



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Estudio inmunoquímico de la cascada de
señalización de apoptosis de *Giardia intestinalis*:
Énfasis en la interacción GCAD-IGCAD, caspasa-3 y
flipasas”**

TESIS

QUE PRESENTA

MC. MARÍA CRISTINA VILLA MEDINA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

DIRECTOR

DR. HÉCTOR SAMUEL LÓPEZ MORENO

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, MÉXICO A MAYO DE 2024.



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



Este trabajo de Tesis doctoral fue realizado en el **Laboratorio de Biomedicina Molecular** perteneciente a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. La investigación se realizó bajo la dirección del **Dr. Héctor Samuel López Moreno** y contó con la asesoría académica de los doctores: *Dr. Julio Montes Ávila, Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina, Dra. Carolina del Carmen Murúa López y Dr. José Geovanni Romero Quintana*. Durante la realización de este trabajo se contó con la beca de doctorado otorgada por CONAHCYT y del financiamiento de la Red Temática de Biotecnología Biomédica-PRODEP-SEP, donde participan los doctores *Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete* del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV-IPN, campus Zacatenco y *Dr. Roberto Rosales Reyes* de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

DEDICATORIA

“A Natalie por ser mi faro de luz en la oscuridad y a Guillermo por acompañarme en cada paso”.

AGRADECIMIENTOS

A **CONAHCYT** por la beca otorgada, a la **Universidad Autónoma de Sinaloa** por abrirme las puertas de la institución, así como al **Posgrado en Ciencias Biomédicas** por aceptarme y apoyarme durante mi estancia, por brindarme conocimientos que me serán siempre útiles y por incentivar me en el camino de la investigación.

A mis asesores académicos la **Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina**, la **Dra. Carolina del Carmen Murúa López**, el **Dr. Julio Montes Ávila** y el **Dr. José Geovanni Romero Quintana** gracias por toda su ayuda y consejos.

A la **Dra. Carolina del Carmen Murúa López** y a la **Dra. Kenia López López** gracias por todos los conocimientos y el ejemplo que siempre me dieron, por creer en mí y brindarme su amistad. Por compartir momentos difíciles, así como momentos bonitos, las quiero mucho.

Quiero agradecer especialmente a mi director de tesis el **Dr. Héctor Samuel López Moreno** quien siempre se me ha dado su ejemplo y aportado conocimientos. Mas allá de ello, gracias por la empatía que tuvo conmigo, gracias por darme la oportunidad de formar parte de su gran familia el Laboratorio de Biomedicina Molecular, por su amistad y consejos que son invaluable para mí.

A mis compañeros que, a lo largo de estos años en el **Laboratorio de Biomedicina Molecular**, he compartido muchísimos momentos de aprendizaje y crecimiento profesional, además de compañerismo y amistad. Especialmente a la **MC. Ana Cecilia Quezada** gracias siempre porque durante tu estancia compartiste ideas y tu experiencia que fue muy enriquecedora para mí, además de tus detalles y tus bonitas palabras de aliento y tu apoyo incondicional, sigo orgullosa de ti. Al **MC. Ulises Vega** muchas gracias por toda tu ayuda y paciencia al compartir ciertas técnicas en el laboratorio, gracias por tu apoyo y buenos consejos de siempre, sé que lograrás todo lo que te propongas. A la **MC. Priscilla González**, gracias por todos los momentos que pudimos compartir, sin duda nos tocaron tiempos difíciles no pude haber tenido mejor compañera de pandemia gracias por tu compañerismo y amistad. A la **LBG. Marla Daniela Mendoza Villanueva** por su amistad y compañerismo, los detalles

bonitos y los aprendizajes recibidos. Al **cDr. David González Núñez** gracias por la paciencia al explicarme ciertas técnicas, por el tiempo y aprendizajes mutuos que pudimos compartir, el compañerismo y la amistad. A mis compañeras que hicieron estancias cortas pero enriquecedoras en el LBM **Dra. Karime Garduño Félix** y **Dra. Berenice González** gracias por los aprendizajes recibidos y la reciprocidad.

A mis padres **Victoria Medina** y **José Primo Villa** gracias por la vida, por permitirme llegar a esta etapa, por cuidarme a la distancia, aconsejarme y abrazarme con su cariño y amor desde siempre, los adoro con la vida.

A mis hermanos **Jesús, Bernardo, Yadira, Filo, Yani, José, Alejandro, Genaro y Salvador** los quiero siempre.

A mis amigas que son como mis hermanas **IBT. Diana Gaytán Vázquez, LE. María de Guadalupe Olague Medrano, IBT. Floricel Lara Domínguez** y **Lic. Ruth Bibiana Hernández Estrada** gracias por permanecer todo este tiempo.

