lalle 2010).

1.5.4. Nitazoxanida

La nitazoxanida es un fármaco descrito inicialmente como antihelmíntico, poco después se encontró que era activo contra un rango amplio de parásitos, incluidos *G. duodenalis* (Adagu et al. 2002; Gilles & Hoffman 2002). Al igual que el metronidazol, nitazoxanida debe ser reducida en su grupo nitro para ser activa, su modo de acción es inhibir la PFOR y otras enzimas como NRT1 y quinona reductasa, lo cual compromete la integridad celular (Müller et al. 2007; Müller et al. 2015; Hoffman et al. 2007). La dosis de nitazoxanida (nombre comercial Alinia) es de 500 mg cada 12 hrs durante 3 días, tiene una efectividad de 71-80%, además que tiene una alta eficacia contra aislados de *G. duodenalis* resistentes a metronidazol (Rossignol 2010).

1.5.5. Albendazol

El albendazol (ABZ) es el fármaco utilizado como tratamiento de elección en la infección por una gran variedad de parásitos incluido *G. duodenalis*. El ABZ forma parte de los cuatro fármacos antihelmínticos que se encuentra en la lista modelo de medicinas esenciales de la Organización Mundial de la Salud (Leitsch 2015). El ABZ ejerce su efecto al ser transformado secuencialmente a sus formas sulfóxido (ABZSO) y sulfona (ABZSOO) por la acción de citocromos P450 (CYP450) y monooxigenasas dependientes de flavina (FMO) (Rawden et al. 2000). El ABZSO es el metabolito con actividad terapéutica y es metabolizado principalmente por el CYP3A4, existiendo en dos formas enantioméricas ((-)-ABZSO y (+)-ABZSO) con una relación de 20:80 en el plasma sanguíneo (Dayan 2003). El efecto del ABZ en *Giardia* se conoce desde los trabajos reportados de Zhong y colaboradores en 1986.

La vía de acción del ABZ y de otros compuestos de la familia de los bencimidazoles es la unión selectiva a la β -tubulina en tres residuos (TYR167, ALA198 y TYR200), evitando la polimerización y la estabilidad de los microtúbulos (Kwa et al. 1995). De esta manera impide la movilidad, así como el transporte de moléculas vitales para el parásito. Recientemente se ha reportado que el ABZ también induce estrés oxidativo, lo cual sugiere que puede ser un posible mecanismo alternativo de toxicidad (Locatelli et al. 2004; Dimitrijević et al. 2012; Martínez-Espinosa et al. 2015). Aunque se conoce que los trofozoítos de *G. duodenalis* puede biotransformar el ABZ (Argüello-García et al. 2015), no se ha determinado la proteína monooxigenasa de ABZ para producir sus metabolitos. La dosis de ABZ (nombre comercial Albenza) es de 400 mg durante 5 días, con una eficacia de 62-95% (Lalle 2010).

1.5.6. Biotransformación del Albendazol

La biotransformación del ABZ empieza con el flujo de electrones desde NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducida) y/o NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducida) al aceptor final CYP450 (de Montellano 2015; Pandey & Flück 2013; Iyanagi et al. 2012). La transferencia de electrones está mediada por NADPH:citocromo P450 oxidoreductasa (CYPOR o CPR) y ocurre por tres pasos: *i*) transferencia híbrida entre NAD(P)H y FAD, *ii*) entre interflavinas de FAD a FMN y *iii*) de FMN al centro del grupo hemo del CYP450. El citocromo b5 (CYTb5) puede formar parte del sistema de transferencia de electrones como: *i*) participando en la transferencia del segundo electrón, *ii*) inhibiendo la actividad de CYP450 o *iii*), sin ejercer efecto positivo o negativo y *iv*) como único donador de electrones (Guengerich 2005; Shimada et al. 2005; Inui et al. 2007; Henderson et al. 2013; Stiborová et al. 2016).

Cuando se transfiere el primer electrón de CYPOR al hierro del grupo hemo, este último se reduce de férrico a ferroso (Fe^{III} a Fe^{II}), permitiendo la unión del oxígeno molecular (O_2), al recibir el segundo electrón por la CYPOR o CYTb5 provoca la escisión de la unión O-O, resultando en una enzima intermediaria reactiva capaz de insertar el átomo del oxígeno a un sustrato orgánico (Torres Pazmiño et al. 2010; de Montellano 2015).

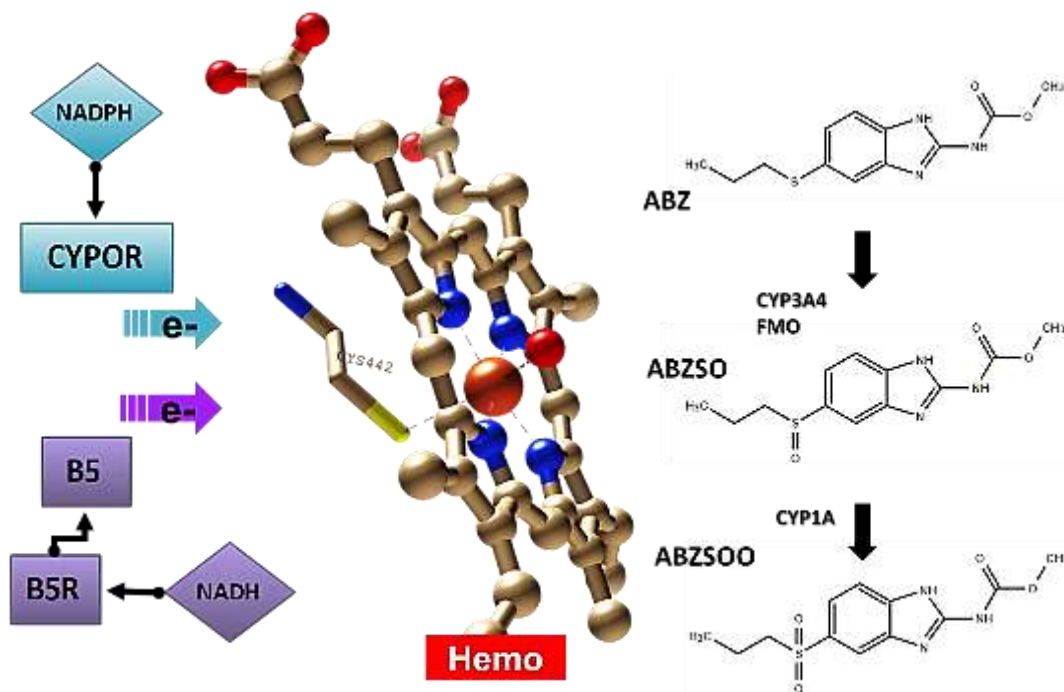


Figura 5. Biotransformación del Albendazol por el sistema CYP450. **a)** El flujo de electrones inicia con NADPH y NADH, los cuales interaccionan con el hierro del grupo hemo para donar los electrones y poder unir oxígeno molecular (de Montellano 2015). **b)** El ABZ es metabolizado a ABZSO por el CYP3A4 y FMO contribuyendo con un 70% y 30% respectivamente (Rawden et al. 2000). El paso de ABZSO a ABZSOO es mediado por CYP1A (Velík et al. 2005; Marques et al. 2002)

1.6. Resistencia a fármacos en *Giardia*

El fenómeno de resistencia a fármacos en organismos parásitos se ha estudiado por varios grupos. Sin embargo, la respuesta de resistencia es particular de cada parásito, dependen tanto del mecanismo de acción química de cada fármaco como de su biología. De esta manera la resistencia se puede definir como el decremento en la eficiencia de un fármaco provocado por un cambio genético (mutación, deleción o amplificación) o bien cambios epigénéticos o de expresión en su molécula(s) blanco u otras que pueda(n) alterar la respuesta del metabolismo, sitio de interacción o el flujo de salida del fármaco. Paul Ehrlich fue el primero en observar y describir

la resistencia de tripanosomas hacia el rojo de tripano a principios de 1900s. Además, Ehrlich reconoció la posibilidad de generar modificaciones químicas en el medicamento para mejorar la efectividad y disminuir la resistencia (Kaufmann 2008). *G. duodenalis* ha desarrollado resistencia a los principales fármacos que se utilizan para combatirlo. Los principales indicios de ello se tuvieron cuando se analizaron diferencias en la susceptibilidad de aislados a metronidazol y furazolidona (Upcroft et al. 1990). En años recientes se han reportado casos de resistencia para la mayoría de los fármacos incluyendo 5-nitroimidazoles, nitazoxanida, albendazol, furazolidona y quinacrina (Lalle 2010; Leitsch 2015). Así mismo se ha reportado que se puede inducir la resistencia *in vitro* a gran variedad de fármacos, con lo cual se ha establecido una metodología importante para estudiar los mecanismos moleculares y bioquímicos de estas resistencias.

La resistencia a metronidazol (MTZ) es la más estudiada hasta ahora, y en esta participan tanto mecanismos pasivos como activos. La sub-expresión de enzimas que reducen MTZ a intermediarios tóxicos, constituyen la resistencia pasiva, principalmente la PFOR, enzimas de la familia ferredoxina y NTR1 (Nillius et al. 2011; Leitsch et al. 2011). Otros mecanismos de resistencia pasiva involucran la sub-expresión de enzimas que detoxifica al oxígeno, el cual permite la acumulación de oxígeno intracelular y la inactivación de MTZ vía reciclaje redox fútil (Ellis et al. 1993). El mecanismo activo de resistencia ocurre por medio de la sobre-expresión de la nitroreductasa-2 (NTR2) que detoxifica el MTZ por reducción directa a amina inerte, y la tiorredoxina reductasa que provee poder reductor a tiorredoxinas y peroxirredoxinas (Müller et al. 2015; Müller et al. 2013; Leitsch et al. 2016). Recientemente Ansell y colaboradores (2017) realizaron una caracterización transcriptómica de tres líneas resistentes a MTZ, en la cual encontraron genes sobre-expresados (VSPs, proteínas de membrana con contenido alto de cisteína, canales de sodio y calcio, Mad-2 y ácido

graso α -oxidasa) y sub-expresados (NTR-1, cromato y quinona reductasa, enzimas de unión a FMN y numerosos genes relacionados a PFOR) implicados en los mecanismos activos y pasivos de resistencia. Además, la comparación entre las líneas resistentes de *G. duodenalis* y *Trichomonas vaginalis* reveló cambios transcripcionales que se correlacionan, lo cual podría ser una asociación de resistencia a nivel transcripcional entre especies parasíticas (Ansell et al. 2017).

La resistencia a nitazoxanida se ha estudiado mediante análisis transcriptómicos y proteómicos, y se ha sugerido la posible participación de proteínas de choque térmico (HSP), proteínas disulfuro isomerasas (PDI-4) y la NTR1 (Müller et al. 2008; Nillius et al. 2011).

Por su parte, la resistencia a bencimidazoles en helmintos y hongos se ha correlacionado con la presencia de mutaciones en la secuencia de la β -tubulina, en particular en los residuos glutamato 198 y fenilalanina 200 que son importantes en la unión de estos fármacos (Diawara et al. 2013; Hansen et al. 2013; Chavez et al. 1992). Tanto el ABZ como sus metabolitos tienen una alta afinidad por la β -tubulina y el heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina de *Giardia*, lo cual arrestan la polimerización de los microtúbulos (MacDonald et al. 2004). A pesar de la afinidad de ABZ a la tubulina, en las clonas de *Giardia* resistentes a este fármaco, no se ha encontrado mutaciones en los residuos *hotspots*, aunque en estudios bioinformáticos recientes se ha propuesto que la resistencia en la modificación de los residuos 198, 167 y 200 podrían involucrar un mecanismo de apertura/cierre del sitio de unión (Aguayo-Ortiz et al. 2013). En las clonas resistentes no se han detectado mutaciones en la β -tubulina, por lo tanto, no se ha podido establecer si la toxicidad del fármaco se basa exclusivamente a la unión a β -tubulina (Argüello-García et al. 2015; Diawara et al. 2013). Se han documentado re-arreglos cromosómicos, aunque sin evidencia de que afecten a algún gen o grupos de genes particulares (Argüello-García et al. 2009; Upcroft & Upcroft 2001).

2. Antecedentes

Desde los 1990s se ha estado empleando el ABZ como tratamiento contra la giardiasis y se han reportado fallas en el tratamiento, así como la supervivencia de los trofozoítos al aumentar continuamente las concentraciones de ABZ (Nash et al. 2001; Brasseur & Favennec 1995; Kollaritsch et al. 1993).

Los primeros trabajos de inducción de resistencia en *Giardia* a ABZ fueron en 1996, aumentando la dosis constantemente hasta obtener clonas resistentes de 0.8 a 2.4 μM de ABZ (Lindquist 1996; Upcroft et al. 1996). En años recientes, en nuestro grupo de trabajo se han reportado clonas resistentes a 1.35, 8.0 y 250 μM de ABZ por el aumento de dosis sub-letales a partir de 0.5 μM (Cruz-Soto, 2000; Argüello-García et al. 2015).

La metabolización de ABZ en *Giardia* se ha comprobado por medio de anticuerpos contra sus metabolitos, en la que se propone que el ABZ entra al trofozoíto por difusión a través de un daño en la membrana y en el citoplasma es metabolizado, lo cual provoca la unión a los microtúbulos (Oxberry et al. 2000). En años recientes, por medio de HPLC se ha analizado la metabolización de ABZ, en donde se reportó la acumulación progresiva ABZSO y ABZSOO en clonas susceptibles en comparación con las clonas resistentes, sugiriendo una menor conversión del fármaco o una mayor capacidad de degradación y/o detoxificación de los metabolitos. Además, el ABZ genera estrés oxidativo por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), en donde se observó que las clonas resistentes tienen una respuesta antioxidante al expresar enzimas que detoxifican las ROS (NADH oxigenasa, peroxiredoxina 1a y proteína flavodiiron) y presentan una poza de sulfhidrilos mayor (Argüello-García et al. 2015; Paz-Maldonado et al. 2013). Así mismo, se ha reportado que el ABZ induce

aductos de 8-Oxo-2'-deoxiguanosina (8OHdG) y degradación de DNA, un arresto parcial en la fase G2/M y apoptosis, además las clonas resistentes a ABZ presentaron una resistencia cruzada a peróxido (Martínez-Espinosa et al. 2015).

Recientemente García-Solís (2016), describió que los trofozoítos tratados con hemina presentaron valores de concentración media inhibitoria (IC50) significativamente menor para el ABZ en las clonas resistentes como en las sensibles. Además, se observó un aumento significativo en la expresión transcripcional de la CYPOR-like (GL50803_15897) en presencia de hemina. Por otra parte, el tratamiento con proadifen (inhibidor de P450) mostró una protección de trofozoítos sensibles a ABZ, mientras que metimazol (inhibidor de FMO) no mostró algún efecto en la supervivencia de los trofozoítos. Estos resultados sugieren una posible participación de un CYP450-like en *Giardia* que pudiera metabolizar el ABZ. Con la finalidad de encontrar alguna proteína que pudiera estar relacionada con la metabolización de ABZ en *Giardia* y posiblemente con una proteína tipo CYP450-like, se utilizó la técnica DARTS (Drug Affinity Responsive Target Stability) y espectrometría de masas, con la cual se identificó la proteína hipotética GSB_151784. Esta proteína fue reportada con un score TM=0.572 alineado con CYP3A4, la cual fue propuesta como un candidato en la participación de la biotransformación del ABZ.

De esta manera resulta de vital importancia conocer las proteínas involucradas en la biotransformación del ABZ, así como, los posibles mecanismos implicados en la resistencia a este fármaco. En particular, los antecedentes obtenidos en nuestro equipo de trabajo, ofrece una plataforma para estudios enfocados a identificar las proteínas que participan en la biotransformación y de la resistencia de *G. duodenalis* al ABZ.

3. Justificación

La resistencia inducida a albendazol en *G. duodenalis* por exposición a concentraciones sub-letales de esta droga, sugiere que participan diversas proteínas y se activan en el parásito mecanismos que evitan la acción del fármaco. El conocer estos mecanismos nos permitirá entender cómo se establece la resistencia a este fármaco y así proponer otras alternativas para controlar la infección.

4. Hipótesis

Si en la metabolización de ABZ participan proteínas canónicas y en *Giardia duodenalis* se ha generado resistencia a este fármaco, entonces este parásito expresará diferencialmente proteínas que participen en la biotransformación de éste.

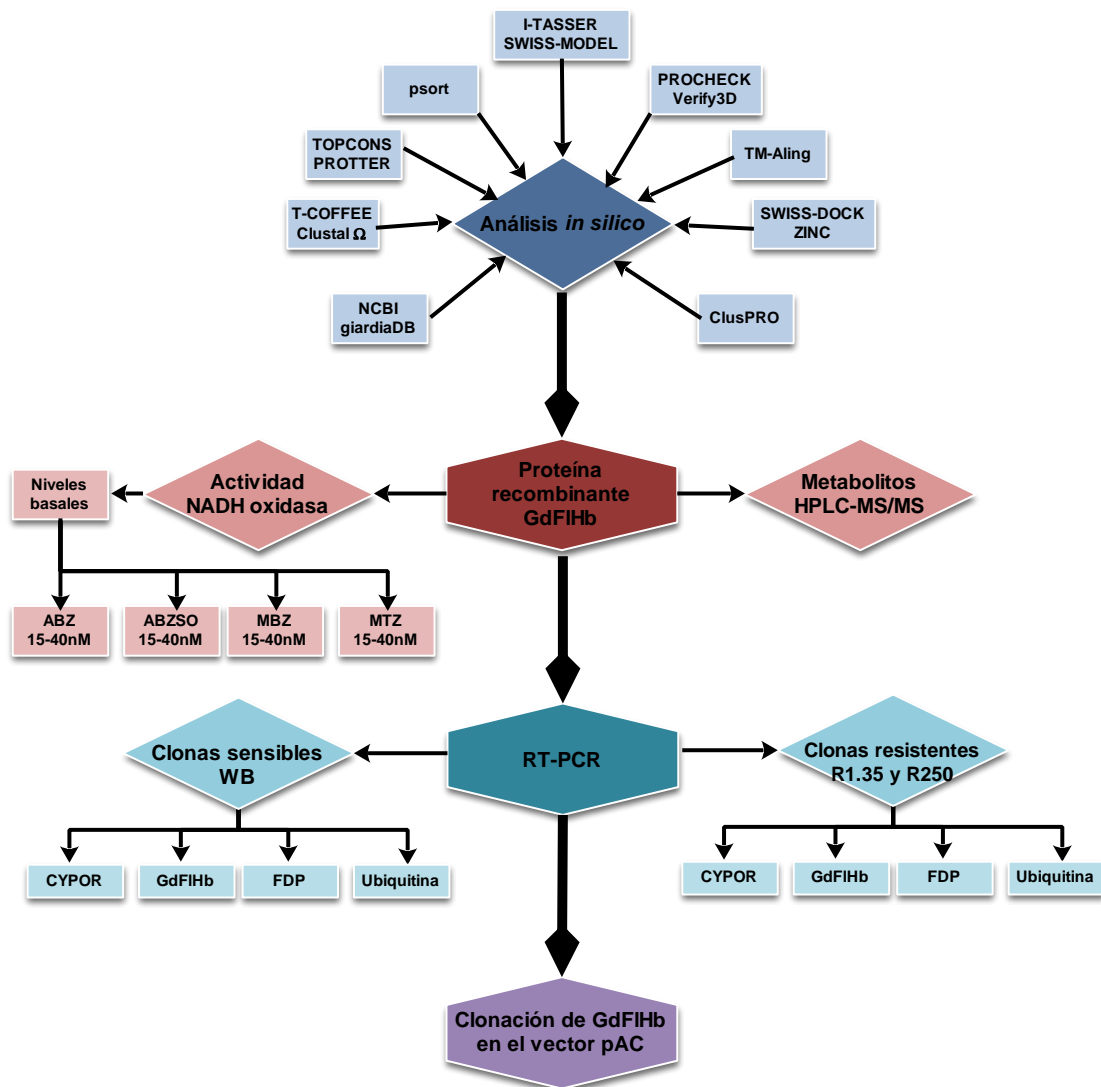
5. Objetivo general

Identificar las proteínas involucradas en la biotransformación del albendazol y evaluar su papel en el mecanismo de resistencia de *Giardia duodenalis* a este fármaco.

5.1. Objetivos particulares

- Realizar análisis *in silico* de proteínas de *G. duodenalis* que pudieran participar en la biotransformación del ABZ.
- Obtener la proteína Flavohemoglobina de *G. duodenalis* en forma recombinante y analizar su actividad y capacidad de transformar el ABZ en sus metabolitos sulfóxido y sulfona mediante HPLC-MS/MS.
- Evaluar la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de ABZ identificadas en este estudio por RT-PCR.
- Clonar en el vector pAC la Flavohemoglobina de *G. duodenalis* para transfectar trofozoítos y evaluar su sensibilidad al ABZ.

6. Estrategia experimental



7. Metodología

7.1. Análisis *in silico*

En el análisis informático se buscaron las proteínas homologas de *G. duodenalis* con citocromos P450s, CYPOR y CYTb5 participes del sistema de biotransformación de ABZ en mamíferos, con el programa BLAST (Altschul et al. 1997) en bases de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y del proyecto genoma de *Giardia* (<http://giardiadb.org/giardiadb/>). Con las secuencias homologas se realizaron Alineamientos Múltiples de Secuencias (MSA) con las herramientas bioinformáticas T-COFFEE (Di Tommaso et al. 2011) y Clustal Omega (Sievers et al. 2014). Además, se realizó análisis de predicción de proteínas transmembranales con TOPCONS (Tsirigos et al. 2015) y Protter (Omasits et al. 2014), y de predicción de localización subcelular con PSORT (Omasits et al. 2014).

Como paso siguiente, se generaron estructuras tridimensionales de estas proteínas con los software SWISS-MODEL (Biasini et al. 2014) y I-TASSER (Yang et al. 2015). Una vez obtenidas las estructuras se procedió a comprobar la calidad estereoquímica de éstas por medio de PROCHECK (Laskowski et al. 1993) el cual analiza la geometría de residuo por residuo y la estructura general, y Verify3D (Eisenberg et al. 1997) que determina la compatibilidad de un modelo atómico (3D) con su propia secuencia de aminoácidos (1D). Posteriormente se realizaron alineamientos estructurales con CYP450 (CYP3A4 y CYP1A1) con el software TM-Align (Zhang & Skolnick 2005). Con las estructuras de las proteínas se realizaron acoplamiento moleculares o *docking* proteína-ligando con SWISS-DOCK (Grosdidier et al. 2011) y la base de datos ZINC (Irwin & Shoichet 2005) para predecir las interacciones de las proteínas con ABZ y sus metabolitos, así

como de los inhibidores de P450, CYPOR y CYTb5. Además, con el servidor ClusPro 2.0 (Kozakov et al. 2017) se realizaron modelados de interacción proteína-proteína.

7.2. Cultivo de Parásitos

Se emplearon trofozoítos de la cepa WB (ATCC #30957) y trofozoítos resistentes a ABZ seleccionadas mediante subcultivo continuo en aumento de las concentraciones sub-letales de ABZ (Sigma cat. A-4673). El cultivo de llevó a cabo en medio TYI-S-33 (ATCC 1404) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hyclone) a 37°C (Keister, 1983) en viales de 4.5mL con tampón de rosca. Los parásitos se cultivaron a concentraciones de 1.35, 8 y 250 μ M de ABZ y los trofozoítos sensibles a ABZ se mantuvieron en presencia de del vehículo el N, N-dimetilformamida, DMF (Paz-Maldonado et al. 2013). Los trofozoítos se cosecharon cuando alcanzaron un porcentaje de 70-80% de confluencia, por enfriamiento en un baño de agua-hielo y se contaron la cámara de Neubauer.