Gracias a mi pequeña familia a la que con orgullo llamo hogar **Guillermo y Natalie** gracias por todo y por tanto, los amo con mi vida. Sin ustedes nada sería.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | 11 |
| ÍNDICE DE CUADROS..... | 13 |
| I. RESUMEN | 1 |
| II. ABSTRACT | 2 |
| III. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| IV. ANTECEDENTES | 6 |
| 4.1 APOPTOSIS..... | 6 |
| 4.1.1 Vías de señalización de la apoptosis..... | 8 |
| 4.1.2 Fragmentación del DNA..... | 14 |
| 4.1.3 Participación de las flipasas durante muerte celular tipo apoptosis..... | 15 |
| 4.1.4 Proteasas del clan CD | 17 |
| 4.2 APOPTOSIS EN PROTOZOARIOS | 21 |
| 4.3 APOPTOSIS EN <i>G. INTESTINALIS</i> | 22 |
| V. JUSTIFICACIÓN..... | 26 |
| VI. HIPÓTESIS | 27 |
| VII. OBJETIVOS..... | 28 |
| 7.1 OBJETIVO GENERAL | 28 |
| 7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 28 |
| VIII. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 29 |
| 8.1 ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN GCAD-IGCAD <i>IN SILICO</i> | 29 |
| 8.2 PURIFICACIÓN DE IGCAD..... | 29 |
| 8.3 PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO POLICLONAL ANTI-IGCAD | 30 |
| 8.4 DETECCIÓN DE IGCAD POR <i>WESTERN BLOT</i> | 31 |
| 8.5 ENSAYO <i>PULL DOWN</i> | 31 |
| 8.6 IDENTIFICACIÓN <i>IN SILICO</i> DE CASPASA-3 Y FLIPASAS..... | 33 |
| 8.7 DISEÑO DE INICIADORES ESPECÍFICOS..... | 33 |
| 8.8 IDENTIFICACIÓN DE CASPASA-3-LIKE DE <i>G. INTESTINALIS</i> | 34 |
| 8.9 ACTIVIDAD DE FLIPASAS..... | 36 |
| IX. RESULTADOS..... | 37 |
| 9.1 ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN GCAD-IGCAD <i>IN SILICO</i> | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 9.2 PURIFICACIÓN DE RIGCAD..... | 40 |
| 9.3 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE IGG A-IGCAD AG-ESPECÍFICOS | 42 |
| 9.4 EVALUACIÓN INMUNOQUÍMICA DE RIGCAD | 44 |
| 9.5 ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN GCAD-IGCAD <i>IN VITRO</i> | 45 |
| 9.6 IDENTIFICACIÓN <i>IN SILICO</i> DE CASPASAS-LIKE DE <i>G. INTESTINALIS</i> | 47 |
| 9.7 ANÁLISIS DE DOMINIOS CONSERVADOS DE CASPASAS-LIKE IDENTIFICADAS..... | 49 |
| 9.8 DISEÑO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA CASPASAS-LIKE DE <i>G. INTESTINALIS</i> | 55 |
| 9.10 IDENTIFICACIÓN INMUNOQUÍMICA DE LAS CASPASAS 3-LIKE | 59 |
| 9.11 IDENTIFICACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LAS CASPASAS-3-LIKE | 61 |
| 9.12 CLONACIÓN DE LAS PROTEÍNAS TIPO CASPASA-3 DE <i>G. INTESTINALIS</i> | 63 |
| 9.13 DNA RECOMBINANTE DE CASPASA-3, <i>SEPARASA</i> Y LA <i>TAGPI</i> | 65 |
| 9.14 TRANSFORMANTES DE LOS DOMINIOS CATALÍTICOS DE CASPASA-3, <i>SEPARASA</i> Y DE LA <i>TAGPI</i> DE <i>G. INTESTINALIS</i> | 67 |
| 9.15 IDENTIFICACIÓN <i>IN SILICO</i> FLIPASAS DE <i>G. INTESTINALIS</i> | 74 |
| 9.16 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS FLIPASAS DE <i>G. INTESTINALIS</i> | 76 |
| 9.17 MODELADO 3D DE LAS FLIPASAS DE <i>G. INTESTINALIS</i> | 78 |
| 9.18 CLONACIÓN Y EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LA FLIPASA IA DE <i>G. INTESTINALIS</i> | 82 |
| 9.19 PURIFICACIÓN DE LA FLIPASA IA | 86 |
| X. DISCUSIÓN..... | 88 |
| 10.1 EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN IGCAD.GCAD <i>IN SILICO</i> E <i>IN VITRO</i> | 88 |
| 10.2 IDENTIFICACIÓN <i>IN SILICO</i> E <i>IN VITRO</i> DE PROTEÍNAS TIPO CASPASA EN <i>G. INTESTINALIS</i> | 90 |
| 10.3 IDENTIFICACIÓN <i>IN SILICO</i> E <i>IN VITRO</i> DE FLIPASAS DE <i>G. INTESTINALIS</i> | 93 |
| XI. CONCLUSIONES..... | 96 |
| 11.1 CONCLUSIÓN GENERAL..... | 96 |
| 11.2 CONCLUSIONES ESPECÍFICAS | 96 |
| XII. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO | 97 |
| XIII. BIBLIOGRAFÍA..... | 98 |

Página

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Evidencia de la apoptosis celular | 7 |
| 2 | Vías de señalización de la apoptosis..... | 13 |
| 3 | Peptidasas del clan CD..... | 20 |
| 4 | <i>CAD</i> de <i>G. intestinalis</i> (GCAD)..... | 24 |
| 5 | Identificación de IGCAD..... | 25 |
| 6 | Interacción GCAD-IGCAD..... | 38 |
| 7 | Principales enlaces entre GCAD-IGCAD..... | 39 |
| 8 | Purificación de rIGCAD..... | 41 |
| 9 | Niveles de IgG específicos α -IGCAD | 43 |
| 10 | Evaluación de la interacción GCAD-IGCAD <i>in vitro</i> | 46 |
| 11 | Estructura 3D de la separasa de <i>G. intestinalis</i> | 51 |
| 12 | Estructura 3D de la Transaminasa de anclaje GPI de <i>G. intestinalis</i> | 54 |
| 13 | Clonación <i>in silico</i> del dominio catalítico tipo caspasa de la separasa | 57 |
| 14 | Clonación <i>in silico</i> del dominio catalítico tipo caspasa de la <i>TAGPI</i> | 58 |
| 15 | Detección de las proteínas tipo caspasa-3 en <i>G. intestinalis</i> | 60 |
| 16 | DNA genómico de <i>G. intestinalis</i> | 62 |
| 17 | Clonación de las regiones catalíticas tipo caspasa de la separasa y de la transaminasa de anclaje GPI (<i>TAGPI</i>) de <i>G. intestinalis</i> | 64 |
| 18 | Construcción recombinante de las regiones catalíticas tipo caspasa de la separasa y de la transaminasa de anclaje GPI (<i>TAGPI</i>) | 66 |
| 19 | Transformantes con el gen de la <i>separasa</i> | 68 |
| 20 | Producción recombinante del dominio catalítico tipo caspasa de la separasa | 70 |
| 21 | Transformantes con el gen <i>TAGPI</i> | 71 |
| 22 | Producción recombinante del dominio catalítico tipo caspasa de la <i>TAGPI</i> Gi... | 74 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 23 | Análisis filogenético de flipasas de <i>G. intestinalis</i> | 75 |
| 24 | Análisis estructural de los dominios conservados de la flipasas de <i>G. intestinalis</i> | 81 |
| 25 | Comparación estructural de flipasas de <i>G. intestinalis</i> | 84 |
| 26 | Clonación y construcción recombinante de la Flipasa 1A de <i>G. intestinalis</i> | 85 |
| 27 | Expresión piloto recombinante de la Flipasa IA | 87 |
| 28 | Purificación Flipasa IA | 89 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | Cuadro | Página |
|----------|--|---------------|
| 1 | Identificación <i>in silico</i> de caspasas de <i>G. intestinalis</i> | 51 |
| 2 | Comparación de la estructura 3D predicha <i>in silico</i> de la separasa de <i>G. Intestinalis</i> con modelos 3D de separasas cristalizadas..... | 55 |
| 3 | Comparación de la estructura 3D predicha <i>in silico</i> de TAGPI de <i>G. Intestinalis</i> con modelos 3D de otras peptidasas del clan CD cristalizadas..... | 55 |
| 4 | Diseño de los iniciadores específicos para la identificación de las caspasas- <i>like</i> | 58 |
| 5 | Identificación <i>in silico</i> de flipasas de <i>G. intestinalis</i> | 78 |