7.3. Actividad de la Flavohemoglobina (GdFIHb)

7.3.1. Purificación de la proteína recombinante GdFIHb

El plásmido pET14b-H6-gFLHb el cual se clonó la proteína recombinante GdFIHb (rGdFIHb) se obtuvo por una donación del Dr. Steven Rafferty de la Universidad de Trent en Canadá. Esta proteína presenta un Tag de Histidinas (6xHIS) para purificación en columna de agarosa NI-NTA. Con esta construcción se transformaron células de *E. coli* BL21 competentes, las cuales se crecieron en medio Terrific Broth (TB) con ampicilina, y la proteína recombinante se purificó por medio de la columna His-Trap.

Para este protocolo se partió de un cultivo semilla de 5mL en medio Luria Bertani (LB) con un crecimiento mínimo de 12 hrs. De este cultivo semilla se tomó 1mL y se inoculó en un matraz con 500mL de medio TB, se incubó a 37°C hasta que alcanzó una densidad óptica cercana a 0.5 ($OD_{600} = 0.5$) y se agregó 0.5 mM de IPTG para inducir expresión de la proteína. Se indujo expresión por 24 a 48 hrs, se empastilló a 6500 x g por 5 min, a esta pastilla se agregó 30 mL de buffer de unión 1X (50 mM Tris-HCl, 0.5M NaCl a pH 7.5) y un coctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche), se colocó en hielo y se procedió a sonicar la muestra. El lisado se centrifugó a 6500 x g por 30 min, se colectó el sobrenadante (amarillo-anaranjado).

Para la preparación de la columna se agregaron 4 mL de agarosa NI-NTA, añadiéndose después 10 mL de buffer de unión 1X, seguido se agregó la muestra y se incubó por 20-30 min, posteriormente se agregaron 15 mL de buffer de lavado 1X (50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 25 mM imidazol a pH 7.5). Finalmente, la proteína se eluyó con 15mL de buffer de elución 1X (50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 250 mM imidazol a pH 7.5). La proteína recombinante se concentró empleando el filtro Amicon grado ultrafiltración con corte molecular de 10 y 30 kDa. La proteína se cuantificó por ensayo de BCA y la calidad de la extracción por un gel SDS-PAGE al 10%, y se almacenó a 4°C hasta su uso posterior.

7.3.2. Actividad NADH oxidasa de GdFIHb

Para medir la actividad NADH oxidasa de la Flavohemoglobina recombinante (rGdFIHb) se realizó por medio del consumo de NADH, se midió considerando el tiempo de reacción y empleando un espectrofotómetro Cary 400 Bio UV-visible a una longitud de onda de 340 nm. Las condiciones del ensayo fueron 37°C, buffer de potasio 50 mM a pH de 7.5, 100 μ M de NADH o NADPH y 1 μ M de FAD.

Los niveles basales de oxidación del NADH, se cuantificaron en presencia de rGdFIHb a diferentes concentraciones para definir los valores de la curva que fuera representativos visualmente a un cambio en su actividad. Se midieron los niveles de oxidación de rGdFIHb en presencia fármacos con diferentes concentraciones ABZ 0.5 nM a 16 μ M, ABZSO 15 nM a 40 nM, Mebendazol 15 nM a 40 nM y Metronidazol 15 nM a 40 nM. Como control positivo se utilizó DEA-NONOato (100 μ M) que es el sustrato estándar de esta proteína.

Para el cálculo de la actividad específica se utilizó la siguiente formula:

$$a = \frac{m \cdot F \cdot vol}{\epsilon \cdot e}$$

a: actividad específica

m: es la pendiente de la recta

F: factor de dilución

vol: volumen del ensayo

ϵ : Coeficiente de extinción de NAD(P)H (6.22 mM)

e: Concentración de proteína

Las actividades específicas se expresaron en ***nmol/min* · *mg*_{proteína}** y en porcentajes en relación con la actividad basal.

7.4. Cuantificación de metabolitos de GdFIHb por HPLC-MS/MS

7.4.1. Fármacos y condiciones cromatográficas

Los fármacos ABZ, ABZSO y ABZSOO fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA). El metanol, éter, ciclorometano y cloroformo fueron de grado HPLC (Mallinckrodt, Co., St Louis, MO, USA). El ácido Fórmico reactivo de grado analítico (Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO, USA). El agua fue obtenida *in-house* del sistema Milli-Q Water (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)

7.4.2. Cuantificación de metabolitos por la Flavohemoglobina

Preparación de las muestras: para los ensayos de actividad de ABZ y ABZSO se colectaron en tubos Eppendorf de 1.5 µL y se almacenaron a -70°C, hasta la extracción de los metabolitos por disolventes orgánicos.

Extracción en fase orgánica: un volumen de 300 µL de muestra se transfirió a tubos de vidrio de 10 mL y se agregaron 100 µL de solución CBZ (200 ng/mL) como solución interna (SI). Después se adicionaron 5 mL de éter-diclorometano-clorformo (60:30:10, v/v/v), las muestras fueron agitadas en un vortex por 5 min, y se centrifugaron por 20 min a 3000 rpm. Las muestras se congelaron a -70°C por 30 min y la fase superior orgánica se transfirió a tubos de vidrios y se evaporaron a 45°C con una corriente de nitrógeno. Los residuos se reconstituyeron con 100 µL de metanol-agua (70:30, v/v) y se inyectó una alícuota de 10 uL en el sistema cromatográfico para su análisis.

Preparación de muestra estándar y control de calidad: se preparó una solución stock de ABZSO (1 mg/mL) y ABZSOO (1 mg/mL) en metanol. Las soluciones stock se diluyeron con metanol para obtener soluciones estándar de 100, 10 y 1 ug/mL. Las soluciones estándar fueron diluidas con la fase

móvil (metanol-agua 70:30, v/v) obteniendo concentraciones de 15-500 ng/mL para ABZSO y de 7.5-200 ng/mL para ABZSOO. De esta manera, la curva de calibración se realizó con 950 μ L de fase móvil con 50 μ L de solución estándar obteniendo concentraciones de 15, 20, 30, 50, 150, 200, 250 y 500 ng/mL para ABZSO, y 7.5, 10, 150, 20, 40, 50, 75, 100 y 200 ng/mL para ABZSOO.

Condiciones cromatográficas: El sistema de Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS/MS), consistió de una bomba cuaternaria Agilent 1100 y un auto-muestreador (Palo Alto, CA, USA). La separación cromatográfica se llevó a cabo en la columna analítica Gemini C18 (150 x 4.6 mm, 5mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) con una pre-columna (Phenomenex C18 ODS). La fase móvil estuvo compuesta por metanol:ácido fórmico 5 mM (70:30, v/v) con un flujo constante de 0.7 mL/min. El espectro de masas se obtuvo con el equipo triple cuadrupolo ABZciex 3200 QTrap (ABSciex, Darmstadt, Germany) provisto con ionización de tipo electrospray operado en modo de ionización positiva. Los parámetros dependientes de recursos fueron optimizados de la siguiente manera: cortina de gas 20 psi, voltaje de ion spray 5500 V, temperatura 600°C, gas nebulizador 50 psi y gas caliente 40psi. Los parámetros de componentes dependientes también fueron optimizados: potencial declustering, potencial de entrada y energía de colisión para ABZSO fueron 20, 0.5 y 16 eV; para CBZ 4, 4.0 y 22 eV. Para la adquisición de los datos y preparación se usó el software Analyst 1.6.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), y el análisis cuantitativo fue llevado por el software MultiQuant3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). En la cuantificación se usó monitoreo de reacción múltiple (MRM) de las siguientes transiciones: m/z 282 \rightarrow 240 para ABZO, and m/z 237.2 \rightarrow 194.1 para CBZ.

7.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR)

La extracción de RNA se realizó por TRIzol (Invitrogen). Para ello se añadieron 0.75 mL de TRIzol por cada 0.25 mL de muestra a concentración 1×10^7 células, la mezcla se homogenizó en hielo y en el vortex por lo menos tres ciclos. Posteriormente se añadieron 0.2 mL de cloroformo, se homogenizó y se incubó en un baño de hielo por 3min, se centrifugó a 12000 x g a 4°C por 15 min. En seguida se recuperó la fase ligera en un tubo, se añadieron 0.5mL de isopropanol, se incubó en un baño de hielo por 10 min y se centrifugó a 12000 x g a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol al 75%, se homogenizó suavemente y se centrifugó a 12000 x g por 5 min, se retiró el sobrenadante y se dejó secar, por último, éste se resuspendió en 80 µL de agua libre de RNasas.

La calidad se verificó con geles de agarosa al 1%, las muestras se tratarán con DNasa I grado amplificación (Life Technologies) por 30 min a 37°C. La síntesis de cDNA se realizó con los oligonucleótidos y el kit SuperScript II RNasa H-final siguiendo las especificaciones del proveedor. La condición de la PCR fue: 94°C por 5 min, después por 30 ciclos 94°C por 30 seg, 64°C por 30 seg, 72°C por 30 seg y 72°C por 5 min.

7.5.1. Análisis densitométrico de los geles

Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa-bromuro de etidio al 3%. La cuantificación de los niveles de expresión se llevó a cabo por medio de densitometría de la intensidad de las bandas en las imágenes de los geles. El equipo utilizado para el registro y densitometría de los geles fue un fotodocumentador Universal Hood II (BIO-RAD) cargado con el software QuantityOne (BIO-RAD). Para la valoración se tomó en cuenta la intensidad

de la banda seleccionada contra la intensidad de la amplificación de una banda obtenida independientemente que corresponde a un transcrito de ubiquitina que se considera un gen constitutivo, y que se corrió como control de carga para cada muestra.

El valor de expresión reportado fue el resultado del cociente de la intensidad de la banda del transcrito seleccionado dividido entre el valor de ubiquitina. Se obtuvo la media de los valores de cocientes de tres repeticiones independientes, y se calculó la media y la desviación estándar.

7.6. Clonación de la Flavohemoglobina de *G. duodenalis* en el vector pAC

La clonación del gen GdFIHb en pJET1.2/blunt se llevó con la siguiente reacción de ligación: se agregaron 10 μL de buffer reacción 2X, 1 μL de producto de PCR, 1 μL del vector pJET1.2/blunt, 1 μL de ligasa de DNA T4 y se aforó a 20 μL con agua libre de nucleasas. Se agitó brevemente y se centrifugó por 3-5s, posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 5min. Posteriormente se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α . Para el análisis de clones recombinantes se realizó colony PCR con la reacción, en éste se emplearon 2 μL de buffer Taq, 2 μL de dNTPs mix 2 μM , 1.2 μL de MgCl_2 25 mM, 0.4 μL de oligos Forward y Reverse de pJET1.2 y GdFIHb 10 μM , 0.1 μL de Taq DNA polimerasa (5U/ μL) y se aforó a 20 μL de agua libre de nucleasas. Con el programa 95°C por 3 min, 94°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 1 min y se mantuvo a 4°C al finalizar 30 ciclos.

Para la clonación en el vector pAC: se cultivaron 20 mL de medio LB + amp de las clones candidatas que presentaron el inserto de pJET_GdFIHb, se extrajeron los plásmidos con el kit PureLink Quick Plasmid Miniprep y se

realizó la digestión de estos. La mezcla de reacción para la digestión fueron 10 μ L de buffer 1.3.1 10X, 2 μ L de enzima EcoRV, 2 μ L de enzima NotI, 10 μ g de DNA plasmídico (pJET_GdFIHb y pAC) y se aforó a 100 μ L con agua. La digestión se realizó por 18 hrs de incubación, y una hora extra de incubación con CIP para el vector pAC. Las digestiones se analizaron en geles de agarosa al 1%. Se cortaron las bandas interés de los geles y se procedió a extraerlos con el kit QIAquick Gel Extraction. Los fragmentos obtenidos se cuantificaron y se realizó la reacción de ligación agregando 1 μ g de inserto (GdFIHb), 1 μ g del vector (pAC), 5 μ L de buffer 10X, se aforó a 10 μ L con agua, y la mezcla se incubó a 14°C overnight y una hora a 37°C. Por último, se procedió a transformar bacterias *E. coli* DH5 α . Para el análisis de clonas recombinantes se realizó colony PCR.

Para la extracción de plásmido se utilizó con el kit PureLink Quick Plasmid Miniprep, el cual tiene el siguiente proceso: se cosecharon 5mL de cultivo LB + amp, el cual se respondió en 250 μ L buffer de resuspensión con RNasa A(R3), se agregaron 350 μ L de buffer de precipitación (N3) y se centrifugó a 12000 x g por 10 min, el sobrenadante se colocó en la columna Spin y se centrifugó a 12000 x g por 1 min, y se agregaron 200 μ L de isopropanol para el lavado y 750 μ L de buffer de lavado (PE) con etanol y se centrifugó a 12000 x g por 1 min. Posteriormente se colocó la columna Spin en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se agregó 100 μ L de buffer TE, y se incubó a temperatura ambiente por 1min, y se centrifugó a 12000 x g por 2 min. Se cuantificó con el NANODROP 2000 (Thermo Fisher Scientific) y se almacenó a -20°C.

Para la secuenciación se utilizó el kit BigDye Terminator v 3.1, la reacción constó de 1 μ L de BigDye Terminator Mix, 2 μ L de buffer BigDye Terminator, 1 μ g de DNA plasmídico, 2 μ L Mix de primers 10 μ M, 1 μ L de Betaína 100%, 1 μ L de DMSO 100% y se aforó a 10 μ L con agua libre de nucleasas. El programa que se siguió fue: 96°C por 2 min, 96°C por 10s, 54°C por 10,

60°C por 4 min, 4°C por 7 min y mantuvo a 4°C al finalizar los 30 ciclos. Posteriormente se pasó a la limpieza de la reacción con EDTA: el contenido de la PCR se agregó en un tubo de 1.5 mL Eppendorf, se agregaron 5 µL de EDTA 125 mM y 60µL de etanol absoluto, se incubó a temperatura ambiente por 15min y se centrifugó a 13500 x g por 20 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 60 µL de etanol al 70% y se centrifugó a 13500 x g por 5 min, y se retiró el sobrenadante, este lavado se realizó dos veces. Por último, el tubo se dejó abierto hasta que el contenido se secó y posteriormente se almacenó a -20°C.

7.7. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos de por al menos 3 experimentos se expresaron como media \pm desviación estándar (SD). La evaluación entre las muestras problema con el control se evaluaron por mediante la prueba T-student para una muestra (One Sample T Test) con el software R-Studio (R Core Team 2017). La significancia estadística es expresada con $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** y $p > 0.001$ ***.

8. Resultados

8.1. Análisis *in silico*

La búsqueda de secuencias homólogas del sistema de biotransformación de ABZ que se presenta en eucariontes (levaduras, plantas y mamíferos), arrojó que en el genoma de *G. duodenalis* no tiene genes codificantes para proteínas homólogas CYP450. En el caso de la CYPOR se encontró como proteína homóloga la CYPOR putativa (GL50803_15897) propuesta por García-Solís (2016), y para citocromo b5 (CYTb5) dieron como resultados las cuatro isoformas ya reportadas por Rafferty & Dayer en el 2015 (CYTb5_I: GL50803_9089, CYTb5_II: GL50803_27747, CYTb5_III: GL50803_33870, CYTb5_IV: GL50803_2972) y así como una proteína hipotética posiblemente una nueva isoforma (GL50803_17116).

Tabla 3. Proteínas homólogas de *G. duodenalis* al sistema de biotransformación de ABZ de eucariontes.

Proteína	ID GiardiaDB	Nombre	Score	Cobertura	Valor -E
CYP450	GL50803_21201	Proteína hipotética	24.6	3%	0.074
	GL50803_14346	Proteína hipotética	25.0	4%	0.080
	GL50803_16533	Proteína 21.1	34.7	54%	0.038
	GL50803_114912	Proteína hipotética	32.3	45%	0.26
	GL50803_33218	Dineína	23.1	20%	0.27
	GL50803_6901	Proteína hipotética	30.0	47%	0.52
CYPOR	GL50803_15897	CYPOR putativo	120	77%	1e-28
	GL50803_91252	Óxido nítrico sintasa inducible	58.9	38%	2e-09
	GL50803_14324	Proteína rica en cisteína	33.5	5%	0.076
	GL50803_14225	Proteína rica en CXC	33.1	3%	0.20
	GL50803_103992	VSP	32.7	2%	0.99

	GL50803_27747	CYTb5 II	53.1	83%	1e-09
	GL50803_9089	CYTb5 I	45.4	54%	9e-07
	GL50803_2972	CYTb5 IV	40.0	60%	4e-05
CYTb5	GL50803_17116	Proteína hipotética	39.3	74%	3e-04
	GL50803_33870	CYTb5 III	39.3	63%	1e-04
	GL50803_16592	transportador ABC	26.6	29%	8.3

A la fecha se ha descrito que en *G. duodenalis* solo existen cinco proteínas que pueden coordinar el grupo hemo, la Flavohemoglobina (GdFIHb) y las cuatro isoformas de CYTb5. Las isoformas de CYTb5 son reducidas por GiOR-1, y tienen la capacidad de reducir a otras moléculas. La GdFIHb tiene actividad de dioxigenasa metabolizando al óxido nítrico (NO) para formar nitratos (NO₃). De esta manera, la GdFIHb surgió como posible candidato en la biotransformación del ABZ.

De las tres proteínas de *G. duodenalis*, GdFIHb, CYPOR y CYTb5I-IV, se realizaron Análisis Múltiples de Secuencias (MSA) con proteínas de diferentes especies para observar dominios y firmas conservadas. También se evaluaron las homologías estructurales de los modelos por I-TASSER y los modelos ya cristalizados de estas proteínas, utilizando la herramienta TM-Align.

Las Flavohemoglobinas (FIHb) son proteínas citosólicas que están compuesta por la fusión de una globina y la ferredoxina reductasa like con los dominios FAD y NAD(P)H, estas proteínas están ampliamente distribuidas en bacterias y en algunas eucariotas. El alineamiento de secuencias se realizó con proteínas bacterianas y eucariotas.

Tabla 4. Lista de proteínas utilizadas para el MSA de Flavohemoglobinas.

Especie	Nombre asignado	NCBI
<i>Giardia duodenalis</i>	Flavohemoglobina	XP_001704478
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Flavohemoglobina	NP_011750*
<i>Escherichia coli</i>	Flavohemoglobina	AEJ57821*
<i>Shigella dysenteriae</i>	Flavohemoproteína	WP_000883162
<i>Angomonas deanei</i>	Óxido nítrico dioxigenasa	EPY14997

*Estructuras cristalizadas (PDB)

La Flavohemoglobina de *G. duodenalis* mantiene muchos de los residuos conservados en los dominios FAD-pirofosfato, FAD- isoaloxazina, NAD(P)H-ribose y NAD(P)H-adenina, y la Histidina conservada de unión a hemo (GdFIHb: His107, ScFIHb: His85, EcFIHb: His85, SdFIHb: His85, AdNOD: His54 y AspFIHp: His86). Según el alineamiento en T-COFFE, la GdFIHb tiene un mayor parecido a su homólogo de *A. deanei* (parásito tripanosomátido flagelado de insectos), y con el grupo *E. coli* y *S. dysenteriae*, y por último con *S. cerevisiae*. La GdFIHb también presenta dos inserciones únicas de función desconocida reportada por Rafferty y colaboradores en el 2010 (Glu74 a Cys94 en el extremo N-terminal del dominio globina y Ala283 a Ala309 en el extremo C-terminal en el dominio de unión a FAD).

Como siguiente paso, se analizó la calidad estereoquímica de los modelos con el software PROCHECK: el gráfico Ramachandran indicó que el 71.0% de los residuos están en regiones más favorecidas, el 21.2% regiones permitidas adicionales, el 5.9% regiones generosamente permitidas y el 2.0% regiones no permitidas. El resultado de Verify3D comprobó que el 90.17% de los residuos pasaron la relación 3D/1D ≥ 0.2 , el cual determina que el modelo tiene una buena calidad estructural.

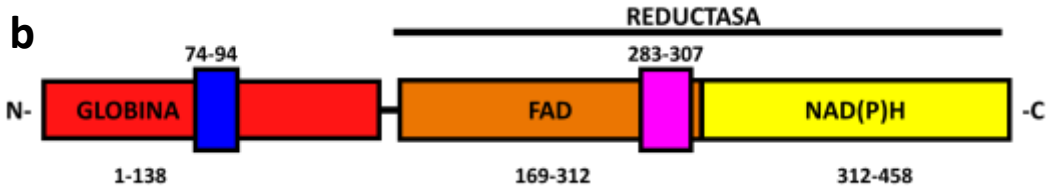
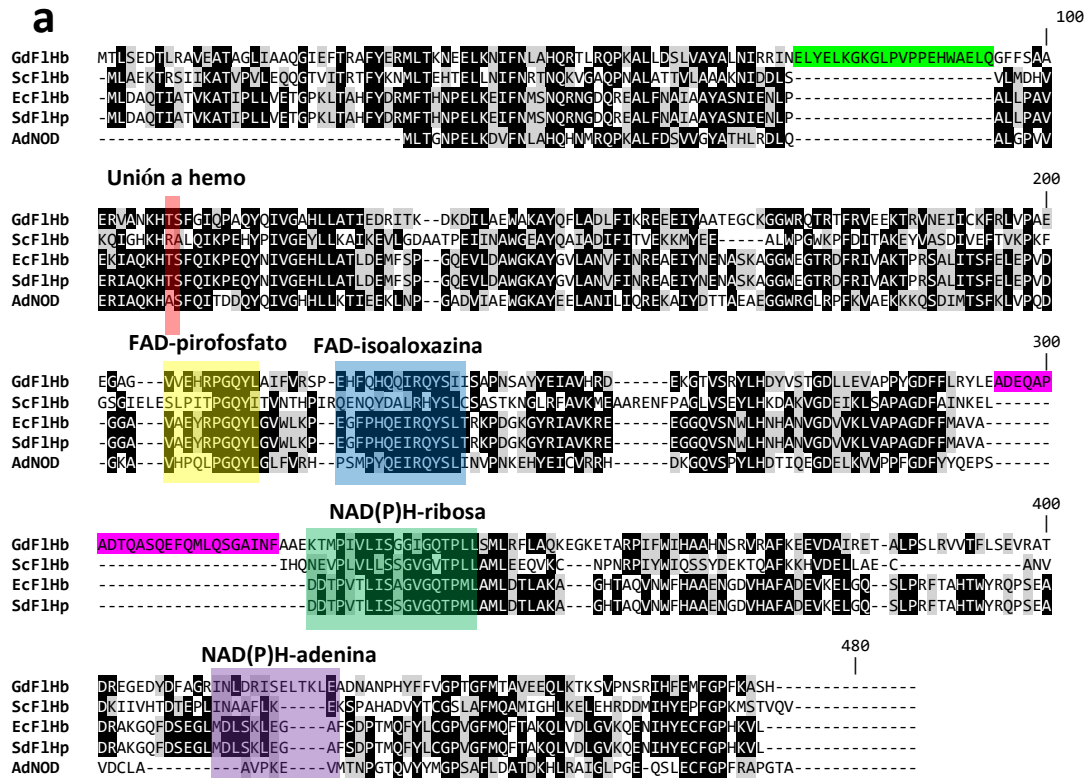


Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias de Flavohemoglobinas. **a)** MSA de Flavohemoglobinas de diferentes especies, se representa los sitios de unión a cofactores (FAD y NAD(P)H), al grupo hemo e inserciones únicas. *G. duodenalis* (GdFIHb), *S. cerevisiae* (ScFIHb), *E. coli* (EcFIHb), *S. dysenteriae* (SdFIHb), *A. deanei* (AdNOD). **b)** Representación de los dominios (Globina: rojo; FAD: anaranjado; NAD(P)H: amarillo) e inserciones únicas (inserción en el dominio Globina: azul; dominio FAD: rosa) de *G. duodenalis*. La numeración de aminoácidos está basada en la secuencia de Flavohemoglobina de *E. coli* (UniProt: P24232).

Se comparó estructuralmente el modelo GdFIHb con modelos ya cristalizados de *E. coli* (PDB ID: 1GVH) y *S. cerevisiae* (PDB ID: 4g1v). La GdFIHb presentó una mayor homología con *E. coli* (TM-score= 0.96386) que con *S. cerevisiae* (TM-score= 0.87938), lo cual se puede explicar por el

hecho de que *G. duodenalis* adquirió por transferencia horizontal la GdFIHb de proteobacterias como *E. coli* (Andersson et al. 2003). Su homología con CYP450 típicos como CYP3A4 (PDB ID: 1tqn) y CYP1A1 (PDB ID: 4i8v) de humano, mostraron una baja homología estructural con CYP3A4 donde el TMscore fue de 0.24010 (RMSD entre 183 residuos de 7.16Å) y para CYP1A1 el TMscore fue de 0.24937 (RMSD entre 190residuos de 6.99Å).

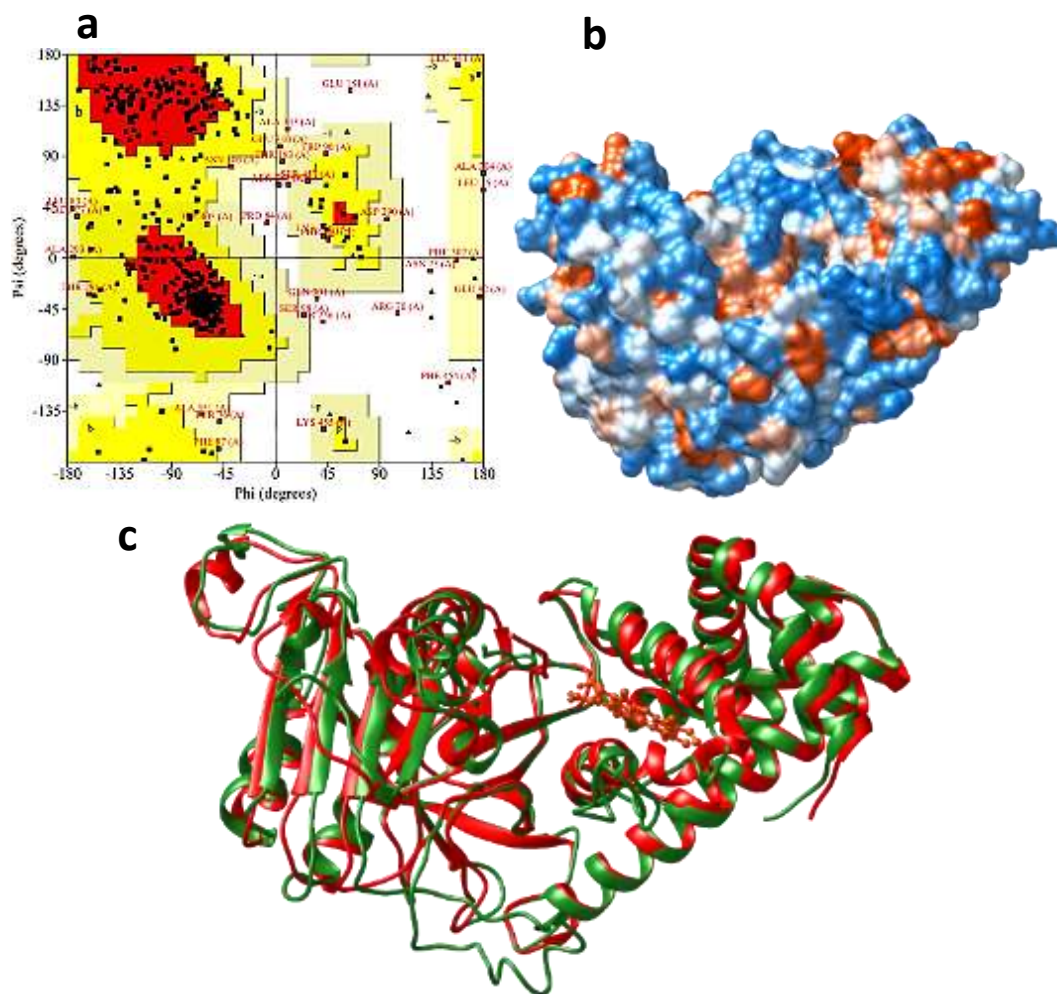


Figura 7. Calidad estereoquímica y homología estructural de GdFIHb. **a|** Gráfico de Ramachandran. **b|** Superficie molecular de GdFIHb coloreada acorde a la hidrofobicidad relativa de las cadenas laterales, el color azul corresponde a residuos polares y los rojos indican residuos hidrofóbicos. **c|** Sobreposición de GdFIHb (verde) y EcFIHb (rojo y grupo hemo anaranjado), RMSD entre 396 átomos de 1.44Å.

Los resultados de los softwares concuerdan con las características de la familia de las CYPORs, ya que las plataformas TOPCONS y Protter determinaron que la GdFIHb no presenta péptido señal de dominio transmembranal y la predicción subcelular con PSORT lo ubica como proteína citoplasmática (citoplasma 60.9%, nuclear 21.7%, citoesqueleto 8.7%, mitocondrial y peroxisomal 4.3%).

Por otra parte, debido a que las CYPORs catalizan la transferencia de electrones de $\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{FMN}$ a CYP450, CYTb5 o citocromo c y solo se transfiere un electrón a la vez. Existen dos conformaciones que permite este proceso, la conformación “cerrada” que permite el contacto de Van der Waals entre las dos flavinas isoaloxazina y la transferencia de un electrón, mientras que la conformación “abierta” que permite transferir el electrón de FMN al socio redox (CYP450). Para el análisis múltiple de secuencias se utilizaron proteínas prototipo de diferentes eucariotas.

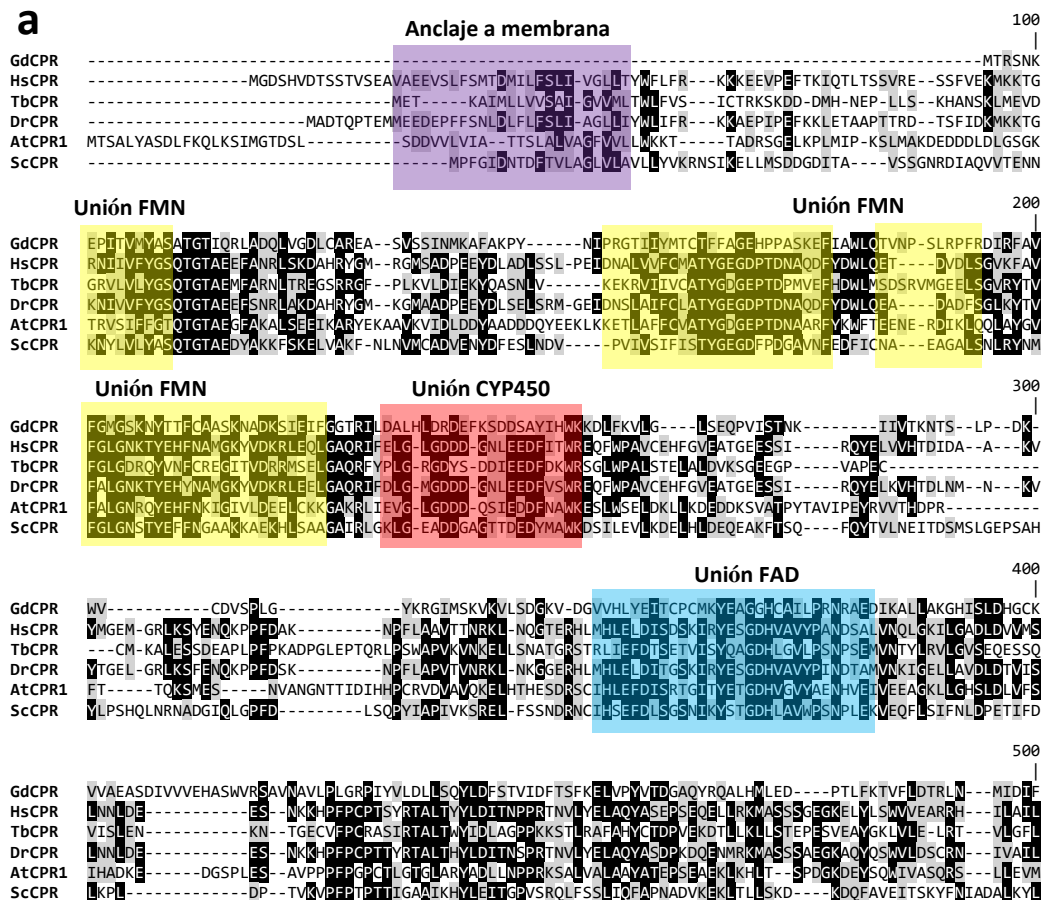
Tabla 5. Listas de proteínas para el análisis de secuencia de CYPORs.

Especie	Proteína	NCBI
<i>G. duodenalis</i>	CYPOR	XP_001704198
<i>Trypanosoma brucei</i>	CYPOR	XP_828912
<i>Homo sapiens</i>	CYPOR	AAG09798*
<i>Danio rerio</i>	Oxidoreductasa b	NP_001307368
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P450 reductasa 1	NP_194183
<i>S. cerevisiae</i>	CYPOR	BAA02936*

*Estructuras cristalizadas

La CYPOR de *G. duodenalis* (GdCYPOR) mantienen muchos de los residuos conservados principalmente en los dominios de unión a FMN, FAD y NAD(P)H, y para el dominio de unión a CYP450 el número de residuos conservados disminuye lo cual podría indicar que no tiene afinidad con algún CYP450-like, si no por otras proteínas que necesiten ser reducidas. Los residuos de anclaje a membrana de retículo endoplasmático que se

encuentran en la mayoría de las CYPORs de eucariotas, no se encuentra en *G. duodenalis*. Aunado a esto, el uso de los softwares TOPCONS y Protter no revelaron una señal transmembranal en la secuencia y la predicción subcelular con PSORT lo ubicó como proteína citoplasmática (citoplasma 56.5%, nuclear 21.7%, mitocondrial 17.4% y citoesqueleto 4.3%). Además, la secuencia presenta una inserción única de 27 residuos en el dominio de unión a NADPH (Trp530 a CYS 557 en el extremo C-terminal). El alineamiento de secuencias con T-COFFE, colocó a la GdCYPOR como un grupo externo muy distintos a las otras CYPORs analizadas, dentro de éstas la que tiene un parecido más cercano es con el homólogo de *S. cerevisiae*.



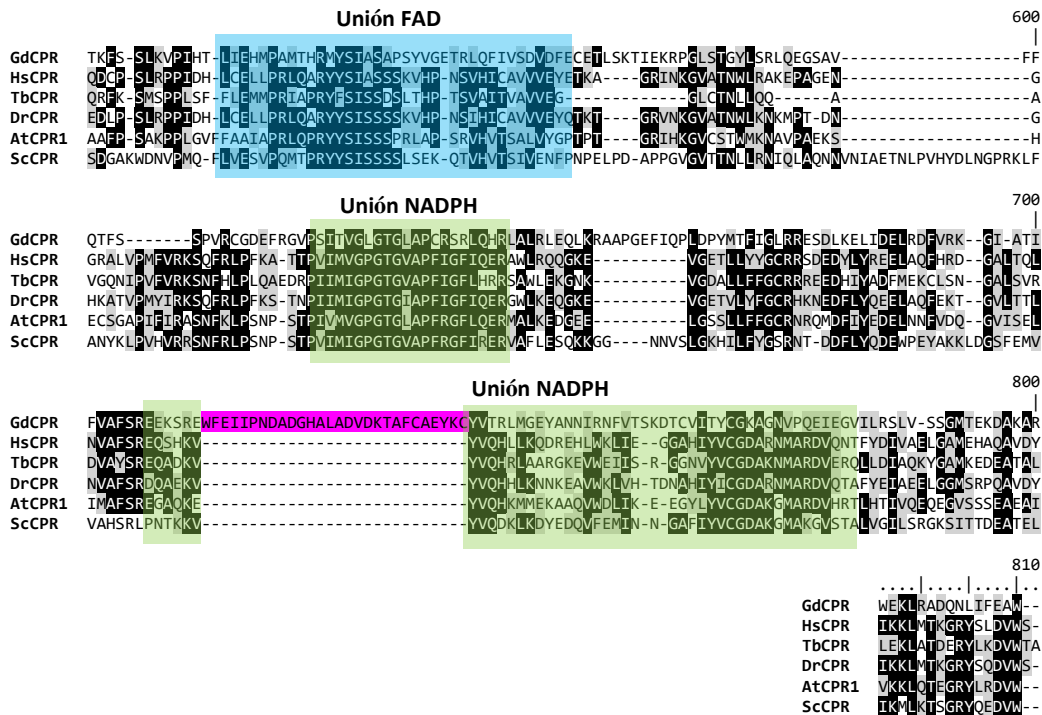


Figura 8. Alineamiento múltiple de secuencias de CYPOR. **a)** MSA de CYPOR de *G. duodenalis* (GdCPR), *T. brucei* (TbCPR), *H. sapiens* (HsCPR), *D. rerio* (DnCPR), *A. thaliana* (AtCPR) y *S. cerevisiae* (ScCPR). Se representa los sitios de unión a cofactores (FMN, FAD y NAD(P)H), a citocromos P450 e inserción única. **b)** Representación de los dominios (FMN: amarillo; FAD: rojo; NAD(P)H: anaranjado) e inserción de 27 residuos (en el dominio NAD(P)H color azul) de *G. duodenalis*. La numeración de aminoácidos está basada en la secuencia de CYPOR de *S. cerevisiae* (UniProt: P16603).

La calidad estereoquímica de los modelos fue analizada con el software PROCHECK, mediante el gráfico Ramachandran se determinó que el 66.7% de los residuos están en regiones más favorecidas, el 26.1% en regiones permitidas adicionales, el 5.1% en regiones generosamente permitidas y el 2.1% en regiones no permitidas. El resultado de Verify3D permitió comprobar que el 80.98% de los residuos pasaron la relación $3D/1D \geq 0.2$.

Se comparó estructuralmente el modelo de CYPOR de *G. duodenalis* con modelos ya cristalizados de *H. sapiens* (PDB ID: 5fa6) y *S. cerevisiae* (PDB ID: 3fjo). La CYPOR de *G. duodenalis* presenta una mayor homología con *H. sapiens* (TM-score= 0.90883) que con *S. cerevisiae* (TM-score= 0.65189). Esta homología estructural es contradictoria al alineamiento de secuencia, ya que en el MSA tiene una relación más cercana con la de *S. cerevisiae* y así estuvieron más relacionados filogenéticamente.

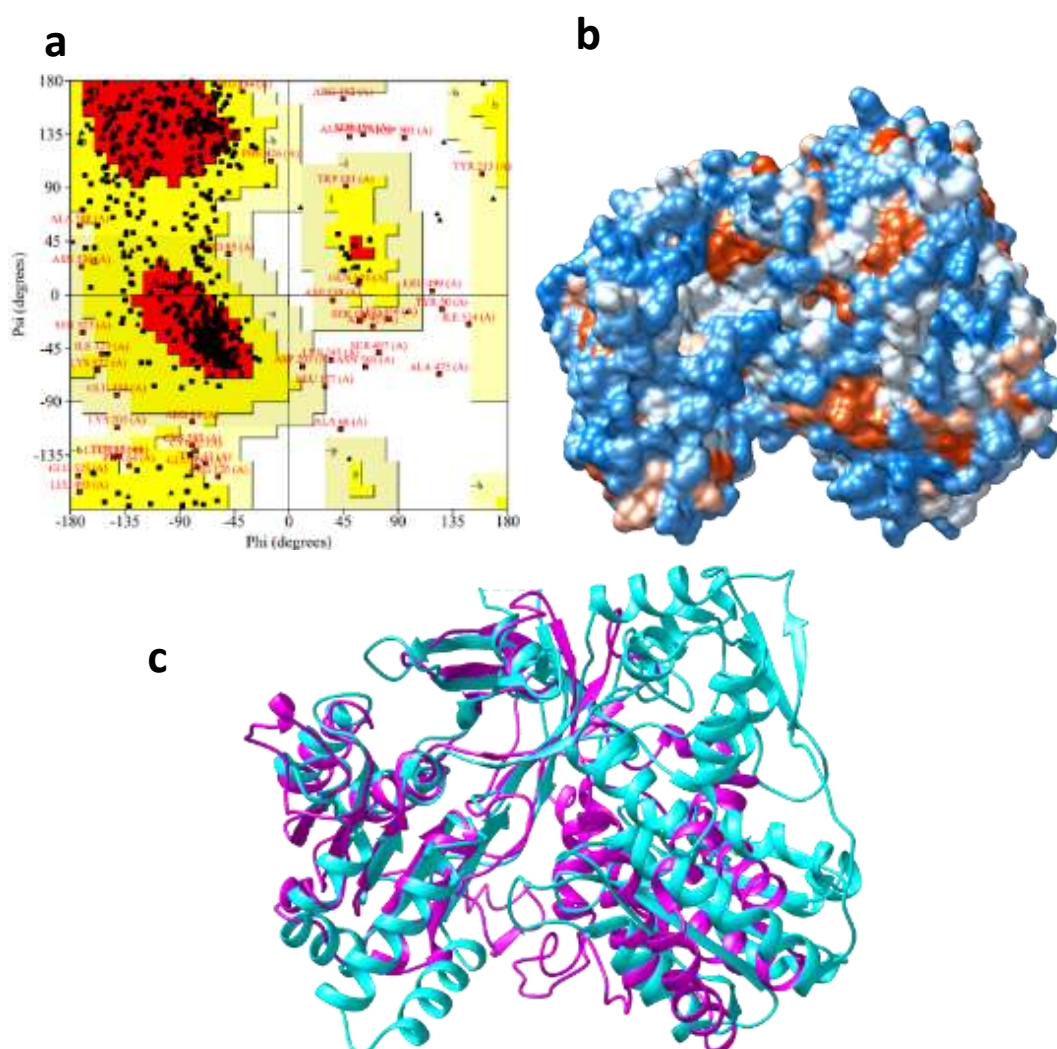


Figura 9. Calidad estereoquímica y homología estructural de GdCYPOR. **a]** Gráfico de Ramachandran. **b]** Superficie molecular coloreada acorde a la hidrofobicidad relativa de las cadenas laterales. **c]** Sobreposición de GdCYPOR (magenta) y HsCPR (azul), RMSD entre 567 átomos de 1.58 Å

En el caso de los citocromos b5 (CYTb5) se encuentran en todos los organismos y se definen por un dominio compacto de unión a hemo de alrededor de 80 residuos, el cual coordina axialmente el hierro del hemo por residuos de histidina altamente conservadas. Los miembros incluyen proteínas solubles y de anclaje a membrana de retículo endoplasmático. El CYTb5 recibe electrones de CYTb5 oxidoreductasa (CYTb5R) y de CYPOR, y dona los electrones a CYP450. Para el alineamiento de secuencias se utilizaron las proteínas modelos de eucariotas más caracterizadas.

Tabla 6. Listas de proteínas utilizada para el MSA de CYPOR.

Espece	Proteína	NCBI
<i>G. duodenalis</i>	CYTb5 isoforma I	XP_001708782
<i>G. duodenalis</i>	CYTb5 isoforma II	XP_001708389
<i>G. duodenalis</i>	CYTb5 isoforma III	XP_001704041
<i>G. duodenalis</i>	CYTb5 isoforma VI	XP_001707700
<i>H. sapiens</i>	Citocromo b5	NP_683725*
<i>Bos taurus</i>	Citocromo b5	NP_776458*
<i>A. thaliana</i>	Citocromo b5 isoforma A	NP_173958
<i>S. cerevisiae</i>	Citocromo b5	AJT31065

*Estructuras cristalizadas (PDB)

Las isoformas de CYTb5 de *G. duodenalis* (GdCYTb5) conservan la mayoría de los residuos, las cuatro isoformas son muy similares en su secuencia CORE con 36-41% de identidad aminoacídica, las secuencias que flanquean al CORE no son conservadas entre las isoformas. Las dos histidinas que coordinan el grupo hemo se encuentran en todas las isoformas (CYTb5_I: HIS65, CYTb5_II: HIS67, CYTb5_III: HIS66 y CYTb5_IV: HIS178). La secuencia hidrofóbica de anclaje a membrana, presente en CYTb5 de mamíferos, no la presentan las cuatro isoformas, además mediante el uso TOPCONS y Protter no se encontraron señal transmembranal y la predicción subcelular con PSORT los ubica como proteínas citoplasmáticas (citoplasma 65-74%, nuclear 13-22%, mitocondrial 17.4% y citoesqueleto 4.3%) como lo reporta Pyrih y colaboradores (2014) , aunque para la isoforma CYTb5_IV

tienen el mismo porcentaje para ubicación nuclear como citoplasmática (39.1%). En el alineamiento de secuencias con T-COFFE, las isoformas CYTb5_I y CYTb5_II los colocan en un grupo por su similitud, al igual al CYTb5_III y CYTb5_IV, y a las cuatro isoformas de *G. duodenalis* las cataloga como grupo externo de las otras cuatro secuencias analizadas.

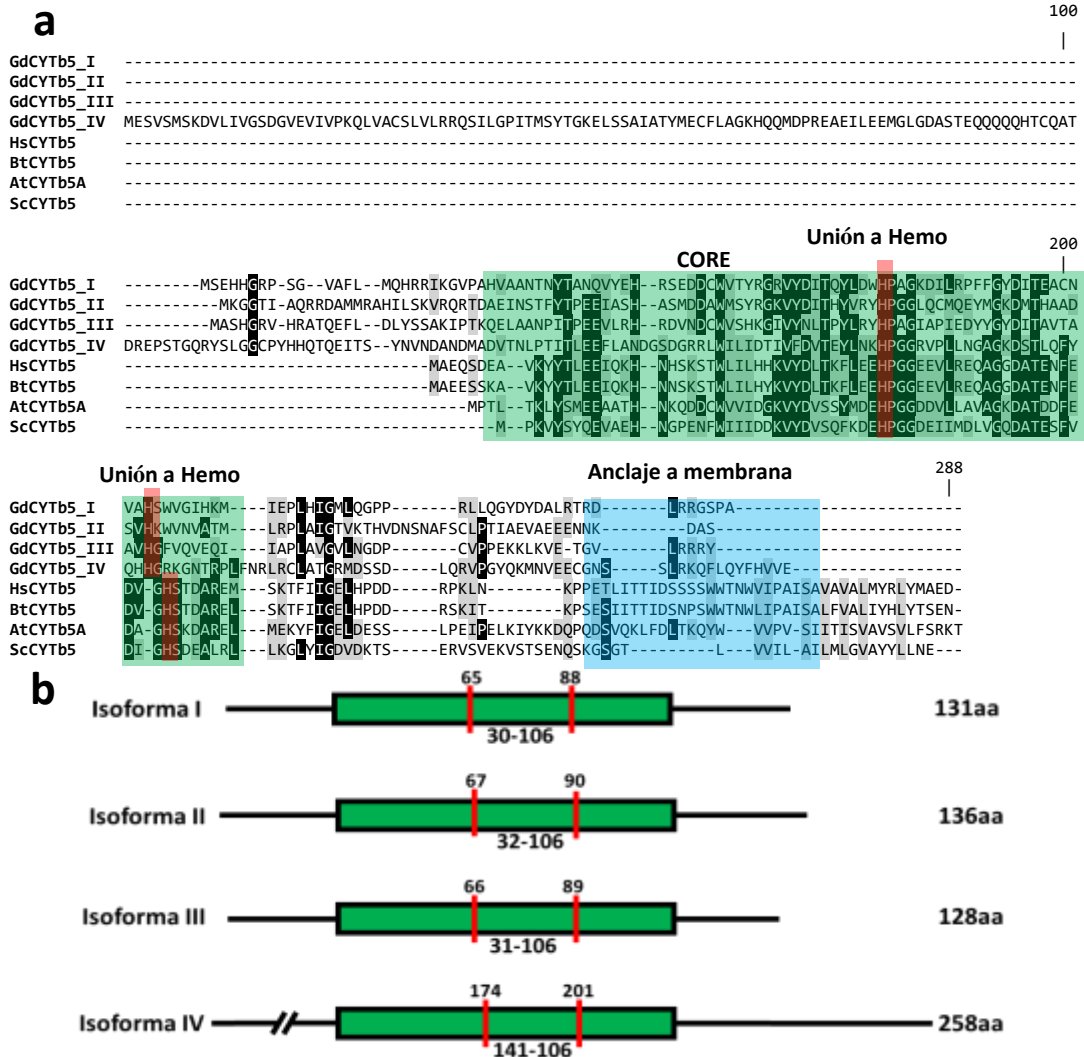


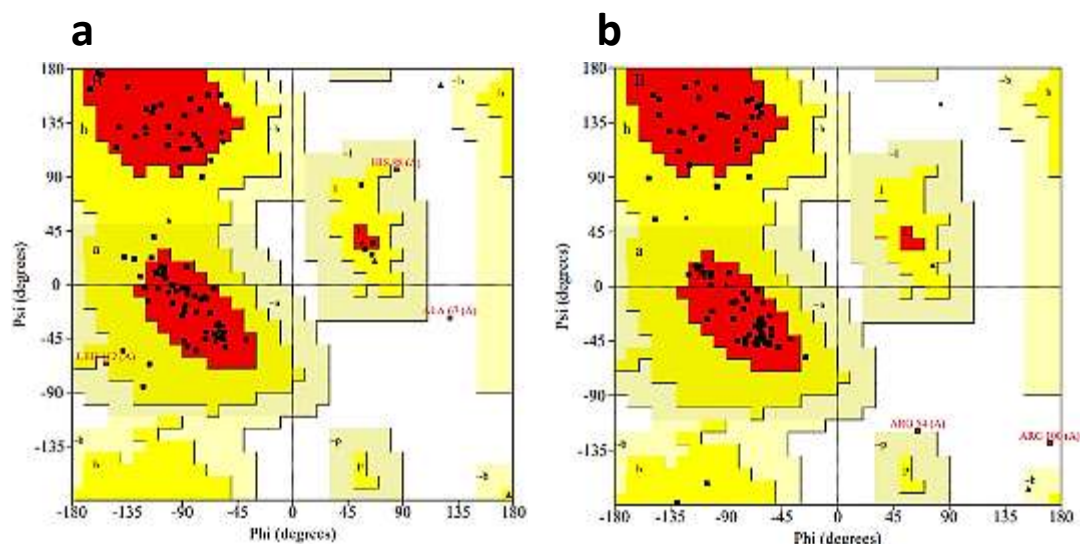
Figura 10. Alineamiento múltiple de secuencias de CYTb5. **a|** MSA de las cuatro isoformas de GdCYTb5 (GdCYTb5_I - IV), *H. sapiens* (HsCYTb5), *B. taurus* (BtCYTb5), *A. thaliana* (AtCYTb5A) y *S. cerevisiae* (ScCYTb5). Se representa secuencia CORE de CYTb5s, dominio de anclaje a membrana y residuos de Histidina de unión a Hemo. **b|** Representación de la secuencia CORE (verde) e Histidinas de unión a Hemo de las cuatro isoformas de GdCYTb5. La numeración de aminoácidos está basada en la secuencia de CYTb5 de *H. sapiens* (UniProt P00167), *B. taurus* (UniProt P07514) y *A. thaliana* (UniProt Q9FDW8).