I. RESUMEN

Giardia intestinalis es un eucarionte primitivo, en el cual la información sobre el proceso de apoptosis es limitada. Nuestro grupo de investigación identificó la DNasa activada por caspasas de *Giardia intestinalis* (GCAD), así como su inhibidor IGCAD. En metazoarios se ha observado que caspasa-3 (casp-3) escinde al inhibidor de CAD (ICAD), esto libera a CAD, quien efectúa la fragmentación del DNA. Igualmente, casp-3 escinde a las flipasas ATP11A y ATP11C durante la apoptosis, lo que promueve la exposición de la fosfatidilserina (PS). En este escenario, en el presente trabajo se realizó un estudio inmunológico de la cascada de señalización de apoptosis de *G. intestinalis* iniciando con la purificación de rIGCAD, se obtuvo una proteína de 43 kDa. rIGCAD fue utilizada para la producción de anti-IGCAD que reconocieron la proteína recombinante y la proteína en el lisado de *G. intestinalis*. El anti-IGCAD nos permitió observar la interacción IGCAD-GCAD *in vitro*. Para determinar si la activación de GCAD y desactivación de flipasas es mediada en *G. intestinalis* por una proteasa similar a las caspasas se realizó la búsqueda de ortólogos. Se identificaron *in silico* dos proteínas con el dominio catalítico tipo caspasa, la separasa y la transaminasa de anclaje GPI de *G. intestinalis* (TAGPIGi). Además, se realizó una identificación inmunológica con el anti-caspasa-3 de *H. sapiens* una proteína con alrededor de 50 kDa y otra con un peso molecular aproximado al de la separasa de *G. intestinalis* (~179 kDa). Estas proteínas han sido pobremente caracterizadas en diversos protozoarios parásitos, por lo que en este trabajo se realizó la identificación y clonación de las regiones de 654 pb de la separasa y 729 pb de TAGPIGi. Asimismo, en la búsqueda de ortólogos de flipasas de *G. intestinalis* encontramos tres flipasas IA y 2 IIB, que contienen dominios estructurales característicos de flipasas, en los que destacan los sitios diana para caspasas. Además, se realizó la clonación de la región de 621 pb que consiste en el dominio A de la flipasa IA de *G. intestinalis* y posteriormente se purificó la proteína de 23 kDa. La clonación y producción recombinante de las proteínas correspondientes permitirá continuar con el estudio de la cascada de señalización de apoptosis en *G. intestinalis*.

(Palabras clave: *Giardia*, GCAD-IGCAD, caspasas, flipasas.)

II. ABSTRACT

Giardia intestinalis is a primitive eukaryote, whose information on the apoptosis process is limited. Our research group identified the caspase-activated DNase from *Giardia intestinalis* (GCAD), as well as its inhibitor IGCAD. In metazoans, it has been observed that caspase 3 (casp-3) cleaves the CAD inhibitor (ICAD), which releases CAD, which carries out DNA fragmentation. Likewise, casp-3 cleaves the flippases ATP11A and ATP11C during apoptosis, promoting phosphatidylserine exposure (PS). In this scenario, in the present work an immunochemical study of the apoptosis signaling cascade of *G. intestinalis* was carried out, starting with the purification of rIGCAD, a 43 kDa protein was obtained. rIGCAD was used to produce anti-IGCAD that recognized the recombinant protein and the protein in the *G. intestinalis* lysate. Anti-IGCAD allowed us to observe the IGCAD-GCAD interaction *in vitro*. To determine whether the activation of GCAD and deactivation of flippases is mediated in *G. intestinalis* by a caspase-like protease, a search for orthologs was performed. Two proteins with the caspase-like catalytic domain were identified *in silico*, *G. intestinalis* GPI-anchoring transaminase (TAGPIGi) and separase. In addition, an immunochemical identification was carried out with anti-caspase 3 from *H. sapiens*, a protein with around 50 kDa, and another with a molecular weight close to that of *G. intestinalis* separase (~179 kDa). These proteins have been poorly characterized in various parasitic protozoans, so the identification and cloning of the 654 bp regions of separase and 729 bp of TAGPIGi were carried out in this work. Likewise, in the search for flippase orthologs from *G. intestinalis*, we found three flippases IA and 2 IIB, that contain structural domains characteristic of flippases, and the target sites for caspases stand out. In addition, the 621 bp region consisting of domain A of *G. intestinalis* flippase IA was cloned and the 23 kDa protein was subsequently purified. The cloning and recombinant production of the corresponding proteins will allow us to continue the study of the apoptosis signaling cascade in *G. intestinalis*.

(Keywords: Giardia, GCAD-IGCAD, caspases, flippases.)

III. INTRODUCCIÓN

G. intestinalis también denominada como *G. duodenalis* o *G. lamblia* es un protozoo parásito flagelado, causante de la infección gastrointestinal parasitaria (giardiasis) más común, con un estimado de 280 millones de casos sintomáticos al año (Faria y col., 2023). Taxonómicamente se clasifica con base en estudios genéticos, morfológicos y bioquímicos, *G. intestinalis* pertenece a la familia Hexamitidae en el orden Diplomonadida bajo el filo Sarcomastigophora (Ryan y col., 2021). Se conocen 8 a 11 genotipos y subgenotipos filogenéticamente distintos representados con las letras mayúsculas A-H de los cuáles solo A y B se han descrito que parasitan al ser humano (Wielinga y col., 2023). Recientemente se han encontrado los genotipos E y F en Australia y Eslovenia en seres humanos (Fusaro y col., 2022). Desde el año 2004, la giardiasis fue incluida como una “enfermedad desatendida” por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Šmigová y col., 2022). La giardiasis afecta a personas de todas las edades, sin embargo, la tasa de infección es significativamente más alta en niños, con una prevalencia mayor al 30% en niños menores de 10 años en países en vías de desarrollo y en un rango del 2 al 7% en países desarrollados (Belkessa y col., 2021). En México en el año 2023 se registraron 1872 casos, de los cuales 82 se registraron en Sinaloa equivalentes al 4.38%, hasta la semana 18 del presente año de acuerdo con el boletín epidemiológico nacional se han registrado 1674 casos, de los cuales 60 correspondieron al estado de Sinaloa, lo que representa el 3.58% (SSA, 2024).