La calidad estereoquímica de los modelos fue analizada con el software PROCHECK, y los valores del gráfico Ramachandran se muestran en la siguiente tabla. El empleo del programa Verify3D determinó 73.28%, 68.38%, 48.06% y 71.32% de los residuos pasaron la relación 3D/1D \geq 0.2, para las cuatro isoformas respectivamente.

Tabla 7. Calidad estereoquímica de los modelos estructurales para las cuatro isoformas de GdCYTb5 empleando el gráfico de Ramachandran.

Isoformas	Valores de Ramachandran (%)			
	Regiones más favorecidas	Regiones permitidas adicionales	Regiones generosamente permitidas	Regiones no permitidas
CYTb5_I	79.6	16.7	2.4	1.2
CYTb5_II	87.5	10.0	0.0	2.5
CYTb5_III	64.4	21.9	6.8	6.8
CYTb5_IV	76.9	19.2	1.3	2.6

Asimismo, se compararon estructuralmente los modelos de las isoformas de GdCYTb5 con el modelo cristalizado *B. taurus* (PDB ID: 1nx7). Los datos mostraron que CYTb5_I tiene mayor similitud con el homólogo de BtCYTb5 (TM-score= 0.86123), seguido de CYTb5_IV (TM-score= 0.81765), CYTb5_II (TM-score= 0.77233) y por último CYTb5_III (TM-score= 0.72443).



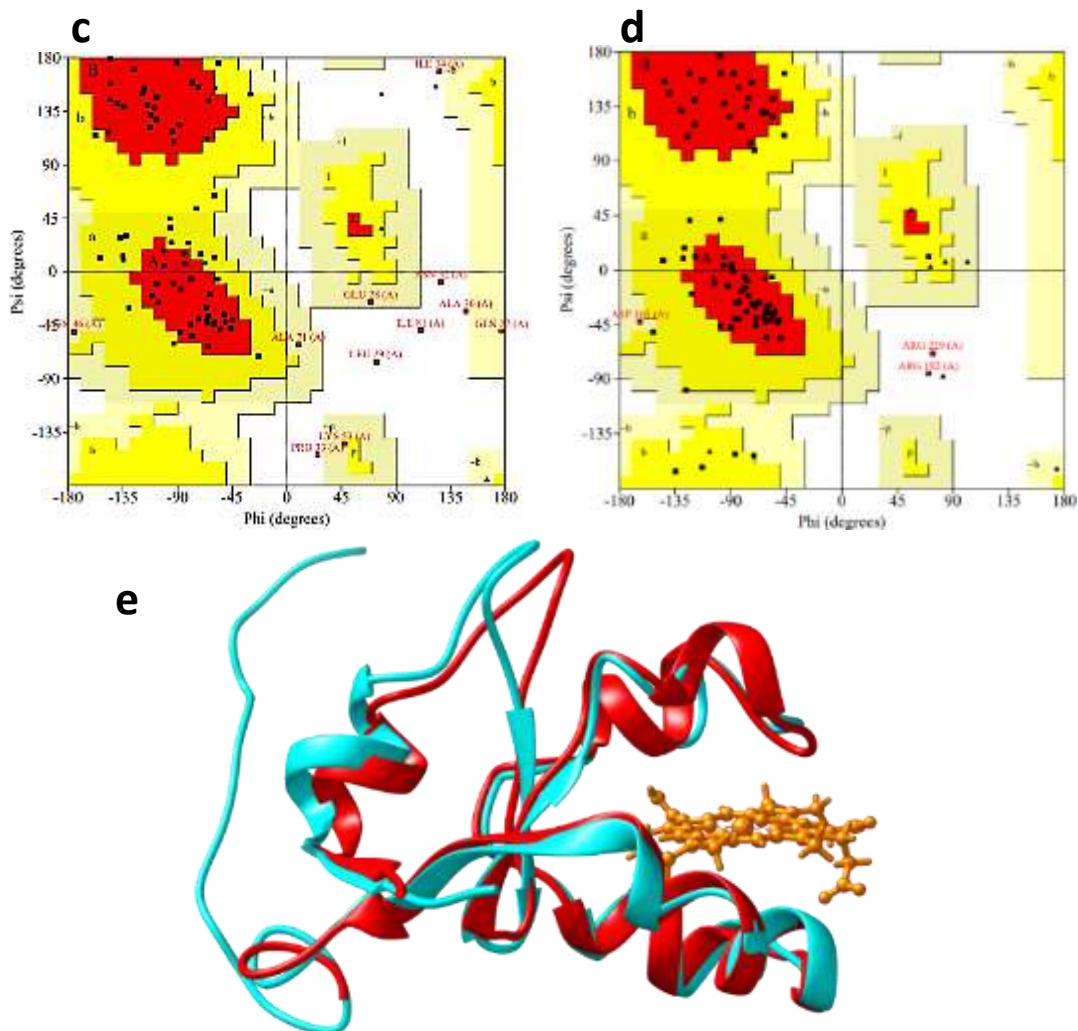


Figura 11. Calidad estereoquímica y homología estructural de las isoformas de GdCYTb5. **a]** Gráfico de Ramachandran de isoforma I. **b]** Gráfico de Ramachandran de isoforma II. **c]** Gráfico de Ramachandran de isoforma III. **d]** Gráfico de Ramachandran de isoforma IV. **e]** Sobreposición de GdCYTb5_I (cian) y BtCYTb5 (rojo), RMSD entre 82 átomos de 1.47Å.

Una vez que se obtuvieron los modelos estructurales de GdFIHb, GdCYPOR y las isoformas de GdCYTb5, se realizaron análisis *in silico* de las interacciones moleculares (docking) proteína-ligando. En estos estudios se utilizó la base de datos de ZINC para descargar los archivos estructurales de los compuestos (inhibidores y sustratos) y con los servidores SWISS-DOCK y AutoDock Vina se hicieron los docking.

Primeramente, se realizaron docking molecular con la GdFIHb con diferentes miembros de los becimidazoles, para evaluar la afinidad y estabilidad de éstos en el sitio catalítico de la GdFIHb.

Tabla 8. Interacción molecular de miembros de bencimidazoles contra la GdFIHb.

Fármaco	Estructura	ZINC	SWISS-DOCK (kcal/mol)	AutoDock Vina (kcal/mol)
ALB		17146904	-7.83	-7.1
ABZSO		98208944	-8.09	-7.4
ABZSOO		05424275	-7.86	-7.0
Mebendazol (MBZ)		00121541	-7.76	-8.8
Fenbendazol (FBZ)		00402911	-8.13	-8.9
Tiabendazol (TBZ)		00073711	-6.92	-6.2
Metronidazol* (MTZ)		00113442	-6.42	-4.8
Benzimidazol (BZL)		00331902	-5.89	-5.3

*Miembro perteneciente a los nitroimidazoles.

Se utilizó el bencimidazol como compuesto control para los docking moleculares, porque es la estructura básica que conforman a los

bencimidazoles. Este control permitió a determinar que las interacciones de los fármacos no son aleatorias y por lo tanto son más estables que el control. Los programas SWISS-DOCK y AutoDock reportaron valores de ΔG muy parecidos relativamente en las interacciones con los fármacos. Para ABZ y sus metabolitos se encontró que hay una mayor afinidad por ABZSO que por ABZ y ABSOO. También los bencimidazoles, MBZ y FBZ presentaron los valores más altos de afinidad ($\Delta G = -8.8$ y -8.9 kcal/mol, respectivamente) a excepción de TBZ que presentó afinidad muy baja por el sitio activo ($\Delta G = -6.2$ kcal/mol). El MTZ, un fármaco de la familia de los nitroimidazoles necesita ser reducido para ser activo, presentó valores de afinidad muy baja, lo cual indicaría que no tiene afinidad por el bolsillo de GdFIHb.

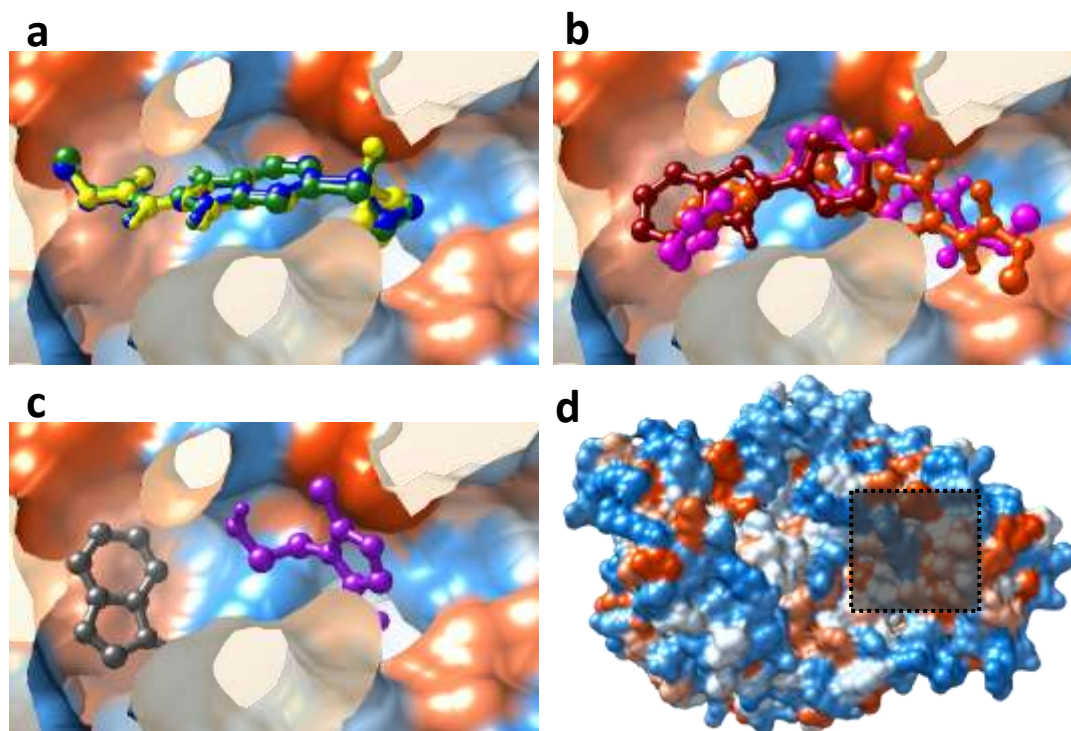


Figura 12. Docking molecular con posibles sustratos en el sitio activo de la GdFIHb. **a]** Posición de docking de la GdFIHb con ABZ (azul), ABZSO (verde) y ABZSOO (amarillo). **b]** Posición de docking con los fármacos MBZ (anaranjado), FBZ (magenta) y TBZ (rojo). **c]** Posición de docking con MTZ (morado) y BZL (gris). **d]** Superficie molecular de GdFIHb coloreada acorde a la hidrofobicidad relativa, el recuadro gris corresponde al sitio activo de GdFIHb.

Estas interacciones de proteína-sustrato, podría indicar que los becimidazoles (a excepción de TBZ) pueden ser un sustrato de la GdFIHb a parte de su sustrato ideal que es el óxido nítrico.

Así mismo, se hicieron docking moleculares con inhibidores de las tres proteínas que podrían participar en el sistema de biotransformación del ABZ. Estos modelos se realizaron para determinar si en este sistema participan las tres proteínas.

Tabla 9. Interacción molecular de posibles inhibidores de GdFIHb, GdCYPOR y GdCYTb5.

Inhibidores	Blancos*	ZINC	Proteínas	SWISS-DOCK (kcal/mol)	AutoDock Vina (kcal/mol)
Proadifen	CYP450s	01671505	GdGIHb	-7.82	-7.8
Isoniacida	CYP1A2, CYP2A6, CYP2C19 y CYP3A4	00001590	GdFIHb	-6.1	-5.4
Ácido Tánico	CYPORs	32790299	GdFIHb	-8.47	-8.5
			CYTb5_I	-7.28	-7.6
			CYTb5_II	-6.67	-5.5
Morina	CYTb5	03881558	CYTb5_III	-6.95	-8.2
			CYTb5_IV	-7.1	-6.2

*Blancos experimentales que se han descrito que los inhibidores actúan

En estos análisis se evaluó el proadifen, un inhibidor de amplio espectro de citocromos P450, ya que en el trabajo de García-Solís (2016) se utilizó este inhibidor y se encontró que confiere protección contra el ABZ en los trofozoítos sensibles comparado con los que no tienen proadifen. Los resultados del docking muestran que el proadifen tiene una alta afinidad ($\Delta G = -7.8$ kcal/mol) por el sitio activo de la GdFIHb que es prácticamente igual a la del ABZ ($\Delta G = -7.81$ kcal/mol). Esta similitud entre los docking de

ABZ y proadifen podría estar indicando que compiten por el sitio activo de la GdFIHb, y de esta manera sugiere que estaría inhibiendo a la GdFIHb y que esta proteína podría ser la responsable de metabolizar el ABZ. La isoniacida también es un inhibidor de CYP450s, pero es exclusivo para un grupo reducido de estos, los resultados del docking indican que este inhibidor tiene una menor afinidad ($\Delta G = -5.4$ kcal/mol) por el bolsillo activo de GdFIHb.

Por su parte, el ácido tánico puede ser un buen inhibidor de CYPOR de *G. duodenalis*, ya que presenta valores de docking altos y muy parecidos a los docking con CYPOR de *H. sapiens* ($\Delta G = -9.26$ kcal/mol) que la inhibe en un 50-80%.

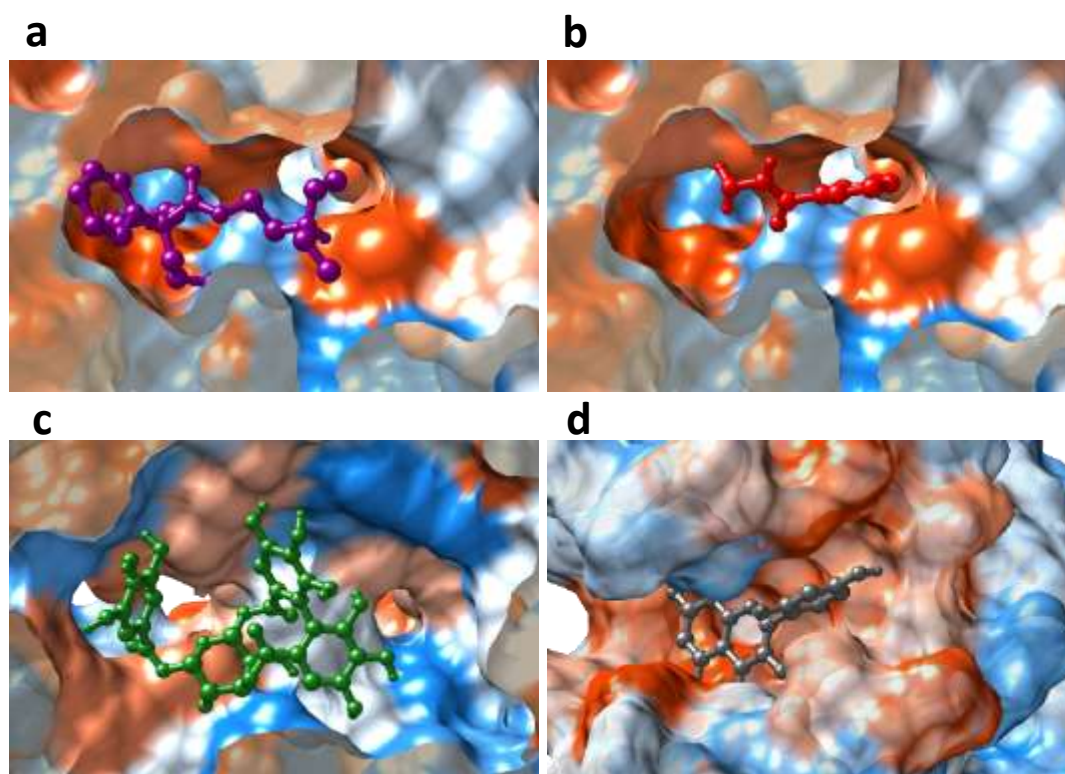
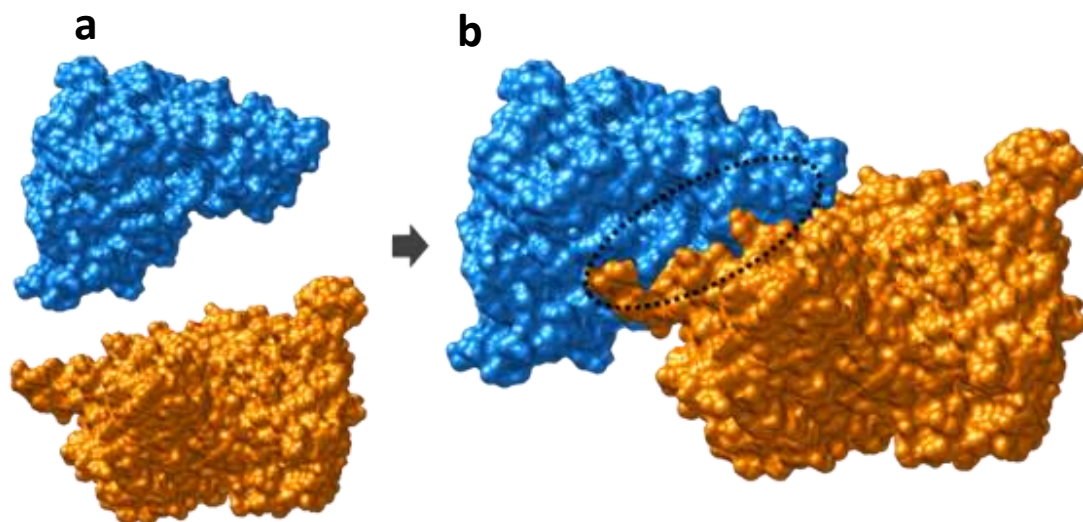


Figura 13. Docking molecular de posibles inhibidores de GdFIHb, GdCYPOR y GsCYTb5. **a|** Posición de docking de GdFIHb con el proadifen (magenta). **b|** Posición de docking de GdFIHb con isoniacida (rojo). **c|** Posición de docking de CYPOR de *G. duodenalis* con el ácido tánico (verde). **d|** Posición de docking de CYTb5_I de *G. duodenalis* con la morina (gris). Los sitios activos para cada proteína se determinaron por homología estructural con modelos canónicos (FIHb: *E. coli*; CYPOR: *H. sapiens*; CYTb5: *B. taurus*).

Los resultados de los docking de Morina un inhibidor de CYTb5, indicaron una afinidad diferencial, de mayor a menor, por las isoformas CYTb5_I, CYTb5_III, CYTb5_IV y CYTb5_II respectivamente. Por lo anterior, podrían servir como buenos inhibidores para las isoformas de CYTb5 de *G. duodenalis*, ya que sus valores de docking son similares a la de *B. taurus* ($\Delta G = -7.95$ kcal/mol) que se sabe que a inhibe eficientemente.

Para saber si estas proteínas son capaces de interactuar entre sí, se realizaron docking moleculares proteína-proteína utilizando el software ClusPro. Este software realiza análisis de afinidad y estabilidad de dos polipéptidos, y calcula los coeficientes de energía de acuerdo con atributos de los péptidos a analizar y reporta varios tipos de modelos: balanceado, favorecido electrostáticamente, favorecido hidrofóbicamente y de interacciones electrostáticas + fuerzas de Van der Waals. Por cada coeficiente arroja alrededor de 30 modelos de interacción, los modelos se escogieron de acuerdo con la cercanía entre los sitios activos de cada proteína y del coeficiente balanceado.



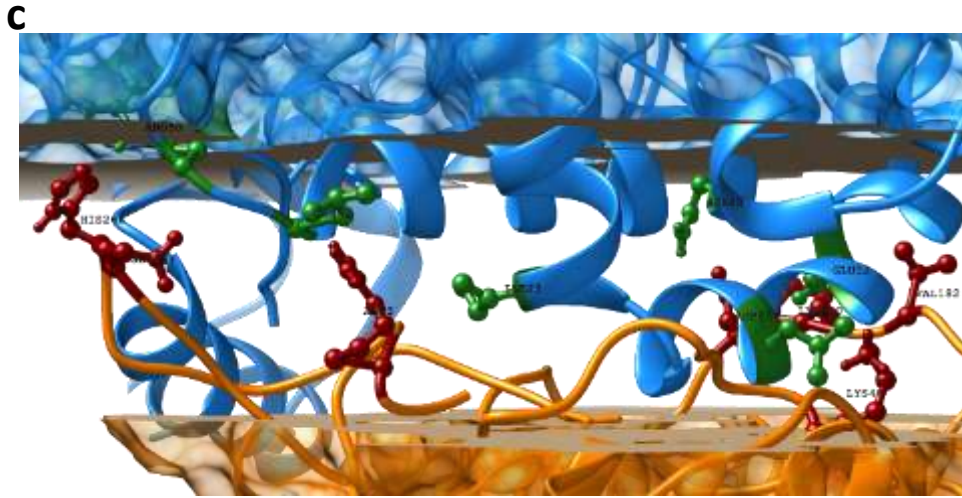


Figura 14. Docking molecular proteína-proteína de GdFIHb-GdCYPOR. **a|** Superficies moleculares de GdFIHb (azul) y GYPOR (anaranjado) de. **b|** Interacción GdFIHb-CYPOR predicha por ClusPro, círculo negro es la región de interacción con los sitios activos más cercanos. **c|** Región de interacción, los residuos de color verde son de GdFIHb y los residuos de colores rojo de CYPOR.