Las infecciones crónicas son comunes, sin embargo, el 50% de las infecciones se presentan de manera asintomática (Connors y col., 2021). Las manifestaciones

clínicas de la infección son usualmente asociadas con diarrea acuosa, mala absorción intestinal de nutrientes náusea, dolor epigástrico y una profunda pérdida de peso (10 a 20 % del peso corporal original) (Adam, 2021). La giardiasis aguda puede causar disfunción de la barrera intestinal, incluyendo disrupción de la microbiota, la capa mucosa, las uniones celulares y la inhibición de proteasas de la membrana del borde en cepillo de las células epiteliales (Grüttner y col., 2023).

G. intestinalis presenta dos estadios, uno de ellos es el quiste, el agente infectante; y el otro es el trofozoíto, el estadio morfológico activo y causante de la enfermedad (Benchimol et al., 2022). La parasitosis se adquiere por la ingesta de agua, alimentos contaminados con quistes viables del parásito y por el contacto de persona a persona (Dixon, 2021). El ciclo de vida inicia tras la ingestión de quistes viables con una dosis infectiva de al menos 10, que transitan a través del tracto digestivo, posteriormente ocurre la exquistación que comienza en el estómago y se completa en el duodeno (Adam, 2021). Los trofozoítos resultantes se reproducen asexualmente mediante fisión binaria longitudinal, la mayoría de ellos alcanzan el enquistado en el colon y eventualmente salen del hospedero y son diseminados en las heces al ambiente completando su ciclo de vida (Rojas-López y col., 2022).

En *G. intestinalis* se ha observado que bajo el tratamiento con diferentes antiparasitarios comerciales o en experimentación el parásito sufre cambios morfológicos consistentes con muerte celular regulada tipo apoptosis de eucariontes superiores, una de estas características es la exposición de la fosfatidilserina (PS, por sus siglas en inglés) (Aguilar-Díaz y col., 2017; Hernández Atehortua y col., 2015), sin embargo, aún no se ha demostrado que proteínas efectoras participan en dicho

proceso. Debido a ello nuestro grupo de investigación se ha abocado en el estudio de la apoptosis en *G. intestinalis*, encaminado el estudio a la ruta de apoptosis extrínseca por tratarse de un organismo amitocondriado. Se identificó inicialmente la endonucleasa dependiente de la activación por caspasas (en inglés CAD) mediante inmunoproteómica a la que se denominó “*Giardia intestinalis* CAD” (GCAD) (Durán-Pérez., 2014 Tesis maestría), así como su inhibidor IGCAD (Villa-Medina., 2016 Tesis maestría). En eucariotas superiores se ha observado que la cisteína proteasa denominada caspasa-3, una de las caspasas ejecutoras, escinde al inhibidor de CAD en dos sitios conformados por aspartato, esto libera a la endonucleasa, quien forma un homodímero activo se transloca al núcleo induciendo la fragmentación del DNA y las etapas finales de la condensación de la cromatina apoptótica (Araya y col., 2021). Asimismo, en eucariotas superiores la caspasa-3 escinde a Flipasas de fosfolípidos denominadas como ATP11A y ATP11C y a la escramblasa XKR8, lo que evoca la exposición de fosfatidilserina o PS (Furuta & Zhou, 2023). Por consiguiente, al evidenciar la exposición de PS se hipotetiza que existan flipasas o escramblasas llevando a cabo dicha actividad durante la apoptosis en *G. intestinalis* siendo potenciales moléculas blanco de proteasas con actividad similar a las caspasas. Por tanto, en el presente proyecto se propone evidenciar la interacción de GCAD e IGCAD, así como la identificación de flipasas de fosfolípidos que participan en la muerte celular regulada durante la exposición de la PS de *G. intestinalis* y finalmente la búsqueda *in silico* e *in vitro* de una proteasa con actividad similar a las de las caspasas.

IV. ANTECEDENTES

4.1 Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular no inflamatorio o silente que es estrechamente regulado por una serie de eventos moleculares y bioquímicos dependientes de energía (Kesavardhanay col., 2020; Nagata, 2018b; Sakkas & El-fakahany, 2018). Este tipo de muerte celular permite a la célula cometer suicidio y representa un evento crítico para la supervivencia de los organismos (Larisch, 2021). La apoptosis depende de una compleja red de interacciones entre moléculas pro y anti apoptóticas que responden a estímulos tan diversos como daños en el DNA, cambios en la osmolaridad, choque térmico, citocinas, radiación, ceramidas, estrés oxidativo e inflamación y está regulado por 2 familias de proteínas principalmente: una de ellas son las caspasas y la otra, son proteínas de la familia de Bcl-2 (del inglés *B-Cell Lymphoma 2*) que actúan de manera coordinada (Bock & Riley, 2023).

El proceso de la apoptosis consta de varias etapas, en donde son distinguibles las características morfológicas tales como, la condensación de la cromatina nuclear, la fragmentación del DNA, la formación de vesículas en la membrana, la división del contenido celular en cuerpos apoptóticos, la reducción del volumen celular y la exposición de la PS (Battistelli & Falcieri, 2020). De esta manera las células apoptóticas son caracterizadas por profunda reorganización del citoesqueleto y la digestión mediada por caspasas asegura el desmantelamiento apropiado de las células moribundas durante el proceso (Kesavardhana y col., 2020).