En estos modelos, el clúster 0 del coeficiente balanceado es el más favorecido por la cercanía entre los sitios activos de ambas proteínas, presenta 50 miembros y un score es de -1004.7 kcal/mol. El número de miembros es relativamente pequeño y de acuerdo con los criterios de análisis de este programa, los modelos de interacción deben ser juzgados por el número de miembros de cada clúster y no por el score. Así, estos resultados muestran que la interacción GdFIHb-CYPOR es poco favorable y no sería suficiente para que la CYPOR interactúe con GdFIHb y donar los electrones.

Los residuos que están involucrados en esta interacción son para GdFIHb: GLU12, LEU17, ILE23, ARG50, LEU52 y ASN68 todos estos residuos son parte del dominio globina, y para CYPOR: ARG3 y LYS44 parte del dominio FMN, ASP179, LYS180, VAL182, GLU267 y HIS268 que forman parte del dominio FAD.

En el análisis de interacción de las cuatro isoformas de CYTb5, se observaron valores más favorables que los anteriores, la siguiente tabla se muestran los datos del coeficiente balanceado de las cuatro isoformas.

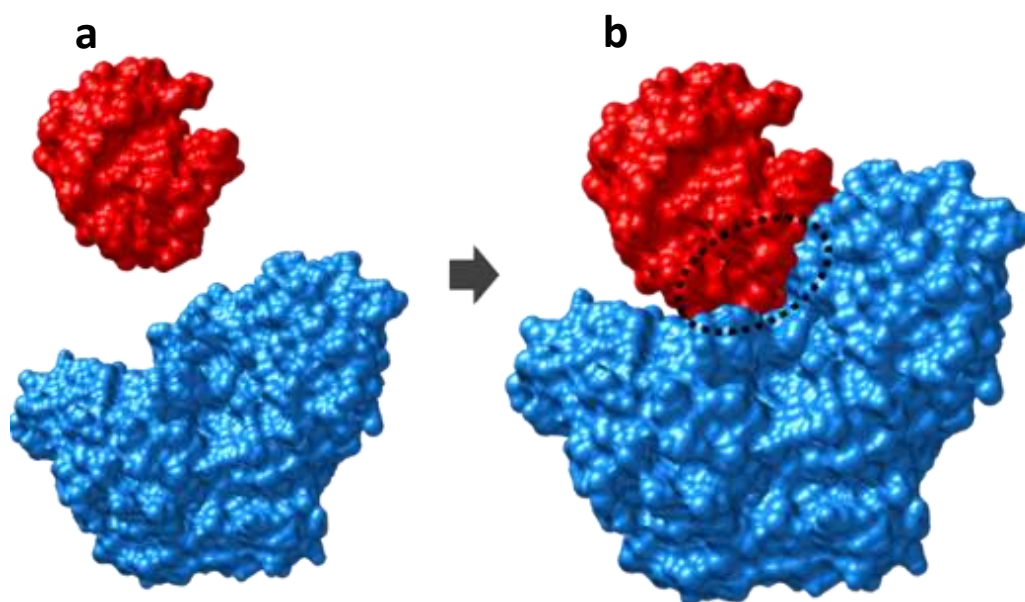
Tabla 10. Valores de interacción molecular proteína-proteína con el software ClusPro.

Isoformas de CYTb5	Cluster	Miembros	Score (kcal/mol)
CYTb5_I	1	117	-1247.15
CYTb5_II	0	218	-1078.15
CYTb5_III	0	102	-907.40
CYTb5_IV*	-	-	-

*No presenta algún clúster de interacción.

De las cuatro isoformas, la CYTb5_II presentó un mayor número de miembros en el clúster que las otras isoformas. De esta forma, podría interactuar con la GdFIHb para transferir los electrones.

Los residuos que están involucrados en esta interacción son para GdFIHb: ILE23, GLN49, ARG50, THR51 y LEU52 del dominio globina, ASP248 y GLU249 del dominio FAD, y para CYTb5_II: PRO67 y THR65 de la región cercana a la primera HIS que coordina hemo, PHE91 y ILE97 cercana a la segunda HIS.



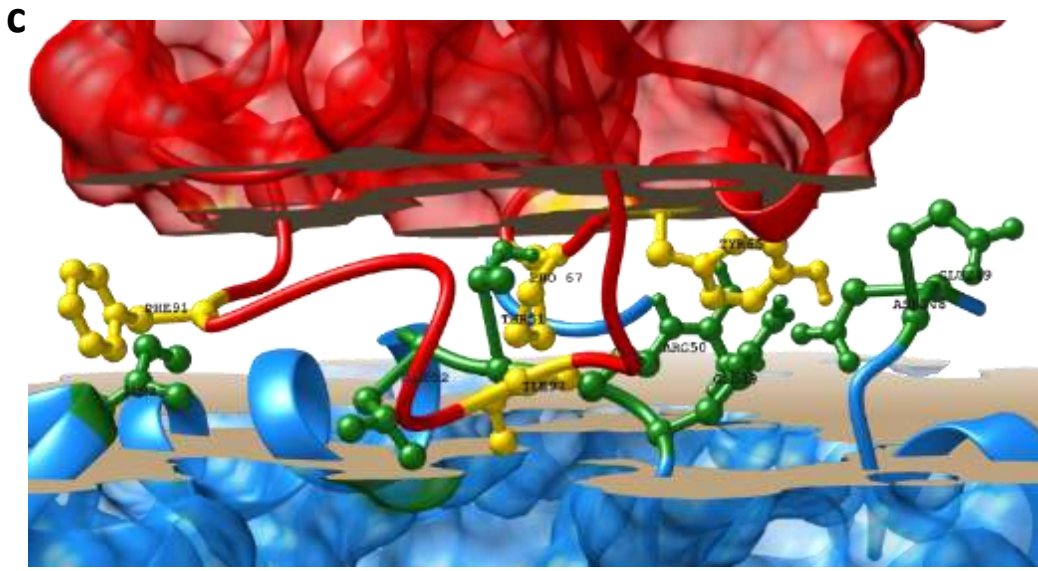


Figura 15. Docking molecular proteína-proteína de GdFIHb-GdCYTb5_II. **a|** Superficies moleculares de GdFIHb (azul) y CYTb5_II (rojo). **b|** Interacción GdFIHb-CYTb5_II predicha por ClusPro, el círculo negro es la región de interacción con los sitios activos más cercanos. **c|** Región de interacción, los residuos de color verde son de GdFIHb y los residuos de colores rojo de CYTb5_II.

En conjunto, estos estudios bioinformáticos permitieron evaluar la posibilidad de la existencia de un sistema de GdFIHb-CYTb5 involucrado en la metabolización de ABZ.

8.2. Actividad de la Flavohemoglobina de *G. duodenalis*

La proteína recombinante de la GdFIHb (rGdFIHb) y el plásmido pET14b-H6-gFLHb fueron donados por el Dr. Steven Rafferty de la Universidad de Trent en Canadá. Esta construcción presenta el gen completo de la GdFIHb con los sitios de restricción para NdeI y BlnI (1381 pb), el promotor 7T, un case de resistencia a ampicilina (AmpR) y un tag de histidinas (6xHIS).

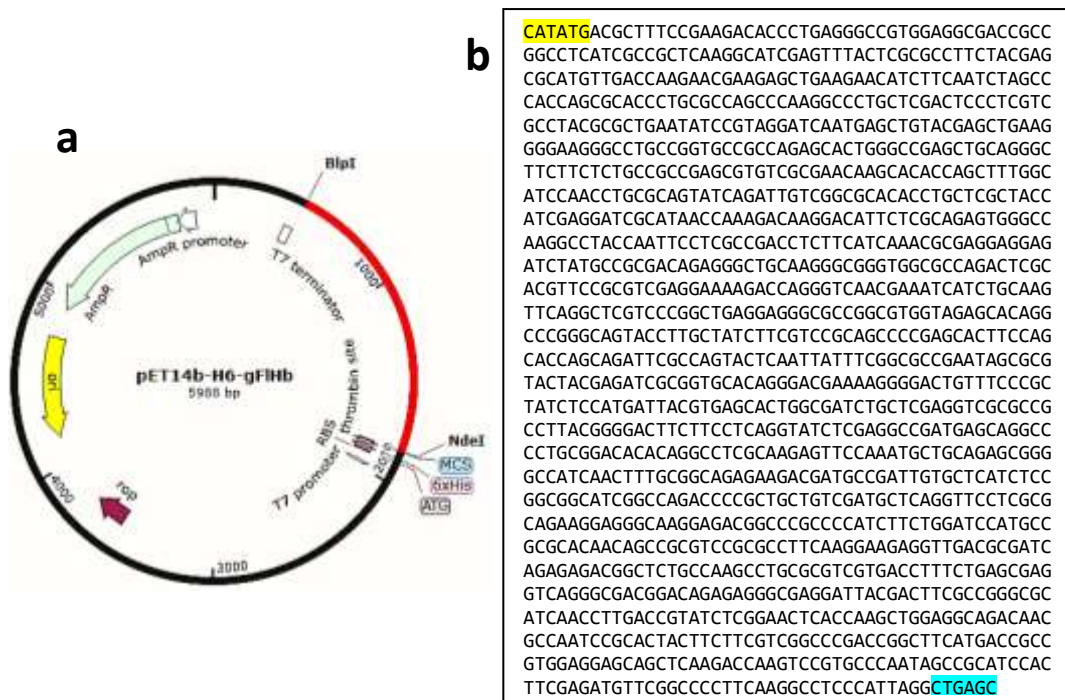


Figura 16. Características del vector pET14b-H6-gFIHb. **a)** Diagrama de pET14b-H6-gFIHb: gen GdFIHb: rojo, AmpR, 6xHIS, promotor 7T. **b)** Secuencia del gen completo de GdFIHb, color amarillo: sitio de restricción NdeI, color azul: sitio de restricción BlnI.

La proteína recombinante se indujo exitosamente con IPTG y se purificó mediante columnas de agarosa NI-NTA con 24-48 hrs de inducción, se y se midió su calidad por geles SDS-PAGE al 10%.

Una vez obtenida la proteína recombinante, se realizaron ensayos de la actividad de NADH oxidasa al medir el consumo de NADH por la rGdFIHb y calcular su actividad específica. Como primer ensayo se midió la actividad específica en presencia de NADH o NADPH, para determinar si rGdFIHb tiene alguna preferencia por algunos de los dos cofactores.

Tabla 11. Actividad específica de rGdFIHb en presencia de NADH o NADPH.

Concentración de proteína (µg/mL)	Cofactor (100µM)	Pendiente	Actividad específica (nmol/min·mg prot)
19.54	NADH	6.80E-03	5.59E-01
29.34	NADH	1.34E-02	7.33E-01
39.00	NADH	1.84E-02	7.60E-01
46.80	NADH	2.26E-02	7.78E-01
19.54*	NADPH	-	-
29.34	NADPH	7.44E-03	4.08E-01
39.00	NADPH	9.13E-03	3.76E-01
46.80	NADPH	9.26E-03	3.18E-01

*No se observó actividad a esta concentración

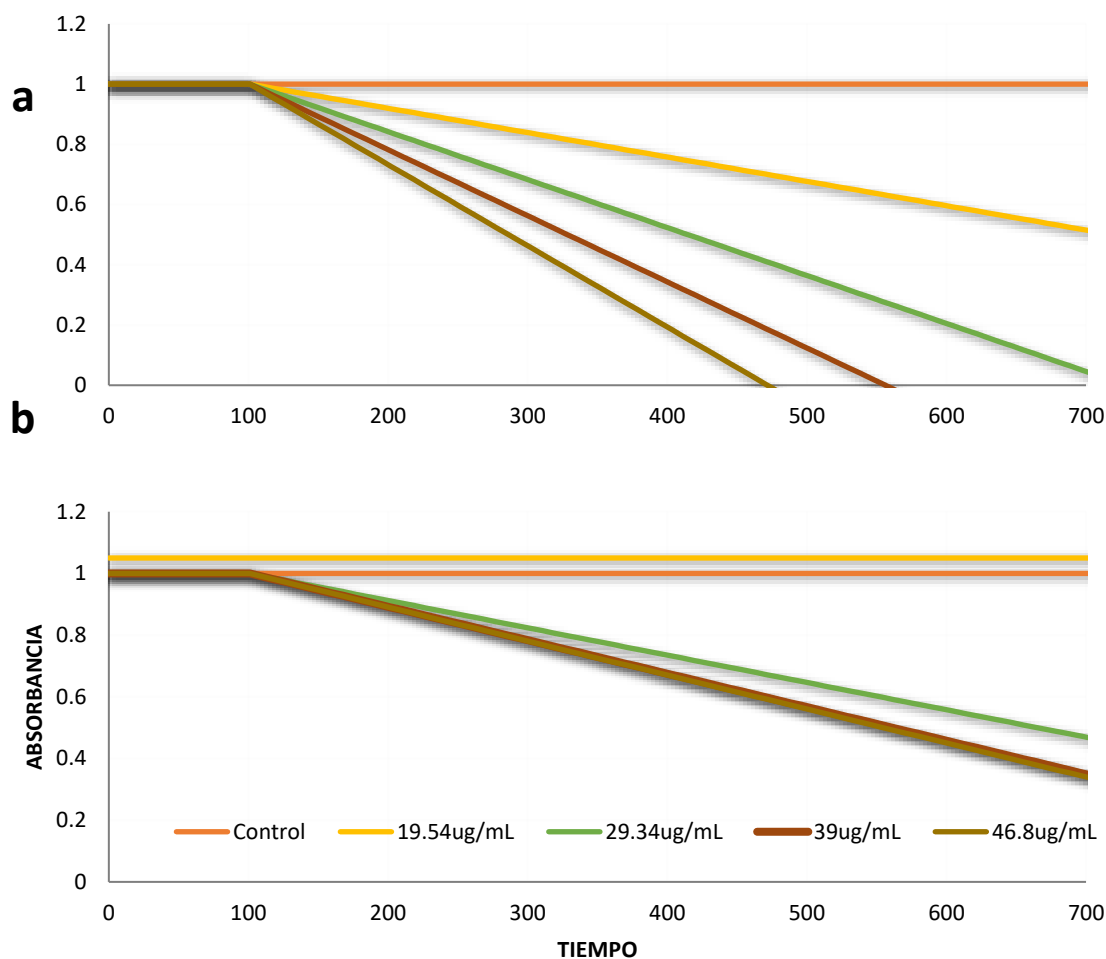


Figura 17. Curva de consumo de NADH y NADPH por rGdFIHb. **a|** Curva de consumo de NADH con concentraciones diferentes de proteínas. **b|** Curva de consumo de NADPH con concentraciones diferentes de proteínas.

Los resultados de actividad específica en presencia de NADH o NADPH, mostraron que la rGdFIHb tuvo más actividad en presencia de NADH ($7.08E-01 \pm 0.089$ nmol/min mg prot) que por NADPH ($3.67E-01 \pm 1.01$ nmol/min mg prot). De esta manera se seleccionó el cofactor NADH para experimentos futuros de actividad de oxidación rGdFIHb.

En los ensayos subsecuentes se analizaron el efecto ABZ en la actividad NADH oxidasa de la rGdFIHb, en estos se utilizaron varias concentraciones de ABZ (0.5 nM - 16 μ M) y se midió su actividad específica a concentraciones constantes de proteína (16 μ g/mL). También se midió como control positivo la actividad específica en presencia del NONOato (donador de óxido nítrico) que es el sustrato estándar de la GdFIHb, se agregaron 2.3 μ g a la reacción en condiciones basales en ausencia de ABZ.

Tabla 12. Actividad específica de rGdFIHb en presencia de concentraciones crecientes de ABZ.

Concentración de ABZ (nM)	Pendiente	Actividad específica (nmol/min·mg prot)	Porcentaje de actividad*
Control	5.32E-02	2.32E-01	100%
0.5	5.50E-02	2.50E-01	108%
1.0	5.55E-02	2.55E-01	110%
2.0	5.56E-02	2.56E-01	110%
4.0	5.48E-02	2.48E-01	107%
6.0	5.85E-02	2.85E-01	123%
8.0	5.79E-02	2.79E-01	120%
15.0	7.72E-02	4.72E-01	203%
25.0	9.92E-02	6.92E-01	298%
50.0	5.54E-02	2.54E-01	109%
100.0	5.71E-02	2.71E-01	117%
200.0	5.57E-02	2.57E-01	111%
500.0	5.67E-02	2.67E-01	115%
1000.0	5.63E-02	2.63E-01	113%
2000.0	5.59E-02	2.59E-01	112%
4000.0	5.58E-02	2.58E-01	111%
8000.0	5.59E-02	2.59E-01	112%
16000.0	5.53E-02	2.53E-01	109%

*El porcentaje de actividad se calcula en relación con el control

En los ensayos del efecto de ABZ sobre la actividad NADH oxidasa de rGdFIHb, se observó un aumento ligero de la actividad específica desde concentraciones 0.5 nM de ABZ con respecto al control si ABZ (110 - 120%), esta actividad se mantiene constante hasta llegar a la concentración de 15nM en la cual la actividad específica aumentó 200% comparada con el control (4.72E-01 nmol/min·mg) y a 25 nM de ABZ se observa el pico más alto con un aumento del 300% (6.92E-01 nmol/min·mg). Después de los 50nM, la actividad específica fue parecida a la actividad (110-120%)

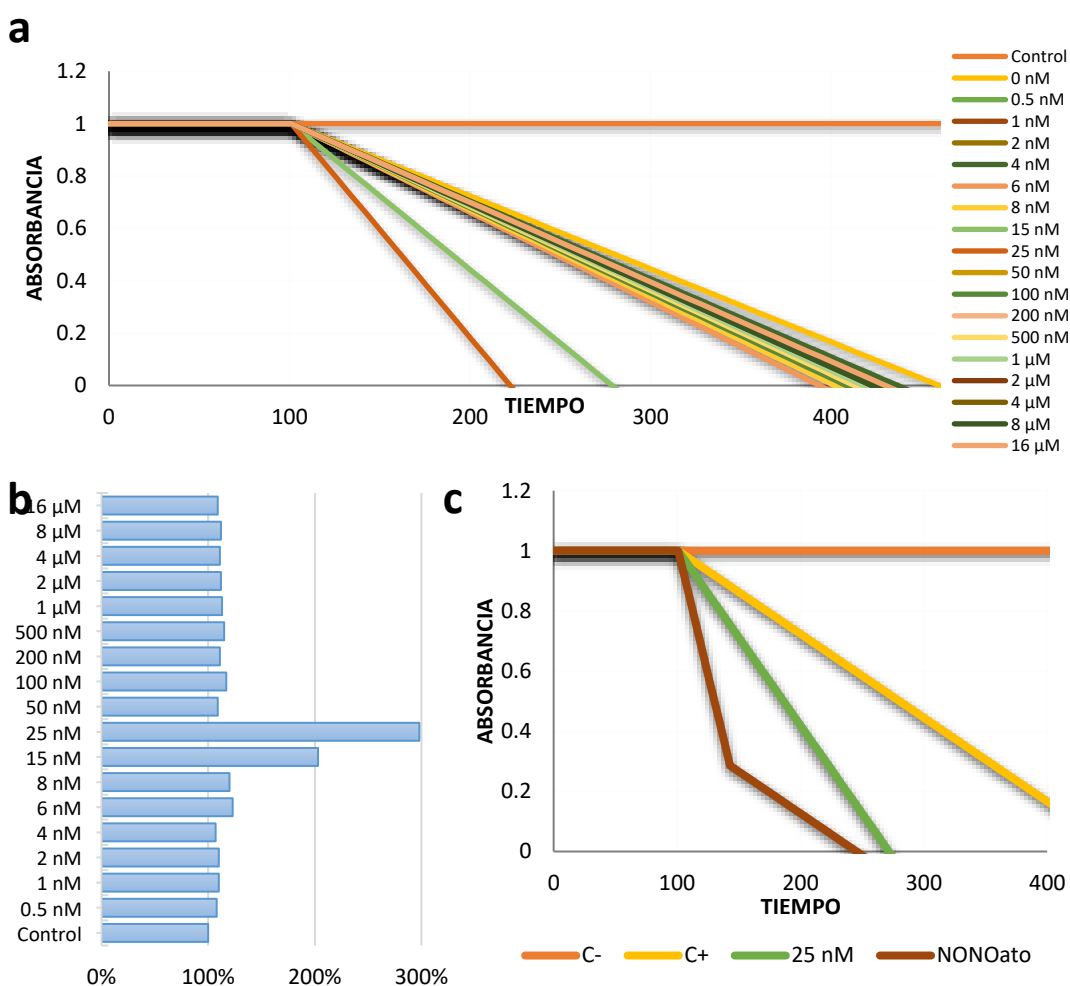


Figura 18. Curva de consumo de NADH por rGdFIHb en presencia de ABZ y NONOato. **a)** Curva de consumo de NADH con concentraciones diferentes de ABZ. **b)** Porcentaje de la actividad específica en el consumo de NADH con concentraciones diferentes de ABZ. **c)** Curva de consumo de NADH en presencia de NONOato y 25nM de ABZ.

La actividad específica de rGdFIHb en presencia de NONOato, y esta fue un orden de magnitud mayor comparada con el control ($2.43E-01$ nmol/min·mg) y tres veces más comparada con la actividad en presencia 25nM de ABZ. La actividad exacerbada de rGdFIHb retornó inmediatamente a la actividad basal, posiblemente por el consumo total de óxido nítrico procedente del NONOato. Posteriormente se realizaron los ensayos de actividad NADH oxidasa utilizando ABZ y otros fármacos en un rango más estrecho de concentraciones (n=3). En la siguiente tabla se muestran las características del ensayo.

Tabla 13. Actividad específica de rGdFIHb en presencia de ABZ y otros fármacos.

Fármaco	Concentración (nM)	Pendiente	Actividad específica ⁺	Porcentaje de actividad
ABZ	Control	2.82E-02	$2.45E-01 \pm 0.02$	100.00
	15	6.63E-02	$5.77E-01 \pm 0.19$	235.77
	20	8.02E-02	$6.97E-01 \pm 0.22^*$	283.07
	25	8.70E-02	$7.56E-01 \pm 0.09^{**}$	308.43
	30	6.37E-02	$5.54E-01 \pm 0.29$	225.37
	40	5.18E-02	$4.50E-01 \pm 0.26$	182.23
ABZSO	Control	2.67E-02	$2.32E-01 \pm 0.01$	100.00
	15	8.11E-02	$7.05E-01 \pm 0.10^{**}$	304.17
	20	7.80E-02	$6.78E-01 \pm 0.18^*$	291.03
	25	7.52E-02	$6.53E-01 \pm 0.16^*$	280.80
	30	7.21E-02	$6.26E-01 \pm 0.17^*$	268.87
	40	4.47E-02	$3.88E-01 \pm 0.15$	165.90
MBZ	Control	2.77E-02	$2.40E-01 \pm 0.01$	100.00
	15	8.18E-02	$7.11E-01 \pm 0.15^*$	297.33
	20	8.12E-02	$7.06E-01 \pm 0.10^{**}$	294.80
	25	7.46E-02	$6.49E-01 \pm 0.20^*$	272.40
	30	5.82E-02	$5.05E-01 \pm 0.15$	212.20
	40	5.67E-02	$4.92E-01 \pm 0.20$	206.97
MTZ	Control	2.77E-02	$2.40E-01 \pm 0.01$	100.00
	15	8.69E-02	$7.55E-01 \pm 0.13^*$	316.20
	20	9.09E-02	$7.90E-01 \pm 0.06^{**}$	329.90
	25	8.71E-02	$7.57E-01 \pm 0.03^{**}$	315.50
	30	8.04E-02	$6.99E-01 \pm 0.03^{***}$	291.30
	40	7.45E-02	$6.47E-01 \pm 0.12^*$	270.57

⁺Los valores se expresan en media \pm desviación estándar

Significancia estadística de prueba T-student: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p > 0.001$.