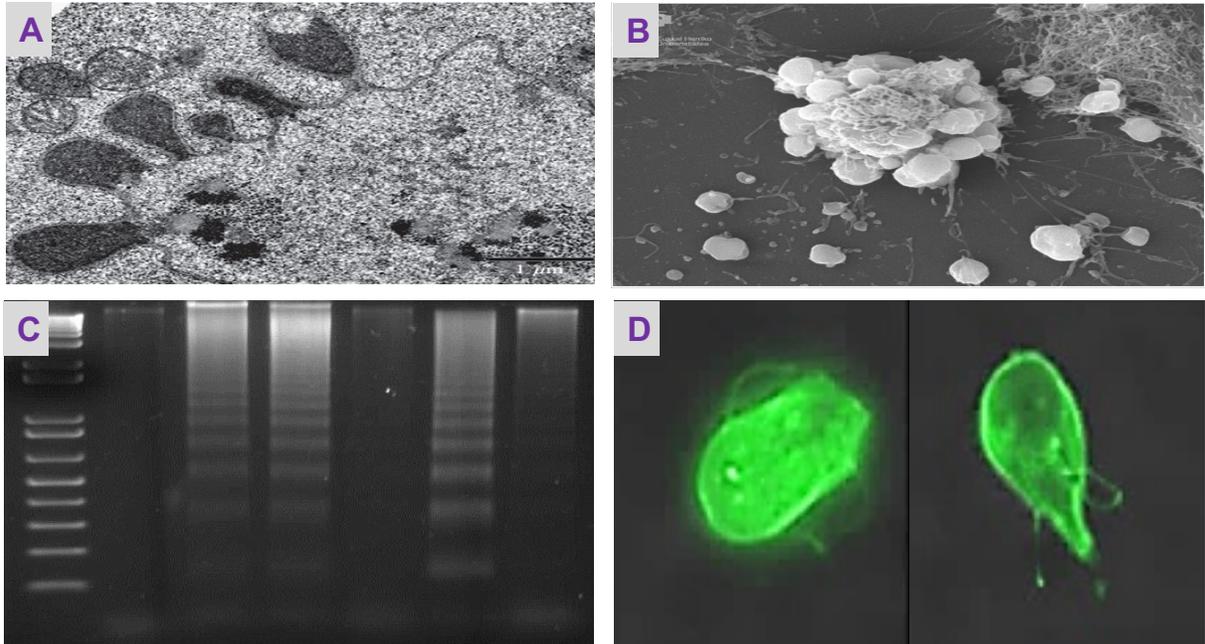


Figura 1. Evidencia de la apoptosis celular. A) Condensación de la cromatina. B) Formación de cuerpos apoptóticos. C) Fragmentación del DNA en escalera D) Tinción de trofozoítos de *G. intestinalis* tratados con curcumina 3mM y teñidos con Anexina V para la detección de fosfatidilserina (PS) (Nagata & Segawa, 2021; Durán-Pérez, Tesis 2014).

4.1.1 Vías de señalización de la apoptosis

Para asegurar la homeostasis tres vías de señalización regulan la apoptosis, una vía extrínseca del receptor de muerte, una vía intrínseca mitocondrial y la vía de las granzimas/perforinas (Ahsan y col., 2024). La vía extrínseca es inducida al integrar una señal extracelular a la maquinaria de transducción de señales internas. Esta vía es promovida por receptores “de muerte” pertenecientes a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral alfa (TNFR-1), en los que se incluyen TNF-R1, CD95, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR3, y DR6 que se activan al unirse a sus respectivos ligandos TNF, CD95L, TRAIL, y TL1A (Arif y col., 2020). Entre los receptores de muerte celular más estudiados se encuentra el ligando de Fas (FasL) que se une a Fas, y TNF α que se une a TNFR-1, los cuales inducen la formación de un complejo de señalización inductor de muerte (DISC, del inglés, *Death-Inducing Signalling Complex*) (Levoyn y col., 2020). Cuando estos receptores son activados por su ligando, ocurren tres pasos distintivos: la trimerización del receptor; el reclutamiento de proteínas intracelulares asociadas al receptor como FADD (del inglés, *Fas-Associating Protein with Death Domain*) y la proteína que se une a TNFR-1, TRADD (del inglés, *TNF-Receptor Associated Death Domain*), que funcionan como adaptadores, y la iniciación de la activación que favorece el reclutamiento de la caspasa 8 para, finalmente, activar la caspasa-3 (Seyrek y col., 2020).

La activación de la muerte por la vía extrínseca se puede regular mediante la unión de proteínas que también contienen dominios DED (del inglés, *Death Effector Domain*), y compiten con la unión de las procaspasas a FADD como la proteína c-FLIP

(del inglés, *FADD-Like ICE Inhibitory Protein*), que contiene dos dominios DED (Jiménez-García & Merchant-Larios, 2003; Nagata & Tanaka, 2017).

La segunda vía es denominada como la vía intrínseca, e involucra la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria mediada por BAX y BAK, ambos miembros de la familia Bcl-2 (del inglés, *B-Cell Lymphoma 2*) proapoptótica, esta vía intrínseca es activada por estímulos como el daño del DNA, lesiones citotóxicas o estrés oxidativo (Kashyap y col., 2021; Qian y col., 2022). La permeabilización de la membrana mitocondrial conduce a la liberación del citocromo C, el reclutamiento y la activación de la procaspasa-9 (forma inactiva de la caspasa), que en conjunto con el factor 1 activador de la proteasa de la apoptosis o proteína APAF1 (del inglés, *Apoptosis Protease Activating Factor 1*), forman un complejo heterotrimérico denominado apoptosoma (Kashyap y col., 2021). La activación de la procaspasa-9 favorece la activación de las caspasas efectoras 3, 6 y 7 (Kashyap y col., 2021). Los miembros de la familia Bcl-2 son considerados los principales reguladores de la apoptosis mitocondrial, por lo que el equilibrio de las proteínas Bcl-2 pro y antiapoptóticas determina el destino de la célula (Qian y col., 2022). La familia de las proteínas Bcl-2 está dividida en tres grupos: las antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, y BFL-1/A1), proapoptóticas (Bax, Bak, y Bok) y las proapoptóticas sólo con el dominio BH3 (Bad, Bid, Bik, Bim, BMF, HRK, Noxa, y PUMA) (White, 2023). Estos miembros Bcl-2 antiapoptóticos comparten cuatro dominios de homología Bcl-2 (BH1-BH4), y su localización subcelular es en el citoplasma al inhibir la liberación del citocromo C (Hussar, 2022). En el ser humano han observado en diferentes tejidos del cuerpo y su expresión diferencial dependiendo la línea celular, por ejemplo, la proteína

Bcl-2 en células troncales epiteliales de riñón, en linfocitos B y Bcl-XL en progenitores eritroides (Qian y col., 2022). Las proteínas Bcl-2 proapoptóticas pueden presentar los cuatro dominios BH, las más destacadas son BAX y BAK como se mencionó, además de BOK (del inglés, *Bcl-2-Associated Ovarian Killer*) que se localiza en células normales en el retículo endoplasmático, el cual regula sus niveles al ser menos estable que BAX y BAK (Ivanova y col., 2020). Si aumenta la expresión de BOK, la permeabilización de la mitocondria se acelera (Naim & Kaufmann, 2020). Otro miembro proapoptótico es Bcl-XS, el cuál es un regulador reverso de Bcl-2 y Bcl-XL y se localiza en la mitocondria, además presenta los dominios BH3 y BH4 (Qian y col., 2022).