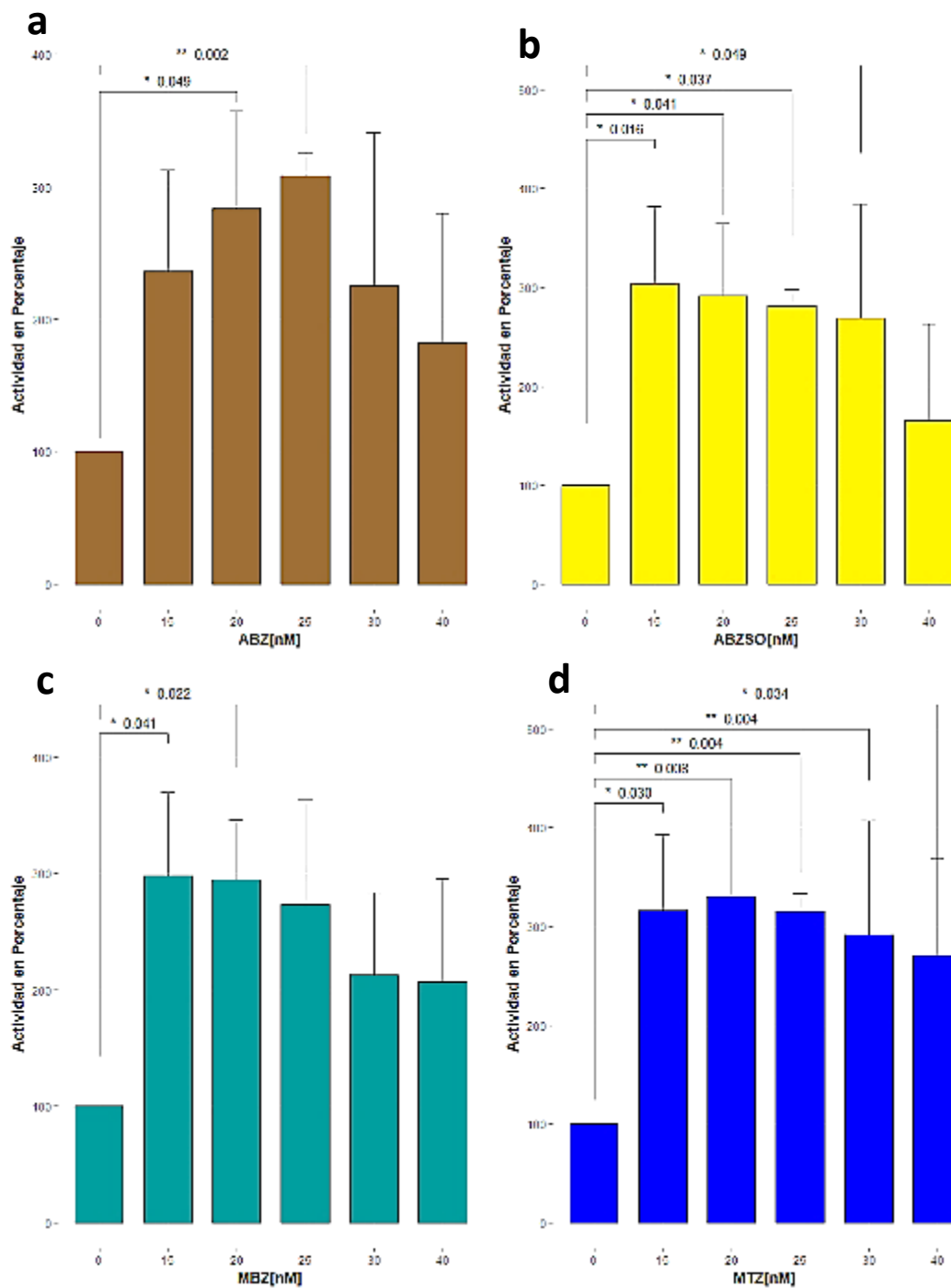


Figura 19. Actividad específica en porcentaje de rGdFIHb en presencia de diferentes fármacos. **a)** Actividad de rGdFIHb en presencia concentraciones de 15-40 nM de ABZ. **b)** Actividad en presencia de concentraciones de 15-40 nM ABZSO. **c)** Actividad en presencia de concentraciones de 15-40 nM MBZ. **d)** Actividad en presencia de concentraciones de 15-40 nM MTZ. Significancia estadística expresada con $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** y $p < 0.001$ ***.

Los resultados mostraron para los ensayos con ABZ que la actividad específica aumentó significativamente a los 20 y 25 nM de ABZ, y aunque no fue significativo, se observó una tendencia a baja actividad en presencia de 30 y 40 nM de ABZ. Es posiblemente que en concentraciones elevadas, el ABZ inhiba la actividad NADH oxidasa de rGdFIHb. El análisis con ABZSO se hizo debido a que en los ensayos de docking este metabolito mostró más afinidad por el sitio activo de GdFIHb que el ABZ. Así los resultados revelaron que la actividad aumenta significativamente a partir de los 15 nM de ABZSO con un pico máximo a 20 nM de ABZSO. De esta manera se sugiere que el ABZSO tiene mayor afinidad por el sitio activo de la GdFIHb.

Los ensayos de actividad con el MBZ se realizaron para poder determinar si rGdFIHb presenta afinidad por otros miembros del grupo de los bencimidazoles. Los resultados mostraron que la actividad específica aumentó significativamente en presencia de 15 y 20 nM de MBZ, y se observó una tendencia a baja actividad después de los 25 nM. Estos resultados apoyan la hipótesis de que rGdFIHb puede ser capaz de metabolizar varios fármacos de la familia de los bencimidazoles.

Por último, los ensayos de actividad en presencia de MTZ fueron como control, ya que este fármaco no se oxigena como el ABZ, si no que se reduce para ser activo. Los resultados demostraron que la actividad aumentó significativamente en todos los ensayos con MTZ. No obstante, esto no indica que rGdFIHb metabolice el MTZ porque el análisis de docking reveló una baja afinidad por el sitio activo. Una posible explicación es que el MTZ esté interactuado con los cofactores (NADH y FAD) y de alguna manera secuestra los electrones de estos cofactores, por lo tanto, aumenta el flujo de electrones y de esta manera se observa un aumento de la actividad específica .

8.3. Determinación de los metabolitos de ABZ por HPLC-MS/MS

Una vez que se demostró que la rGdFIHb aumentó su actividad específica en presencia de ABZ, se procedió a determinar si esta era capaz de metabolizar el ABZ a los metabolitos ABZSO y ABZSOO. Para ello se colectaron las muestras de los ensayos de actividad en presencia de ABZ (n=3), se extrajo la fase orgánica de las muestras y se inyectó a un sistema de Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS/MS). Se utilizó una curva de calibración con concentraciones crecientes de ABZSO (15-500 ng/mL) y ABZSOO (7.5-200 ng/mL) y como control interno carbamazepina (200 ng/mL). La separación cromatográfica se llevó a cabo en la columna analítica Gemini C18 y el espectro de masas se obtuvo en el espectrómetro de masas triple cuadrupolo ABZciex 3200 QTrap. La cuantificación de los metabolitos por medio del monitoreo de las siguientes transiciones: m/z 282→240 para ABZO, and m/z 237.2→194.1 para CBZ.

El método de cuantificación de metabolitos se validó por evaluación de la linealidad de ambos metabolitos de ABZ. Este método fue selectivo y no hubo interferencias en la detección de ABZSO, ABZSOO y CBZ. La regresión lineal de la curva de calibración de ABZSO en el rango de 15-500ng/mL ($y = 0.0229x + 0.2722$) dio un coeficiente de determinación cercano a 1 ($R^2 = 0.973$) al igual que para ABZSOO ($y = 0.0151x + 0.9912$, $R^2 = 0.991$), de esta manera el cálculo de las concentraciones fue representativo de los niveles de intensidad detectados por el espectrómetro de masas.

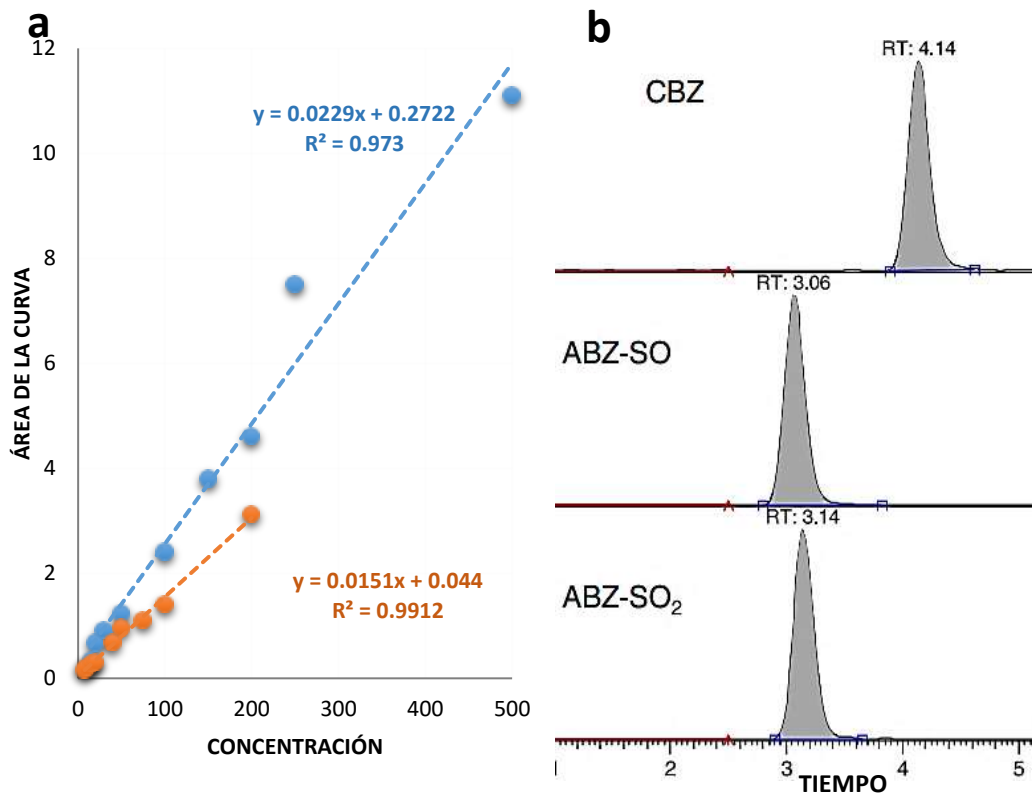


Figura 20. Curva de calibración y cromatogramas del análisis de metabolitos. **a)** Curva de calibración de ABZSO y ABZSOO. **b)** Cromatograma de separación de los metabolitos ABZSO, ABZSOO y CBZ. RT: tiempo de retención en segundos.

Como resultado, los cromatogramas muestran las señales que corresponden a la detección de ABZSO (3.04 min \pm 0.017), ABZSOO (3.11 min \pm 0.015) y CBZ (4.11 min \pm 0.017), que son idénticos a los detectados en las curvas de calibración.

Tabla 14. Cuantificación de metabolitos en las muestras analizadas.

Muestras con ABZ (nM)	Concentración de ABZSO (nmol)	Concentración de ABSOO (nmol)
Control	0.497 \pm 0.70	0.0
7.0	3.02 \pm 0.20	0.0
10	1.93 \pm 0.22	0.0
15	10.69 \pm 0.55**	3.73 \pm 0.52
20	342.53 \pm 45.06*	25.81 \pm 3.21*
25	664.98 \pm 87.26*	148.32 \pm 19.50*

Significancia estadística de prueba T-student: * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001.

Los resultados de cuantificación de metabolitos por LC-MS/MS detectaron la presencia de ABZSO desde la concentración más baja (7.0 nM de ABZ) y significativamente desde los 15 nM de ABZ (10.69 ± 0.55 nmol) con un pico máximo a 25 nM de ABZ (664.98 ± 87.26 nmol) mientras que el ABZSOO se cuantificó de manera significativa desde las concentraciones de 20 y 25 nM de ABZ (25.81 ± 3.21 y 148.32 ± 19.50 nmol, respectivamente).

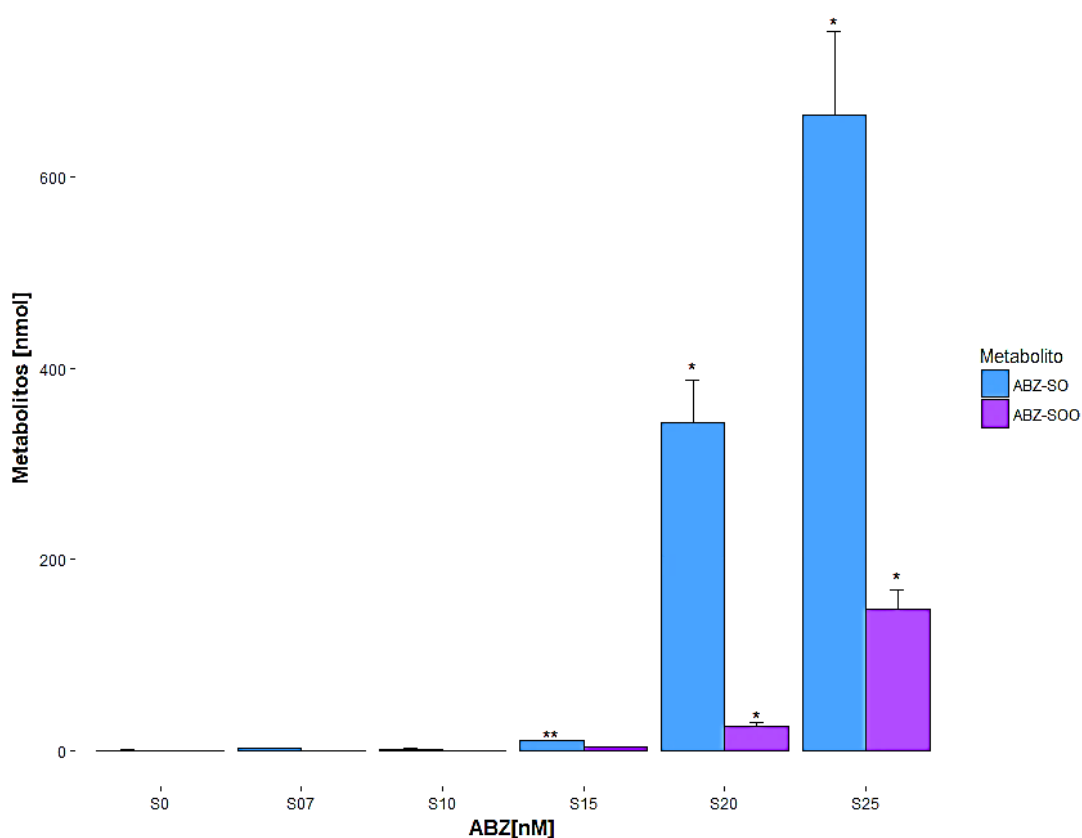


Figura 21. Cuantificación de metabolitos de ABZ (ABZSO y ABZSOO) mediante HPLC-MS/MS. Significancia estadística expresada con $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** y $p < 0.001$ ***.

8.4. Niveles de expresión de genes involucrados en la biotransformación de ABZ

Con la finalidad de examinar los niveles de expresión a nivel de RNAm de los genes que de acuerdo al sistema de biotransformación canónica de ABZ podrían estar involucradas, y si estos tienen una relación con el nivel de resistencia a ABZ se realizaron ensayos de RT-PCR utilizando las clonas sensible WB y las clonas resistentes a 250 μ M de ABZ.

Tabla 15. Oligos utilizados para la RT-PCR.

Oligos	Forward	Reverse
CYPOR	AGGTGGTAGCAGAGGCATCAG	GGGAGGAGAACTTGGTAAATA
GdFIHb	ACGCTTTCCGAAGACACCCTGAG	CTAATGGGAGGCCTTGAAGGGGCC
FDP	AGGAATGGCTCTCTCGTAT	GACGGTGCTTGCGACTTCA
Ubiquitina	GATCTTCGTCAAGACTCTCACCG	TAGTTACCACCACGGAGGCG

El gen de la proteína Flavo-dihierro (FDP) se utilizó como control interno, ya que se conoce que los niveles de expresión varían entre las clonas sensibles y las resistentes al ABZ (Argüello-García et al. 2015). La ubiquitina se utilizó como control de carga de cDNA.

La síntesis de cDNA se realizó con los oligonucleótidos y el kit SuperScript II RNasa H-final. Las condiciones de la PCR fueron: 94°C por 5min, después por 30 ciclos 94°C por 30seg, 64°C por 30seg, 72°C por 30seg y 72°C por 5min.

Los productos de las reacciones de amplificación se resolvieron en geles de agarosa al 3% y el nivel de expresión semi-cuantitativo se llevó a cabo mediante densitometría considerando la intensidad de las bandas en las imágenes de los geles. Estos valores fueron normalizados con los valores del control de expresión constante (ubiquitina).

Tabla 16. Valores arbitrarios de expresión de RT-PCR

Gen	WB (U.A.)	R250 (U.A.)
GdFIHb	0.8127 ± 0.128	0.1980 ± 0.104**
CYPOR	0.6077 ± 0.165	0.1346 ± 0.014*
FDP	1.2471 ± 0.145	0.5848 ± 0.041**
Ubiquitina	1.0530 ± 0.062	0.9517 ± 0.054

Significancia estadística de prueba T-student * p < 0.05, ** p<0.01 y *** p<0.001.

Los resultados mostraron expresiones diferenciales en los genes que podrían estar involucrados en la metabolización de ABZ. Para el gen de la GdFIHb se encontró que los niveles de expresión en la clona resistente a 250 µM de ABZ (R250), disminuyeron su expresión significativamente (61%), al igual que el gen de la CYPOR en un 47% comparada con la clona sensible (WB). Con respecto al gen de la FDP, éste mostró un comportamiento en su expresión como se esperaba, disminuyendo su expresión en clonas sensibles, y el control de carga la ubiquitina fue constante en todas las muestras.

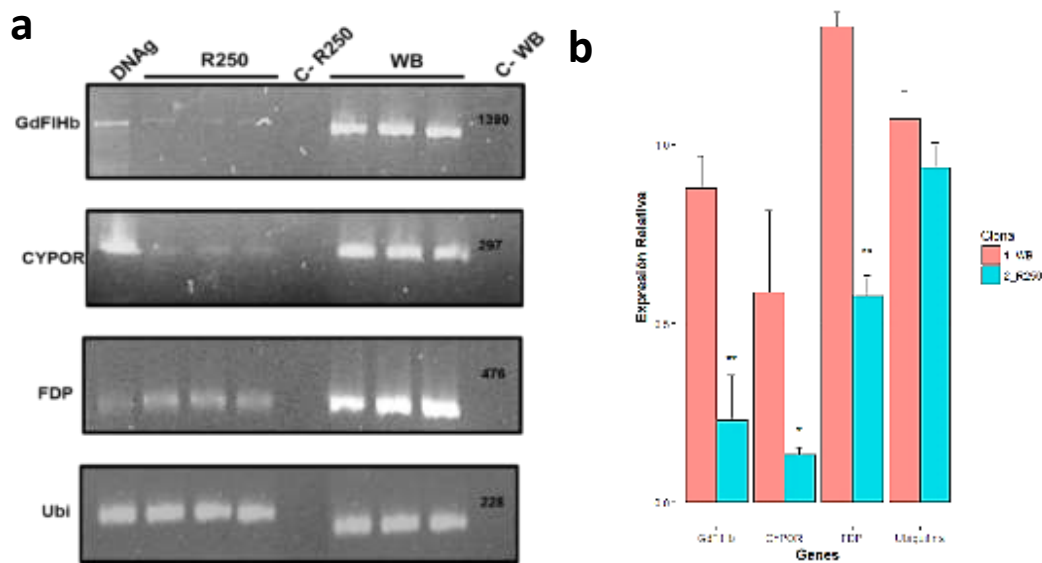


Figura 22: Análisis semicuantitativo de RT-PCR. **a)** Niveles de expresión de los genes GdFIHb, CYPOR y FDP que podrían estar involucrados en la metabolización de ABZ en clonas sensibles y resistentes a 250 µM de ABZ. **b)** Análisis densitométrico de expresión de genes en clonas sensibles y resistentes, significancia estadística expresada con p < 0.05 *, p<0.01 ** y p>0.001 ***.

8.5. Clonación de la Flavohemoglobina de *G. duodenalis* en el vector pAC

Para determinar si la Flavohemoglobina de *G. duodenalis* está involucrada funcionalmente en la resistencia a ABZ, se planteó llevar a cabo su clonación en un vector que permitiera expresarla constitutivamente en trofozoítos sensibles WB para lo cual se empleó el vector pAC que es específico de *Giardia*.

La construcción de este vector que contiene el gen completo de la Flavohemoglobina fue denominada como pAC_GdFIHb. La estrategia general fue: 1) Diseño de oligonucleótidos iniciadores con sitios de restricción para EcoRV y NotI, 2) PCR de DNA genómico con los Oligos anteriores, 3) Clonación en el vector pJET1.2/blunt, 4) selección de candidatas, 5) PCR, digestión y secuenciación del vector pJET con el gen de la GdFIHb (pJET_GdFIHb), 6) Clonación en el vector pAC y 7) PCR, digestión y secuenciación del vector pAC_GdFIHb.

Los productos amplificados por PCR con el DNA genómico fueron los esperados, con el tamaño aproximadamente de 1390 bp. Este producto de PCR se clonó en el vector de transición pJET1.2/blunt y se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH5 α . De estas clonas se seleccionaron candidatas que contenían el inserto por medio de PCR de colonia, se hicieron digestiones con las enzimas de restricción EcoRV y NotI, y se secuenciaron por medio del kit BigDye Terminator v 3.1.

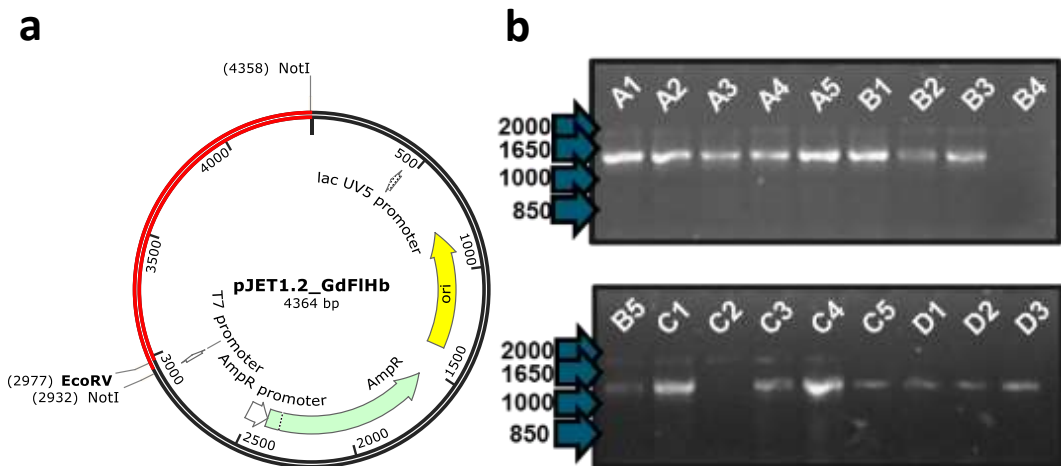


Figura 23: Clonación de GdFIHb en el vector pJET1.2/blund. **a)** Esquema de la clonación pJET_GdFIHb. **b)** Colony PCR de candidatas pJET_GdFIHb.

Una vez se confirmaron las candidatas que presentaron la inserción completa del gen GdFIHb en el vector pJET, se procedió a insertar el gen GdFIHb en el vector pAC. Para esto se cultivó por toda la noche 20 mL de las clonas candidatas en medio LB + amp, posteriormente se extrajo el plásmido y se realizó la digestión de 10 µg a 37°C por 18hrs con las enzimas EcoRV y NotI. Para el vector pAC también se hizo digestión con las enzimas EcoRV y NotI, y por último se incubó por una hora con la proteína CIP (fosfatasa alcalina intestinal).

Los productos de digestión se analizaron en geles de agarosa al 1%. Los fragmentos digeridos del tamaño esperado se purificaron del gel con QIAquick Gel Extraction kit, se realizó la ligación del gen GdFIHb con el vector pAC con la ligasa T4 y del producto de ligación se procedió a transformar bacterias *E. coli* DH5α. Se comprobó el inserto por medio de digestión con EcoRV y NotI, PCRs y secuenciación.

Con estos resultados, se confirmó la clonación adecuada del gen GdFIHb para su futuro uso en experimentos de transfección de trofozoítos sensibles

a ABZ, para confirmar si se conserva o se cambia su patrón de sensibilidad a este fármaco.

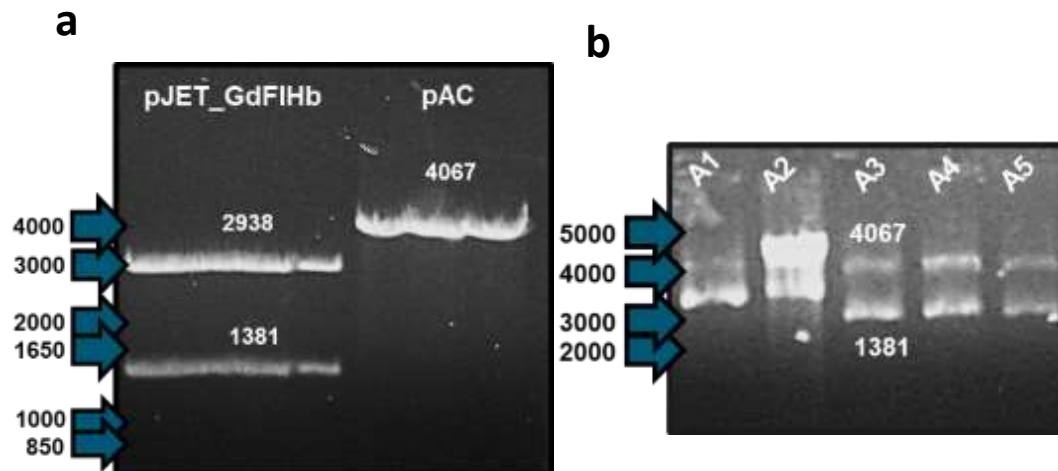


Figura 24: Digestión de pJET_GdFlHb y candidatas de pAC_GdFlHb. **a)** Digestión de pJET_GdFlHb para su extracción y clonación en el vector pAC. **b)** PCR de colonias candidatas pAC_GdFlHb.

```

pJET_GdFlHb      TGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATGATATCATGACGCTTCCGAAGACACCCTGAGGGCCGTGGAGGGACCCGCCGCCTCATCGCCGCTCAAGGCATCGA
Forward_GdFlHb  TGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATGATATCATGACGCTTCCGAAGACACCCTGAGGGCCGTGGAGGGACCCGCCGCCTCATCGCCGCTCAAGGCATCGA
Forward_pJET    TTTTCAGCAAGATGATATCATGACGCTTCCGAAGACACCCTGAGGGCCGTGGAGGGACCCGCCGCCTCATCGCCGCTCAAGGCATCGA
Reverse_GdFlHb  TTTTCAGCAAGATGATATCATGACGCTTCCGAAGACACCCTGAGGGCCGTGGAGGGACCCGCCGCCTCATCGCCGCTCAAGGCATCGA
Reverse_pJET    TTTTCAGCAAGATGATATCATGACGCTTCCGAAGACACCCTGAGGGCCGTGGAGGGACCCGCCGCCTCATCGCCGCTCAAGGCATCGA

pJET_GdFlHb      GTTTACTCGCGCCTTCTACGAGCGCATGTTGACCAAGAACAAGAGCTGAAGAACATCTTCAATCTAGCCACCAGCGCACCCCTGCGCCAGCCCAAGGCC
Forward_GdFlHb  GTTTACTCGCGCCTTCTACGAGCGCATGTTGACCAAGAACAAGAGCTGAAGAACATCTTCAATCTAGCCACCAGCGCACCCCTGCGCCAGCCCAAGGCC
Forward_pJET    GTTTACTCGCGCCTTCTACGAGCGCATGTTGACCAAGAACAAGAGCTGAAGAACATCTTCAATCTAGCCACCAGCGCACCCCTGCGCCAGCCCAAGGCC
Reverse_GdFlHb  GTTTACTCGCGCCTTCTACGAGCGCATGTTGACCAAGAACAAGAGCTGAAGAACATCTTCAATCTAGCCACCAGCGCACCCCTGCGCCAGCCCAAGGCC
Reverse_pJET    GTTTACTCGCGCCTTCTACGAGCGCATGTTGACCAAGAACAAGAGCTGAAGAACATCTTCAATCTAGCCACCAGCGCACCCCTGCGCCAGCCCAAGGCC

pJET_GdFlHb      CTGCTCGACTCCCTCGTCCCTACGCGCTGAATATCCGTAGGATCAATGAGCTGTACGAGCTGAAGGGGAAGGGCCTGCCGTCGCCGACAGCACTGGG
Forward_GdFlHb  CTGCTCGACTCCCTCGTCCCTACGCGCTGAATATCCGTAGGATCAATGAGCTGTACGAGCTGAAGGGGAAGGGCCTGCCGTCGCCGACAGCACTGGG
Forward_pJET    CTGCTCGACTCCCTCGTCCCTACGCGCTGAATATCCGTAGGATCAATGAGCTGTACGAGCTGAAGGGGAAGGGCCTGCCGTCGCCGACAGCACTGGG
Reverse_GdFlHb  CTGCTCGACTCCCTCGTCCCTACGCGCTGAATATCCGTAGGATCAATGAGCTGTACGAGCTGAAGGGGAAGGGCCTGCCGTCGCCGACAGCACTGGG
Reverse_pJET    CTGCTCGACTCCCTCGTCCCTACGCGCTGAATATCCGTAGGATCAATGAGCTGTACGAGCTGAAGGGGAAGGGCCTGCCGTCGCCGACAGCACTGGG

pJET_GdFlHb      CCGAGCTGCAGGGTTCCTCTCTGCGCCGAGCGTGTGCGGAACAAGCACACCAGCTTGGCATCCAACCTGCGCAGTATCAGATTGTGCGGCACACCT
Forward_GdFlHb  CCGAGCTGCAGGGTTCCTCTCTGCGCCGAGCGTGTGCGGAACAAGCACACCAGCTTGGCATCCAACCTGCGCAGTATCAGATTGTGCGGCACACCT
Forward_pJET    CCGAGCTGCAGGGTTCCTCTCTGCGCCGAGCGTGTGCGGAACAAGCACACCAGCTTGGCATCCAACCTGCGCAGTATCAGATTGTGCGGCACACCT
Reverse_GdFlHb  CCGAGCTGCAGGGTTCCTCTCTGCGCCGAGCGTGTGCGGAACAAGCACACCAGCTTGGCATCCAACCTGCGCAGTATCAGATTGTGCGGCACACCT
Reverse_pJET    CCGAGCTGCAGGGTTCCTCTCTGCGCCGAGCGTGTGCGGAACAAGCACACCAGCTTGGCATCCAACCTGCGCAGTATCAGATTGTGCGGCACACCT

pJET_GdFlHb      GCTCGCTACCATCGAGGATCGCATAAACCAGCAAGGACATTTCTGCGAGAGTGGGCCAAGGCCTACCAATTCCTGCGCGACCTCTTCATCAAAACGGGA
Forward_GdFlHb  GCTCGCTACCATCGAGGATCGCATAAACCAGCAAGGACATTTCTGCGAGAGTGGGCCAAGGCCTACCAATTCCTGCGCGACCTCTTCATCAAAACGGGA
Forward_pJET    GCTCGCTACCATCGAGGATCGCATAAACCAGCAAGGACATTTCTGCGAGAGTGGGCCAAGGCCTACCAATTCCTGCGCGACCTCTTCATCAAAACGGGA
Reverse_GdFlHb  GCTCGCTACCATCGAGGATCGCATAAACCAGCAAGGACATTTCTGCGAGAGTGGGCCAAGGCCTACCAATTCCTGCGCGACCTCTTCATCAAAACGGGA
Reverse_pJET    GCTCGCTACCATCGAGGATCGCATAAACCAGCAAGGACATTTCTGCGAGAGTGGGCCAAGGCCTACCAATTCCTGCGCGACCTCTTCATCAAAACGGGA

pJET_GdFlHb      GGAGGAGATCTATGCCCGGACAGAGGGCTGCAAGGGCGGGTGGCGCCAGACTCGCACGTTCCGCGTCGAGGAAAAGACCAGGGTCAACGAAATCATCTGC
Forward_GdFlHb  GGAGGAGATCTATGCCCGGACAGAGGGCTGCAAGGGCGGGTGGCGCCAGACTCGCACGTTCCGCGTCGAGGAAAAGACCAGGGTCAACGAAATCATCTGC
Forward_pJET    GGAGGAGATCTATGCCCGGACAGAGGGCTGCAAGGGCGGGTGGCGCCAGACTCGCACGTTCCGCGTCGAGGAAAAGACCAGGGTCAACGAAATCATCTGC
Reverse_GdFlHb  GGAGGAGATCTATGCCCGGACAGAGGGCTGCAAGGGCGGGTGGCGCCAGACTCGCACGTTCCGCGTCGAGGAAAAGACCAGGGTCAACGAAATCATCTGC
Reverse_pJET    GGAGGAGATCTATGCCCGGACAGAGGGCTGCAAGGGCGGGTGGCGCCAGACTCGCACGTTCCGCGTCGAGGAAAAGACCAGGGTCAACGAAATCATCTGC

pJET_GdFlHb      CCATGATTACGTGAGCACTGGCGATCTGCTCGAGTGGCGCCCTACGGGACTTCTTCTCAGGTATCTCGAGGCCGATGAGCAGGCCCTGCGGA
Forward_GdFlHb  CCATGATTACGTGAGCACTGGCGATCTGCTCGAGTGGCGCCCTACGGGACTTCTTCTCAGGTATCTCGAGGCCGATGAGCAGGCCCTGCGGA
Forward_pJET    CCATGATTACGTGAGCACTGGCGATCTGCTCGAGTGGCGCCCTACGGGACTTCTTCTCAGGTATCTCGAGGCCGATGAGCAGGCCCTGCGGA

```

```

Reverse_GdFlHb  CCAATGATTACGTGAGCACTGGCGATCTGCTCGA-CT-FGCGCCGCTTACGGGGACTTCTTCCCTCAGGTATCTCGAGGCCGATGAGCAGGCCCTGCGGA
Reverse_pJET    CCAATGATTACGTGAGCACTGGCGATCTGCTCGA-CT-FGCGCCGCTTACGGG-ACT-CT-CCTCAGGTATCTCGAG-CCGATGAGCAGGCC-CTCGGA

pJET_GdFlHb    CACACAGGCCCTCGCAAGAGTCCAAATGCTGCAGAGCGGGGCCATCAACTTTGGGCGAGAGAAGACGATGCCGATTGTGCTCATCTCCGGCGGCATCGGC
Forward_GdFlHb  -----
Forward_pJET    -----
Reverse_GdFlHb  CACACAGGCCCTCGCAAGAGTCCAAATGCTGCAGAGCGGGGCCATCAACTTTGGGCGAGAGAAGACGATGCCGATTGTGCTCATCTCCGGCGGCATCGGC
Reverse_pJET    CACACAGGCCCTCGCAAGAGTCCAAATGCTGCAGAGCGGGGCCATCAACTTTGGGCGAGAGAAGACGATGCCGATTGTGCTCATCTCCGGCGGCATCGGC

pJET_GdFlHb    CAGACCCCGCTGCTGTCGATGCTCAGGTTCCCTCGCGCAGAAGGAGGGCAAGGAGACGGCCCGCCCATCTTCTGGATCCATGCCGCGCACAAACAGCCGGC
Forward_GdFlHb  -----
Forward_pJET    -----
Reverse_GdFlHb  CAGACCCCGCTGCTGTCGATGCTCAGGTTCCCTCGCGCAGAAGGAGGGCAAGGAGACGGCCCGCCCATCTTCTGGATCCATGCCGCGCACAAACAGCCGGC
Reverse_pJET    CAGACCCCGCTGCTGTCGATGCTCAGGTTCCCTCGCGCAGAAGGAGGGCAAGGAGACGGCCCGCCCATCTTCTGGATCCATGCCGCGCACAAACAGCCGGC

pJET_GdFlHb    TCCGCGCCTTCAAGGAAGAGGTTGACCGGATCAGAGAGACGGCTCTGCCAAGCCTGCGCGTCGTGACCTTTCTGAGCGAGGTCAGGGCGACGGACAGAGA
Forward_GdFlHb  -----
Forward_pJET    -----
Reverse_GdFlHb  TCCGCGCCTTCAAGGAAGAGGTTGACCGGATCAGAGAGACGGCTCTGCCAAGCCTGCGCGTCGTGACCTTTCTGAGCGAGGTCAGGGCGACGGACAGAGA
Reverse_pJET    TCCGCGCCTTCAAGGAAGAGGTTGACCGGATCAGAGAGACGGCTCTGCCAAGCCTGCGCGTCGTGACCTTTCTGAGCGAGGTCAGGGCGACGGACAGAGA

pJET_GdFlHb    GGGCGAGGATTACGACTTCGCGGGGCGCATCAACCTTGACCGTATCTCGGAACTCAGCAAGCTGGAGGCGACACAGGCCAATCCGCACACTTCTTCTGCTC
Forward_GdFlHb  -----
Forward_pJET    -----
Reverse_GdFlHb  GGGCGAGGATTACGACTTCGCGGGGCGCATCAACCTTGACCGTATCTCGGAACTCAGCAAGCTGGAGGCGACACAGGCCAATCCGCACACTTCTTCTGCTC
Reverse_pJET    GGGCGAGGATTACGACTTCGCGGGGCGCATCAACCTTGACCGTATCTCGGAACTCAGCAAGCTGGAGGCGACACAGGCCAATCCGCACACTTCTTCTGCTC

pJET_GdFlHb    GGGCCGACCGGCTTCATGACCCCGTGGAGGAGCAGCTCAAGACCAAGTCCGTGCCCAATAGCCGATCCACTTCGAGATGTCGGCCCTTCAAGGCC
Forward_GdFlHb  -----
Forward_pJET    -----
Reverse_GdFlHb  GGGCCGACCGGCTTCATGACCCCGTGGAGGAGCAGCTCAAGACCAAGTCCGTGCCCAATAGCCGATCCACTTCGAGATGTCGGCCCTTCAAGGCC
Reverse_pJET    GGGCCGACCGG-CTCATGACCCCGTGGAGGAGCAGCTCAAGACCAAGTCCGTGCCCAATAGCCGATCCACTTCGAGATGTCGGCCCTTCAAGGCC

```

Figura 25: Alineamiento de la secuenciación de pJET_GdFlHb, utilizando los Oligos de la GdFlHb (Forward_GdFlHb y Reverse_GdFlHb) y del vector pJET (Forward_pJET y Reverse_pJET).

9. Discusión

Las infecciones parasitarias por protozoarios y helmintos son un problema creciente de salud en todo el mundo. El control de estas infecciones se lleva a cabo por tratamientos farmacológicos. El ABZ, un fármaco del grupo de los bencimidazoles tiene un efecto antiparasitario de amplio espectro y además tiene un costo accesible, lo cual lo hace uno de los fármacos más utilizados a nivel mundial contra diversas parasitosis. La resistencia a ABZ y a otros fármacos se ha observado *in vitro* en clonas de *G. duodenalis*, y se han reportado casos clínicos refractarios a estos fármacos (Leitsch 2015; Carter et al. 2018; Kaya et al. 2018) y específicamente se han aislados parásitos resistentes a ABZ y MTZ (Gardner & Hill 2005; Leitsch 2015). Esto último podría deberse al hecho de que en el tratamiento de casos clínicos de giardiasis los tratamientos no se llevan a cabo adecuadamente o el empleo de dosis subóptimas de este fármaco o al uso de dosis únicas en campañas de desparasitación particularmente en nuestro país (Tian et al. 2010; Quihui-Cota & Morales-Figueroa 2012; Watkins & Eckmann 2014). El ABZ es un profármaco que es metabolizado por el sistema CYP450, el ABZSO es el metabolito citotóxico que se une a la β -tubulina y arresta la polimerización de los microtúbulos (MacDonald et al. 2004). En helmintos, se conoce que la resistencia a ABZ se asocia a mutaciones puntuales de la β -tubulina en el sitio interacción con el ABZ con los TYR167, ALA198 y TYR200. Sin embargo en *G. duodenalis* no se han encontrado cambios en

estos residuos, por lo que se sugiere que en éste parásito puedan inducirse otros mecanismos relacionados con el fenotipo resistente (Upcroft et al. 1996; Argüello-García et al. 2015).

La metabolización de ABZ en *Giardia* se han estudiado tanto empleando anticuerpos contra sus metabolitos, como mediante la cuantificación de metabolitos por HPLC en clonas sensibles y resistentes (Oxberry et al. 2000; Argüello-García et al. 2015). En este último trabajo, se reportó una mayor acumulación ABZSO y ABZSOO en clonas susceptibles en comparación con las clonas resistentes, sugiriendo una menor tasa de conversión del fármaco o una mayor capacidad de degradación y/o detoxificación de los metabolitos.

En clonas resistentes a ABZ se observado la expresión diferencial de genes de VSPs, del citoesqueleto (alfa 2-giardina y RanBP1), del metabolismo antioxidante (NADH oxidasa, peroxiredoxina 1a, superóxido dismutasa y flavodihierro proteína) y del metabolismo energético (triosa fosfato isomerasa, fosfoglicerato cinasa y ornitina carbamoiltransferasa), así como alteraciones en el citoesqueleto, re-arreglos cromosómicos y generación de especies reactivas de oxígeno (Upcroft et al. 1996; Paz-Maldonado et al. 2013; Argüello-García et al. 2009; Argüello-García et al. 2015; Martínez-Espinosa et al. 2015). Estos reportes sugieren que en la resistencia de *G. duodenalis* a ABZ es multifactorial y que participan diferentes proteínas para mantener este fenotipo, como se han reportado para loas clonas resistentes a MTZ (Ansell et al. 2017), los mecanismos moleculares pasivos y activos

de expresión de genes que podrían estar influenciando el fenotipo resistente a ABZ.

En el presente trabajo se evaluó la metabolización *in vitro* de ABZ empleando la proteína Flavohemoglobina (GdFIHb) en su forma recombinante, así como las proteínas posiblemente implicadas en la resistencia a este fármaco a nivel de su expresión transcripcional (RNAm) en clonas sensibles y resistentes. Los métodos para determinar la metabolización de ABZ por la GdFIHb incluyeron la medición de su actividad específica y la cuantificación de los metabolitos de estas reacciones por HPLC-MS/MS. Con los resultados obtenidos, se demostró por primera vez que la GdFIHb es capaz de convertir el ABZ en sus metabolitos ABZSO y ABZSOO, y que la CYPOR y la GdFIHb están relacionada en la resistencia funcionando como un mecanismo pasivo.

A lo largo del presente trabajo, los análisis *in silico* fueron trascendentales en este trabajo en el sentido de que orientaron la investigación a ensayar la posibilidad de que la GdFIHb pudiera metabolizar el ABZ. Los análisis de docking proteína-ligando son enfoques que permiten la caracterización del comportamiento de la interacción y entender los procesos bioquímicos de la proteína y su(s) ligando (Meng et al. 2011; Elokely & Doerksen 2013). De estos análisis, se predijo que el ABZ podría interactúa con el bolsillo catalítico de GdFIHb con alta afinidad, al igual que otros miembros de los bencimidazoles analizados (MBZ y FBZ). De esta manera, la GdFIHb

podiera fungir como proteína multifuncional con la capacidad de metabolizar varios sustratos de la familia de bencimidazoles. Esta característica de catalizar varios sustratos es común en varias proteínas en estudios enzimáticos *in vitro*, específicamente para CYP450 existe un fenómeno llamado cooperatividad homotrópico y heterotrópico, en donde múltiples ligandos son necesarios para hacer eficiente la catálisis, aun y cuando cada sustrato tienen distintos coeficientes de afinidad (Fernando et al. 2006; Holt et al. 2008; Fernando et al. 2011; Kuo et al. 2016).

En general, las Flavohemoglobinas son enzimas de protección a estrés nitrosativo mediante la conversión del óxido nítrico a un nitrato más estable (NO_3^-) decreciendo así el potencial de toxicidad en la células varios ordenes de magnitud. Las Flavohemoglobinas son comunes en bacterias Gram-negativas, pero también se han encontrado en algunos hongos y parásitos protozoarios, incluido Giardia (Hausladen et al. 1998; Bollinger et al. 2001; Frey & Kallio 2003; Gardner 2005; Rafferty et al. 2010; Mastronicola et al. 2010). No obstante, en ninguno de los trabajos previos sobre la caracterización de Flavohemoglobinas se había probado la posibilidad de que tuviera la capacidad de metabolizar otros fármacos de uso clínico. El presente trabajo representa el primer avance en la capacidad multifuncional de GdFIHb para interactuar con otros ligandos como es el grupo de los bencimidazoles.

La expresión de las Flavohemoglobinas en diferentes organismos está en relación con el estrés oxidativo y nitrosativo que padecen las células, tales como la presencia de oxígeno molecular, donadores de óxido nítrico y algunos fármacos (Crawford et al. 1995; Zhao et al. 1996; Buisson & Labbebois 1998; Ullmann et al. 2004). Específicamente para la Flavohemoglobina de *G. duodenalis* se ha caracterizado el aumento de su expresión en presencia de donadores de óxido nítrico tales como NONOato y GSNO (Mastronicola et al. 2010), y a pesar de que el ABZ produce estrés oxidativo por inducción de ROS (Martínez-Espinosa et al. 2015), los niveles de expresión de GdFIHb y CYPOR disminuyeron significativamente en las clonas resistentes. Estos resultados sugieren la participación de un mecanismo pasivo de resistencia con similitud al que se ha observado en la resistencia a MTZ (Ansell et al. 2017), en el cual las proteínas participantes en la biotransformación del ABZ disminuyen su expresión y de esta manera se evita la metabolización del ABZ y la formación de metabolitos citotóxicos, especialmente el ABZSO. Por otra parte, la presencia de mecanismos activos de resistencia a ABZ está sugerida fuertemente por los niveles de expresión incrementado de proteínas involucradas en respuesta antioxidantes en clonas resistentes (Paz-Maldonado et al. 2013; Argüello-García et al. 2015).

Finalmente, para corroborar en estudios futuros la relación de la GdFIHb con la resistencia a ABZ, se clonó el gen completo en el vector de expresión pAC

(pAC_GdFIHb) para transfectar trofozoítos y evaluar su sensibilidad al ABZ. Para estos ensayos se puede hipotetizar que los trofozoítos WB transfectantes serán más sensibles a ABZ, en tanto que los trofozoítos resistentes a 1.35, 8 y 250 μ M podría presentar una reversión parcial o muy pronunciada del fenotipo resistente.

Considerando la información obtenida en el presente trabajo, proponemos un modelo en el cual la Flavohemoglobina biotransforma al ABZ en sus metabolitos ABZSO y ABZSOO, y las proteínas GdFIHb, CYPOR y CYTb5 interactúan entre si constituyendo el sistema de biotransformación del ABZ en *G. duodenalis*. Con la expresión diferencial de estas proteínas, proponemos un mecanismo de resistencia pasiva. Los resultados obtenidos en este trabajo permitirán entender los mecanismos moleculares de resistencia de *G. duodenalis* a ABZ, y abre un panorama para el diseño de tratamientos, así como estrategias para combatir esta infección. En este contexto, la activación o sobreexpresión de este sistema en trofozoítos sería un enfoque terapéutico para el desarrollo de nuevos medicamentos contra la giardiasis.