Las proteínas proapoptóticas con el dominio BH3 pueden ser activadores tales como BID (del inglés, *BH3-Interacting-Domain Death Agonist*) y BIM (*Bcl-2 Interacting Mediator of cell death*) cuya función es unirse directamente a BAX y BAK al conectarse con su región hidrofóbica, lo que conduce a su cambio conformacional y activación (Alway, 2021; Roufayel y col., 2022). Por el contrario, las proteínas BH3 sensibilizadoras (BIK, BMF, BAD, NOXA y PUMA) antagonizan la acción de los miembros Bcl-2 antiapoptóticos sin unirse directamente a BAX y BAK impidiendo su unión a efectores activos (Roufayel y col., 2022). La vía extrínseca puede interceptar la vía intrínseca a través de la activación por escisión de la proteína BID proapoptótica mediada por caspasa-8 (McElhinney y col., 2023). La forma truncada C-terminal de BID (tBID) se transloca a la mitocondria y promueve la activación adicional de las caspasas a través de BAX y BAK (caspasa-9 y las caspasas efectoras caspasa-3, -6 y -7) (Kim y col., 2024).

La función de las caspasas puede ser regulada mediante las proteínas inhibidoras de la apoptosis IAPs (del inglés, *Inhibitor of Apoptosis Proteins*), tales como XIAP, el cual se une y neutraliza ciertas caspasas (caspasa-9 y caspasa-3) (Kim y col., 2024). Esta acción inhibitoria de IAPs puede ser antagonizada por la unión de SMAC/DIABLO (del inglés, *Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase/Direct IAP Binding Protein with Low pI*) quien es liberada de la mitocondria después de la activación de BAX y/o BAK (Kansal y col., 2023).

La tercer vía de apoptosis está mediada por las funciones efectoras de los linfocitos T citotóxicos y los linfocitos NK (del inglés, *Natural Killer*) los cuales inducen apoptosis mediante la secreción de perforina, molécula transmembrana que forma poros e induce liberación por exocitosis de gránulos citoplásmicos (Hay & Slansky, 2022). Los linfocitos citotóxicos también liberan potentes proteasas como granzima B (GraB) y granzima A (GraA), proteasas séricas capaces de fragmentar proteínas en residuos aspartato y de activar determinadas caspasas además de escindir directamente a ICAD (del inglés, *Inhibitor of Caspase-Activated DNase*) (McKenzie y col., 2022). Asimismo, los gránulos contienen otras proteasas, incluidas catepsinas, que pueden activar otras proteasas lisosomales y granzulina que puede destruir las membranas intracelulares de algunos microbios (Hay & Slansky, 2022). Dado que GraB puede procesar y activar caspasa 10, 8, 7 y 3 *in vitro* e *in vivo*, puede iniciar la apoptosis activando caspasas río arriba o río abajo dentro de la vía de muerte celular lo cual tiene diferente impacto en la respuesta inmunológica (Ramírez-Labrada y col., 2022). La activación de las caspasas conduce a las células a las fases finales de la muerte celular, las cuales son las responsables de las características morfológicas

distintivas de las células apoptóticas (Green, 2022). En este sentido, las tres vías de señalización de apoptosis que se mencionaron convergen en la activación de una caspasa ejecutora (caspasa-3, -7 y/o6) que son las responsables de la formación de cuerpos apoptóticos, vesículas celulares, fragmentación del DNA y exposición de la fosfatidilserina en la capa externa de la membrana plasmática (Julien & Wells, 2017; Kim y col., 2024).

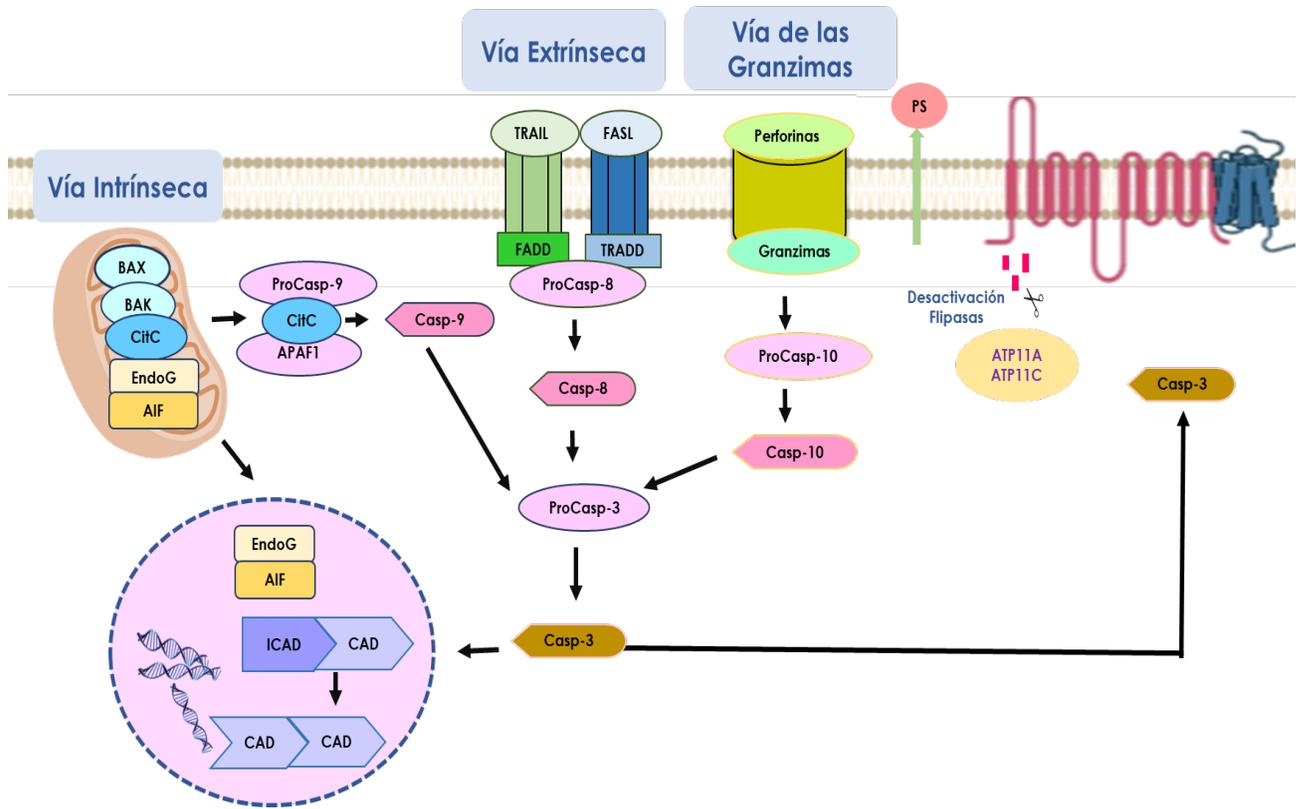


Figura 2. Vías de señalización de la apoptosis. Hasta el momento se han descrito 3 vías de señalización de la apoptosis en una célula eucariota canónica: 1) Vía intrínseca iniciada por un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial mediada por proteínas miembros de la familia Bcl-2 pro-apoptótica. 2) Vía extrínseca mediada por la activación de receptores de muerte de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). 3) Vía de las granzimas evocada por los mecanismos efectores de linfocitos T citotóxicos y linfocitos NK (Han y col., 2023; Hay & Slansky, 2022; Hussar, 2022).

4.1.2 Fragmentación del DNA

Posterior a la activación de las caspasas ejecutoras (caspasa-3 y 7), el factor de fragmentación de DNA (DFF, del inglés, *DNA Fragmentation Factor*) es escindido lo que desencadena la fragmentación del DNA (Eom y col., 2023). El DFF es un complejo heterodimérico inactivo formado por dos subunidades CAD (del inglés, *Caspase-Activated DNase*) una de 40 kDa también conocido como DFF40 e ICAD (del inglés, *Inhibitor of Caspase-Activated DNase/DFF45*) de 45 kDa (Ai y col., 2024). ICAD tiene una doble función, por un lado, participa como chaperona para la actividad de CAD y por otra parte evita la activación espontánea de CAD en células vivas (Banas y col., 2018). Además, se han identificado variantes de ICAD por *splicing* alternativo, ICAD-L e ICAD-S, quienes carecen de los últimos residuos aminoacídicos 62 y 66 en el dominio COOH terminal, ambas variantes pueden dimerizar con CAD (Lechardeur y cols., 2000).

Ambas subunidades del DFF comparten el dominio CIDE-N (del inglés, *Cell death-Inducing DNA Fragmentation Factor Alpha (DFFA)-like Effector*) en su extremo NH₂ terminal y la señal de localización nuclear (NLS, del inglés, *Nuclear Localization Signal*) en el extremo COOH, empero, en las células no apoptóticas la NLS permanece enmascarada (Kulbay y col., 2021). El dominio CIDE-N posee 80 aminoácidos altamente conservados entre ICAD y CAD, este dominio es crucial para las interacciones de ambas moléculas (Ha & Park, 2022; Xu y col., 2024). Por otro lado, CAD presenta una región en el extremo carboxilo terminal crucial para la actividad catalítica de CAD, que incluye cuatro alfa hélices, cuatro láminas beta y un “loop” en el extremo C- terminal, que corresponde con la región NLS (Kulbay y col., 2021).

Después de la escisión de ICAD, CAD inicia con el clivaje cerca de los nucleosomas, lo que genera fragmentos de DNA entre 50 y 300 kb (Kari y col., 2022). La segunda etapa es el corte inter-nucleosómico, lo cual produce fragmentos de menos de 180 pb (Green, 2022). Otras nucleasas relacionadas con la degradación del DNA durante la apoptosis; son la endonucleasa G (Endo-G), y el factor inductor de la apoptosis AIF (del inglés, *Apoptosis Inducing Factor*), los cuales lideran la fragmentación del DNA por la vía intrínseca (Delavallée y col., 2020).

4.1.3 Participación de las flipasas durante muerte celular tipo apoptosis

Las flipasas de fosfolípidos también conocidas como ATPasas tipo P (llamadas tipo P, por el ácido aspártico conservado que experimenta fosforilación transitoria), constituyen una familia de proteínas de membrana que utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para transportar iones y lípidos a través de las membranas biológicas (Andersen y col., 2016). Las flipasas se han descrito en eucariotas, procariotas y arqueas (Bai y col., 2020). De acuerdo con los análisis filogenéticos las flipasas tipo P se han clasificado en cinco clases principales (P1-P5), cada clase se caracteriza por transportar diferentes sustratos y tener motivos específicos (Sakuragi & Nagata, 2023).

Las primeras tres clases de flipasas tipo P (P1-P3), se caracterizan por transportar iones a través de las membranas y con base en ellos son subdivididas, por ejemplo las P1-ATPasas funcionan como transportadores de metales pesados para la desintoxicación del citoplasma, otras P1-ATPasas participan en la carga de metales dentro de tejidos y compartimentos celulares específicos y la Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoendoplasmático (SERCA; una P2-ATPasa) está implicada en el mantenimiento de la homeostasis del calcio durante la señalización, etc. (Andersen y col., 2016). Por

otro lado, las flipasas tipo P4 transportan lípidos a través de las membranas plasmáticas y se ha predicho que las flipasas tipo P5 tienen participación importante en los sistemas de transporte endosomal-lisosomal, sin embargo, aún hay poca información sobre su especificidad por un sustrato (Bai y col., 2020). Las flipasas tipo P4, funcionan como un complejo heterodimérico formado por una subunidad alfa, que contiene 10 hélices transmembranales y una subunidad beta, que contiene dos, esta última se conoce como CDC50 (del inglés, *Cell División Cycle 50*) (Liy col., 2023). La arquitectura de la subunidad alfa presenta un dominio transmembranal de 10 hélices alfa como se mencionó, el dominio actuador (dominio A), dominio de unión a nucleótidos (dominio N), y el dominio de fosforilación (dominio P) (Lyons y col., 2020). Hasta la fecha se han descrito 14 flipasas tipo P4 en el ser humano y cuatro en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, su función primordial radica en mantener la integridad de las membranas en el retículo endoplasmático, mitocondria, aparato de Golgi, lisosomas y membrana plasmática (Sakuragi & Nagata, 2023).