10. Conclusiones

- Los estudios bioinformáticos realizados indicaron que la GdFIHb, CYPOR-like y las isoformas de cytB5 son candidatos en la participación del sistema de biotransformación del ABZ.
- El ABZ aumentó significativamente la actividad de la GdFIHb.
- La GdFIHb metabolizó el ABZ a sus metabolitos ABZSO y ABZSOO
- Los niveles de transcrito de GdFLHb y CYPOR-Like están disminuidos en la clona WBR250, remarcando un mecanismo pasivo de resistencia.
- Se clonó el gen completo de la GdFIHb en el vector de expresión pAC.

11. Perspectivas

- Evaluar la expresión de las enzimas que se encuentren involucradas en el metabolismo de ABZ por RT-qPCR.
- Transfectar trofozoítos con la GdFIHb clonada en el plásmido pAC y evaluar su efecto en la sensibilidad al ABZ.
- Realizar ensayo de inhibidores específicos del sistema putativo de biotransformación de ABZ.

12. Bibliografía

- Adagu, I.S. et al., 2002. In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 49(1), pp.103–111.
- Adam, R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), pp.447–475. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88984/>.
- Adl, S.M. et al., 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(5), pp.429–493.
- Aguayo-Ortiz, R. et al., 2013. Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel B-tubulin binding site model. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 45, pp.26–37. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmglm.2013.07.008>.
- Alam, S. et al., 2012. Cytochrome b5 from *Giardia lamblia*. *Metallomics : integrated biometal science*, 4(12), pp.1255–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23151674>.
- Altschul, S.F. et al., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), pp.3389–3402. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC146917/>.
- Andersson, J.O. et al., 2003. Phylogenetic analyses of diplomonad genes reveal frequent lateral gene transfers affecting eukaryotes. *Current Biology*, 13(2), pp.94–104.
- Ankarklev, J. et al., 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), pp.413–422. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2317>.
- Ansell, B.R.E. et al., 2015. Drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Biotechnology Advances*, 33(6), pp.888–901. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.009>.
- Ansell, B.R.E. et al., 2017. Transcriptomics indicates active and passive metronidazole resistance mechanisms in three seminal *Giardia* lines. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), p.398.
- Argüello-García, R. et al., 2002. Sequential exposure and assembly of cyst wall filaments on the surface of encysting *Giardia duodenalis*. *Parasitology*, 125(3), pp.209–219.
- Argüello-García, R. et al., 2015. An antioxidant response is involved in resistance of *Giardia duodenalis* to albendazole. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR), pp.1–13.
- Argüello-García, R. et al., 2009. In vitro resistance to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in *Giardia duodenalis*: Variability and variation in gene expression. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), pp.1057–1064.
- Arisue, N., Hasegawa, M. & Hashimoto, T., 2005. Root of the Eukaryota tree as inferred from combined maximum likelihood analyses of multiple molecular sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 22(3), pp.409–420.
- Bernander, R., Palm, J.E.D. & Svärd, S.G., 2001. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cellular Microbiology*, 3(1), pp.55–62.
- Biasini, M. et al., 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), pp.W252–W258. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gku340>.
- Bollinger, C.J.T., Bailey, J.E. & Kallio, P.T., 2001. Novel hemoglobins to enhance microaerobic growth and substrate utilization in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 17(5), pp.798–808.

- Boreham, P.F., Phillips, R.E. & Shepherd, R.W., 1985. A comparison of the in-vitro activity of some 5-nitroimidazoles and other compounds against *Giardia intestinalis*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 16(5), pp.589–595.
- Brasseur, P. & Favennec, L., 1995. Two cases of giardiasis unsuccessfully treated by albendazole. *Parasite (Paris, France)*, 2(4), p.422.
- Buisson, N. & Labbe-bois, R., 1998. Flavohemoglobin Expression and Function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(16), pp.9527–9533. Available at: <http://www.jbc.org/content/273/16/9527.short>.
- Buret, a G., 2008. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. *Parasite (Paris, France)*, 15(3), pp.261–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18814692>.
- Carter, E.R. et al., 2018. Nitroimidazole-refractory giardiasis: a growing problem requiring rational solutions. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(1), pp.37–42. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.05.028>.
- De Carvalho, T.B. et al., 2008. Protease activity in extracellular products secreted in vitro by trophozoites of *Giardia duodenalis*. *Parasitology Research*, 104(1), pp.185–190.
- Cedillo-Rivera, R. et al., 2009. Seroepidemiology of giardiasis in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(1), pp.6–10.
- Chavez, B., Cedillo-Rivera, R. & Martinez-Palomo, A., 1992. *Giardia lamblia*: Ultrastructural study of the In vitro Effect of Benzimidazoles. *J. Protozol*, 39(4), pp.510–515.
- Cosar, C. & Julou, L., 1959. [The activity of 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (R. P. 8823) against experimental *Trichomonas vaginalis* infections]. *Annales de l'Institut Pasteur*, 96(2), pp.238–241.
- Crawford, M.J., Sherman, D.R. & Goldberg, D.E., 1995. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* flavohemoglobin gene expression. *The Journal of biological chemistry*, 270(12), pp.6991–6996.
- Cruz-Soto, M., 2000. *Determinación de la eficacia y actividad in vitro de farmacos de la familia de los bencimidazoles en el protozooario Giardia duodenalis. Caracterizacion parcial de la resistencia a drogas en este parasito.*
- Dayan, A.D., 2003. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, 86(2–3), pp.141–159.
- Diawara, A. et al., 2013. Association between Response to Albendazole Treatment and B-Tubulin Genotype Frequencies in Soil-transmitted Helminths. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(5).
- Díaz, E.G., de Mecca, M.M. & Castro, J.A., 2004. Reactions of Nifurtimox with critical sulfhydryl-containing biomolecules: Their potential toxicology relevance. *Journal of Applied Toxicology*, 24(3), pp.189–195.
- Dimitrijević, B. et al., 2012. Effects of infection intensity with *Strongyloides papillosus* and albendazole treatment on development of oxidative/nitrosative stress in sheep. *Veterinary Parasitology*, 186(3–4), pp.364–375.
- Eckmann, L. et al., 2000. Nitric Oxide Production by Human Intestinal Epithelial Cells and Competition for Arginine as Potential Determinants of Host Defense Against the Lumen-Dwelling Pathogen *Giardia lamblia*. *The Journal of Immunology*, 164(3), pp.1478–1487. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.164.3.1478>.
- Edlind, T.D., 1989. Susceptibility of *Giardia lamblia* to aminoglycoside protein synthesis inhibitors: Correlation with rRNA structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(4), pp.484–488.
- Eisenberg, D., Lüthy, R. & Bowie, J.U., 1997. [20] VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods in Enzymology*, 277, pp.396–404.

- Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687997770228?via%3Dihub>
 [Consultado julio 22, 2018].
- Ellis, J.E. et al., 1993. Oxygen affinities of metronidazole-resistant and -sensitive stocks of *Giardia intestinalis*. *International Journal for Parasitology*, 23(1), pp.35–39.
- Elokely, K.M. & Doerksen, R.J., 2013. Docking challenge: Protein sampling and molecular docking performance. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(8), pp.1934–1945.
- Escobedo, A.A. et al., 2016. Combination therapy in the management of giardiasis: What laboratory and clinical studies tell us, so far. *Acta Tropica*, 162(616), pp.196–205.
 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.026>.
- Fernando, H. et al., 2011. Multiple substrate-binding sites are retained in cytochrome P450 3A4 mutants with decreased cooperativity. *Xenobiotica*, 41(4), pp.281–289.
- Fernando, H., Halpert, J.R. & Davydov, D.R., 2006. Resolution of Multiple Substrate Binding Sites in Cytochrome P450 3A4 : The Stoichiometry of the Enzyme - Substrate Complexes Probed by FRET and Job`s Titration. , pp.4199–4209.
- Frey, A.D. & Kallio, P.T., 2003. Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: Versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(4), pp.525–545.
- García-Solís, J.C., 2016. *Análisis de la posible participacion de una proteína CYP450-like en la resistencia a Albendazol en Giardia duodenalis*.
- Gardner, P.R., 2005. Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(1), pp.247–266.
- Gardner, T.B. & Hill, D.R., 2005. Treatment of giardiasis. *Current Treatment Options in Gastroenterology*, 8(1), pp.13–17.
- Gilles, H.M. & Hoffman, P.S., 2002. Treatment of intestinal parasitic infections: A review of nitazoxanide. *Trends in Parasitology*, 18(3), pp.95–97.
- Grazioli, B. et al., 2006. *Giardia lamblia* infection in patients with irritable bowel syndrome and dyspepsia: a prospective study. *World journal of gastroenterology : WJG*, 12(12), pp.1941–1944.
- Grosdidier, A., Zoete, V. & Michielin, O., 2011. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2), pp.270–277.
- Guengerich, F.P., 2005. Reduction of cytochrome b5 by NADPH-cytochrome P450 reductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 440(2), pp.204–211.
- Hansen, T.V. et al., 2013. Genetic variations in the beta-tubulin gene and the internal transcribed spacer 2 region of *Trichuris* species from man and baboons. *Parasites & Vectors*, 6(1), p.236. Available at:
<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-6-236>.
- Hausladen, A., Gow, A.J. & Stamler, J.S., 1998. Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(24), pp.14100–5. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24333&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Henderson, C.J., McLaughlin, L. a & Wolf, C.R., 2013. Evidence that cytochrome b5 and cytochrome b5 reductase can act as sole electron donors to the hepatic cytochrome P450 system. *Molecular pharmacology*, 83(6), pp.1209–17. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23530090>.
- Hoffman, P.S. et al., 2007. Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites,

- and *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(3), pp.868–876.
- Holt, A. et al., 2008. Multiple binding sites for substrates and modulators of semicarbazide-sensitive amine oxidases: kinetic consequences. *Molecular Pharmacology*, 73(2), pp.525–538. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-38749138925&partnerID=40&md5=6c23371e41f6916c2e3c57b46e2de74b>.
- Inui, H., Maeda, A. & Ohkawa, H., 2007. Molecular characterization of specifically active recombinant fused enzymes consisting of CYP3A4, NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase, and cytochrome b5. *Biochemistry*, 46(35), pp.10213–10221.
- Irwin, J.J. & Shoichet, B.K., 2005. ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model*, 45(December 2004), pp.177–182.
- Iyanagi, T., Xia, C. & Kim, J.J.P., 2012. NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase: Prototypic member of the diflavin reductase family. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 528(1), pp.72–89. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2012.09.002>.
- Kaufmann, S.H.E., 2008. Paul Ehrlich: founder of chemotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(5), pp.373–373. Available at: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nrd2582>.
- Kaya, F. et al., 2018. Refractory giardiasis in an immunosuppressed patient in Turkey. *Journal of Infection in Developing Countries*, 12(3), pp.204–207.
- Kochin, B.F., Bull, J.J. & Antia, R., 2010. Parasite evolution and life history theory. *PLoS Biology*, 8(10), pp.10–13.
- Koehler, A. V. et al., 2014. Giardia/giardiasis - A perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnology Advances*, 32(2), pp.280–289. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.009>.
- Kollaritsch, H., Jeschko, E. & Wiedermann, G., 1993. Albendazole is highly effective against cutaneous larva migrans but not against Giardia infection: results of an open pilot trial in travellers returning from the tropics. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(6), p.689.
- Koot, B.G. et al., 2009. Does Giardia lamblia Cause Villous Atrophy in Children?: A Retrospective Cohort Study of the Histological Abnormalities in Giardiasis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 49(3), pp.304–308. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005176-200909000-00007>.
- Kozakov, D. et al., 2017. The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nature Protocols*, 12(2), pp.255–278. Available at: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nprot.2016.169>.
- Kuo, Y.M., Henry, R.A. & Andrews, A.J., 2016. Measuring specificity in multi-substrate/product systems as a tool to investigate selectivity in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1864(1), pp.70–76. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.08.011>.
- Kwa, M.S.G. et al., 1995. β -Tubulin Genes from the Parasitic Nematode Haemonchus contortus Modulate Drug Resistance in Caenorhabditis elegans. *Journal of Molecular Biology*, 246(4), pp.500–510.
- Lalle, M., 2010. Giardiasis in the post genomic era: treatment, drug resistance and novel therapeutic perspectives. *Infectious disorders drug targets*, 10(4), pp.283–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20429863>.
- Laskowski, R.A. et al., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), pp.283–291. Available

- at: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0021889892009944>.
- Leitsch, D., 2015. Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. *Current Tropical Medicine Reports*, 2(3), pp.128–135. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s40475-015-0051-1>.
- Leitsch, D. et al., 2012. Nitroimidazole drugs vary in their mode of action in the human parasite *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, pp.166–170. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.04.002>.
- Leitsch, D. et al., 2011. Pyruvate: Ferredoxin oxidoreductase and thioredoxin reductase are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-nitroimidazole resistance in *Giardia lamblia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(8), pp.1756–1765.
- Leitsch, D., Müller, J. & Müller, N., 2016. Evaluation of *Giardia lamblia* thioredoxin reductase as drug activating enzyme and as drug target. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 6(3), pp.148–153. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2016.07.003>.
- Lindquist, A.H.D., 1996. Induction of Albendazole Resistance in *Giardia lamblia*. *Microbial Drug Resistance*, 2(4), pp.433–434.
- Locatelli, C. et al., 2004. A comparative study of albendazole and mebendazole-induced, time-dependent oxidative stress. *Redox report: communications in free radical research*, 9(May 2017), pp.89–95.
- Luján, H.D. et al., 1996. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), pp.7628–33. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38797&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lujan, H.D. & Svard, S., 2011. *Giardia A Model Organism*,
- MacDonald, L.M. et al., 2004. Characterisation of benzimidazole binding with recombinant tubulin from *Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Cryptosporidium parvum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 138(1), pp.89–96.
- De Man, H. et al., 2014. Quantitative assessment of infection risk from exposure to waterborne pathogens in urban floodwater. *Water Research*, 48(1), pp.90–99. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.022>.
- Marques, M.P., Takayanagui, O.M. & Lanchote, V.L., 2002. Albendazole metabolism in patients with neurocysticercosis: Antipyrine as a multifunctional marker drug of cytochrome P450. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35(2), pp.261–269.
- Martínez-Espinosa, R. et al., 2015. Albendazole induces oxidative stress and DNA damage in the parasitic protozoan *Giardia duodenalis*. *Frontiers in Microbiology*, 6(AUG), pp.1–14.
- Mastronicola, D. et al., 2010. Biochemical and Biophysical Research Communications Flavohemoglobin and nitric oxide detoxification in the human protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(4), pp.654–658. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.137>.
- Mastronicola, D. et al., 2011. *Giardia intestinalis* escapes oxidative stress by colonizing the small intestine: A molecular hypothesis. *IUBMB Life*, 63(1), pp.21–25.
- Maya, J.D. et al., 1997. Effects of Nifurtimox and benzimidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 86(1), pp.101–106.
- Meng, X.-Y. et al., 2011. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, 7(2), pp.146–57. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21534921><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3151162>.
- Monis, P.T., Caccio, S.M. & Thompson, R.C.A., 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in Parasitology*, 25(2), pp.93–100.
- de Montellano, P.R.O., 2015. *Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry, fourth edition*,
- Morrison, H.G. et al., 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*, 317(5846), pp.1921–1926.
- Müller, J. et al., 2007. A novel *Giardia lamblia* nitroreductase, G1NR1, interacts with nitazoxanide and other thiazolides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), pp.1979–1986.
- Müller, J. et al., 2015. Comparative characterisation of two nitroreductases from *Giardia lamblia* as potential activators of nitro compounds. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(2), pp.37–43. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.03.001>.
- Müller, J. et al., 2008. Identification of differentially expressed genes in a *Giardia lamblia* WB C6 clone resistant to nitazoxanide and metronidazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(1), pp.72–82.
- Müller, J., Schildknecht, P. & Müller, N., 2013. Metabolism of nitro drugs metronidazole and nitazoxanide in *Giardia lamblia*: Characterization of a novel nitroreductase (GLNR2). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(8), pp.1781–1789.
- Nash, T.E. et al., 2001. Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(1), pp.22–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17333792>.
- National Toxicology Program, 2016. Report on Carcinogens, Fourteenth Edition. Available at: <http://ntp.niehs.nih.gov/go/roc14>.
- Nillius, D., Müller, J. & Müller, N., 2011. Nitroreductase (GINR1) increases susceptibility of *Giardia lamblia* and *Escherichia coli* to nitro drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(5), pp.1029–1035.
- Omasits, U. et al., 2014. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*, 30(6), pp.884–886. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btt607>.
- Oxberry, M.E., Reynoldson, J.A. & Thompson, R.C.A., 2000. The binding and distribution of albendazole and its principal metabolites in *Giardia duodenalis*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 23(3), pp.113–120.
- Painter, J.E. et al., 2015. Cryptosporidiosis surveillance -- United States, 2011-2012. Giardiasis Surveillance — United States, 2011–2012. *MMWR supplements*, 64(3), pp.1–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25928581>.
- Pandey, A. V. & Flück, C.E., 2013. NADPH P450 oxidoreductase: Structure, function, and pathology of diseases. *Pharmacology and Therapeutics*, 138(2), pp.229–254. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.010>.
- Paz-Maldonado, M.T. et al., 2013. Proteomic and transcriptional analyses of genes differentially expressed in *Giardia duodenalis* clones resistant to albendazole. *Infection, Genetics and Evolution*, 15, pp.10–17. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.021>.
- Pérez, P.F. et al., 2001. Inhibition of *Giardia intestinalis* by Extracellular Factors from *Lactobacilli*: An in Vitro Study. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3–12), pp.5037–5042.
- Plutzer, J., Ongerth, J. & Karanis, P., 2010. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213(5), pp.321–333. Available at:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.06.005>.
- Prucca, C.G. et al., 2008. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*, 456(7223), pp.750–754. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature07585>.
- Prucca, C.G., Rivero, F.D. & Luján, H.D., 2011. Regulation of Antigenic Variation in *Giardia lamblia*. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), pp.611–630. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-090110-102940>.
- Pyrh, J. et al., 2014. *Giardia intestinalis* incorporates heme into cytosolic cytochrome b5. *Eukaryotic Cell*, 13(2), pp.231–239.
- Quihui-Cota, L. & Morales-Figueroa, G.G., 2012. Persistence of intestinal parasitic infections during the national de-worming campaign in schoolchildren of northwestern Mexico: A cross-sectional study. *Annals of Gastroenterology*, 25(1), pp.57–60.
- R Core Team, 2017. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*.
- Rafferty, S. et al., 2010. *Giardia lamblia* encodes a functional flavohemoglobin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(3), pp.347–351. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.073>.
- Rafferty, S.P. & Dayer, G., 2015. Heme proteins of *Giardia intestinalis*. *Experimental Parasitology*, 159, pp.13–23. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2015.08.001>.
- Rawden, H.C. et al., 2000. Relative contribution of cytochromes P 450 and flavin containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 49(4), pp.313–322. Available at: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2125.2000.00170.x>.
- Rosignol, J.F., 2010. Cryptosporidium and Giardia: Treatment options and prospects for new drugs. *Experimental Parasitology*, 124(1), pp.45–53. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.07.005>.
- Roxström-Lindquist, K. et al., 2006. *Giardia* immunity - An update. *Trends in Parasitology*, 22(1), pp.26–31.
- Ryan, U. & Cacciò, S.M., 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*, 43(12–13), pp.943–956. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.001>.
- Salzman, N.H., Underwood, M.A. & Bevins, C.L., 2007. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Seminars in Immunology*, 19(2), pp.70–83.
- SCHNEIDER, J., 1961. [Treatment of giardiasis (lambliasis) by metronidazole]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales*, 54, pp.84–95.
- Shimada, T., Mernaugh, R.L. & Guengerich, F.P., 2005. Interactions of mammalian cytochrome P450, NADPH-cytochrome P450 reductase, and cytochrome b5 enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 435(1), pp.207–216.
- Sievers, F. et al., 2014. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(1), pp.539–539. Available at: <http://msb.embopress.org/cgi/doi/10.1038/msb.2011.75>.
- Singer, S.M. & Nash, T.E., 2000. The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. *The Journal of infectious diseases*, 181, pp.1510–1512.
- Solaymani-Mohammadi, S. & Singer, S.M., 2010. *Giardia duodenalis*: The double-edged sword of immune responses in giardiasis. *Experimental Parasitology*, 126(3), pp.292–297. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.014>.
- Stark, D. et al., 2009. Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), pp.634–650.
- Stiborová, M. et al., 2016. NADH:Cytochrome b5 Reductase and Cytochrome b5 Can Act as Sole Electron Donors to Human Cytochrome P450 1A1-Mediated Oxidation and

- DNA Adduct Formation by Benzo[a]pyrene. *Chemical Research in Toxicology*, 29(8), pp.1325–1334.
- Svärd, S.G., Hagblom, P. & Palm, J.E.D., 2003. Giardia lamblia -- a model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS microbiology letters*, 218(1), pp.3–7.
- Tian, H.F., Chen, B. & Wen, J.F., 2010. Giardiasis, drug resistance, and new target discovery. *Infect Disord Drug Targets*, 10(4), pp.295–302.
- Di Tommaso, P. et al., 2011. T-Coffee: A web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2), pp.13–17.
- Torres Pazmiño, D.E. et al., 2010. Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *Journal of Biotechnology*, 146(1–2), pp.9–24.
- Tsirigos, K.D. et al., 2015. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic Acids Research*, 43(Web Server issue), pp.W401–W407. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4489233/>.
- Ullmann, B.D. et al., 2004. Inducible Defense Mechanism against Nitric Oxide in Candida albicans Inducible Defense Mechanism against Nitric Oxide in Candida albicans †. *American Journal of Infectious Disease*, 3(3), pp.715–723.
- Upcroft, J. et al., 1996. Albendazole resistance in Giardia is correlated with cytoskeletal changes but not with a mutation at amino acid 200 in beta-tubulin. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 2(3), pp.303–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9158790>.
- Upcroft, J. & Upcroft, P., 1998. My favorite cell: Giardia. *BioEssays*, 20(3), pp.256–263.
- Upcroft, J.A., Upcroft, P. & Boreham, P.F., 1990. Drug resistance in Giardia intestinalis. *Int J Parasitol*, 20(4), pp.489–496. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2210942.
- Upcroft, P. & Upcroft, J. a, 2001. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. *Clin Microbiol Rev*, 14(1), pp.150–164.
- Velík, J. et al., 2005. Albendazole repeated administration induces cytochromes P4501A and accelerates albendazole deactivation in mouflon (Ovis musimon). *Research in Veterinary Science*, 78(3), pp.255–263.
- Watkins, R.R. & Eckmann, L., 2014. Treatment of giardiasis: Current status and future directions topical collection on intra-abdominal infections, hepatitis, and gastroenteritis. *Current Infectious Disease Reports*, 16(2).
- Yang, J. et al., 2015. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nat Methods*, 12(1), pp.7–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3213>.
- Yoshida, N., Tyler, K.M. & Llewellyn, M.S., 2011. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends in Parasitology*, 27(10), pp.459–466. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.06.006>.
- Zhang, Y. & Skolnick, J., 2005. TM-align: A protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Research*, 33(7), pp.2302–2309.
- Zhao, X.J. et al., 1996. Function and Expression of Flavohemoglobin in Saccharomyces cerevisiae. EVIDENCE FOR A ROLE IN THE OXIDATIVE STRESS RESPONSE. *Journal of Biological Chemistry*, 271(41), pp.25131–25138.
- Zhong, H.L. et al., 1986. Albendazole in nematode, cestode, trematode and protozoan (Giardia) infections. *Chinese medical journal*, 99(11), pp.912–915.