La esfingomielinina y fosfatidilcolina se encuentran en la cara externa de la membrana plasmática mientras que la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina se encuentran en la cara interna de la bicapa lipídica, esta distribución asegura la integridad de las membranas plasmáticas y compartimientos celulares (Wang y col., 2022). Debido a que los fosfolípidos presentan un grupo cargado y dos cadenas de acilo hidrófobas apenas se mueven espontáneamente a través de las bicapas lipídicas, el mantenimiento de su distribución asimétrica y su reorganización dependen de las flipasas, flopasas y escramblasas (Nagata y col., 2020). Las flipasas y flopasas translocan fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina de la capa externa a la capa interna

de la membrana plasmática y la fosfatidilcolina en dirección opuesta, respectivamente (Sakuragi & Nagata, 2023). Mientras que las escramblasas translocan fosfolípidos a ambas direcciones y sin especificidad, lo que promueve el colapso de la asimetría de la membrana en diversos procesos fisiológicos como la apoptosis y concentraciones altas de calcio (Behuria y col., 2022).

Posterior a la iniciación de la apoptosis, la célula expone PS a la capa externa de la membrana plasmática, las flipasas ATP11A y ATP11C son escindidas e inactivadas por caspasa-3 durante la apoptosis, mientras que su actividad tipo ATPasa es inhibida por altas concentraciones de Ca^{2+} (Segawa & Nagata, 2015). Sin embargo, la translocación de PS por inactivación de flipasas es lenta, por ello la activación por escisión de las escramblasas acelera el proceso (Behuria y col., 2022). Una escramblasa perteneciente a la familia XKR, conocida como XKR8 es activada por caspasa-3 y por cinasas (Behuria y col., 2022). XKR8 se encuentra en un complejo heterodimérico con Basigina (Bsg) o Neuroplastina (NPTN), las cuales son proteínas de membrana tipo 1 de la superfamilia de las inmunoglobulinas que sirven como chaperonas para localizar XKR8 en la membrana plasmática (Sakuragi y col., 2021). XKR8 presenta sitios de reconocimiento por caspasas bien conservados en el extremo COOH terminal, cuando es escindida por la caspasa ejecutora sufre un proceso de dimerización del complejo XKR8-Bsg/NPTN en un hetero-tetrámero que funciona como escramblasa, translocando de esta manera PS y otros fosfolípidos como la fosfatidiletanolamina de manera aleatoria y bidireccional (Nagata y col., 2020).

4.1.4 Proteasas del clan CD

Las caspasas como ya se mencionó tienen diferentes implicaciones en la

apoptosis y otros procesos inflamatorios (Bock y Riley, 2023). Las caspasas pertenecen al clan de proteasas CD, cuya principal característica estructural es un dominio catalítico tipo caspasas conservado (Ramos-Guzmán y col., 2023). Los miembros del clan CD de cisteína peptidasas son clasificados en familias principalmente en sus características estructurales y su función, en lugar de su homología de secuencia (McLuskey y Mottram, 2015). Estas proteasas contienen una díada catalítica histidina/cisteína y usan una cisteína activa y conservada para escindir enlaces peptídicos de proteínas (McLuskey y Mottram, 2015). Todas estas enzimas son endopeptidasas y aunque peptidasas de una misma familia pueden tener homología de secuencia, sus funciones y mecanismos biológicos pueden diferir en gran medida (McLuskey y Mottram, 2015). El clan CD contiene ocho familias de endopeptidasas: C11 clostripainas, C123 RARPD2, C13 leguminasas (endopeptidasas de asparagina y transaminasas de anclaje GPI), C14 (caspasas y metacaspasas), C25 gingipaínas, C50 separasas, C80 toxinas RTX, y la peptidasa C84 prtH (Rawlings y col., 2018).

Los miembros del CD del clan se activan de diferentes maneras, las peptidasas de la familia C11 se sintetizan como proenzimas y requieren la eliminación de un propéptido N-terminal para su activación (Rawlings y Barrett, 2013). Las peptidasas de las familias C14 se activan mediante dimerización sin proteólisis o mediante proteólisis interna (Green, 2022). La proleguminasa (C13) se activa mediante la escisión de un enlace asparaginilo en las condiciones ácidas del lisosoma (Elamin y col., 2022). Las Gingipaínas R (C25) y K se secretan y trabajan juntas para eliminar autolíticamente su dominio de hemaglutinina C-terminal (Pomowski y col., 2017). Asimismo, la familia C14

es subdividida en C14A (caspasas) y C14B (metacaspasas y paracaspasas, C14B(M) y C14B(P) respectivamente) (Minina y col., 2020).

Los parásitos protozoarios contienen una gran variedad de cisteína-peptidasas que tienen relevancia en sus funciones biológicas, las más estudiadas son las pertenecientes al clan CA (tipo papaína), en este clan, la familia más estudiada es la C1 donde se encuentran las catepsinas y calpaínas (Argüello-García y col., 2023). Sin embargo, ahora es evidente que también presentan peptidasas del clan CD, algunas funciones se asimilan a sus contrapartes de mamíferos sin embargo otras difieren en gran medida (McLuskey y Mottram, 2015). Hasta la fecha se han registrado tres familias del clan CD en protozoarios parásitos: La familia C13 (Leguminasas o endopeptidasas de asparagina y las transaminasas de anclaje GPI), C14 (Metacaspasas) y C50 (Separasas) (Euceda-Padilla y col., 2024; Markova y col., 2016; Yadav y col., 2023).

La leguminasa (endopeptidasa de asparagina) y a la transaminasa de anclaje GPII perteneciente a la familia C13, han sido encontradas en todos los reinos de los seres vivos, aunque la leguminasa ha sido más estudiada en el parásito *Schistosoma sp.*, mamíferos y plantas. La leguminasa es sintetizada como un zimógeno inactivo cuya estructura consiste en un péptido señal de 17 residuos, el cual es liberado durante la secreción, el resto de su estructura consiste en un propéptido de 8 residuos en el extremo N-terminal, un dominio tipo peptidasa de 110 residuos y un predominio en el extremo C-terminal. Es interesante como el dominio tipo peptidasa de la leguminasa es topológicamente equivalente a las caspasas y paracaspasas, con una región de seis láminas beta plegadas y cinco hélices alfa.

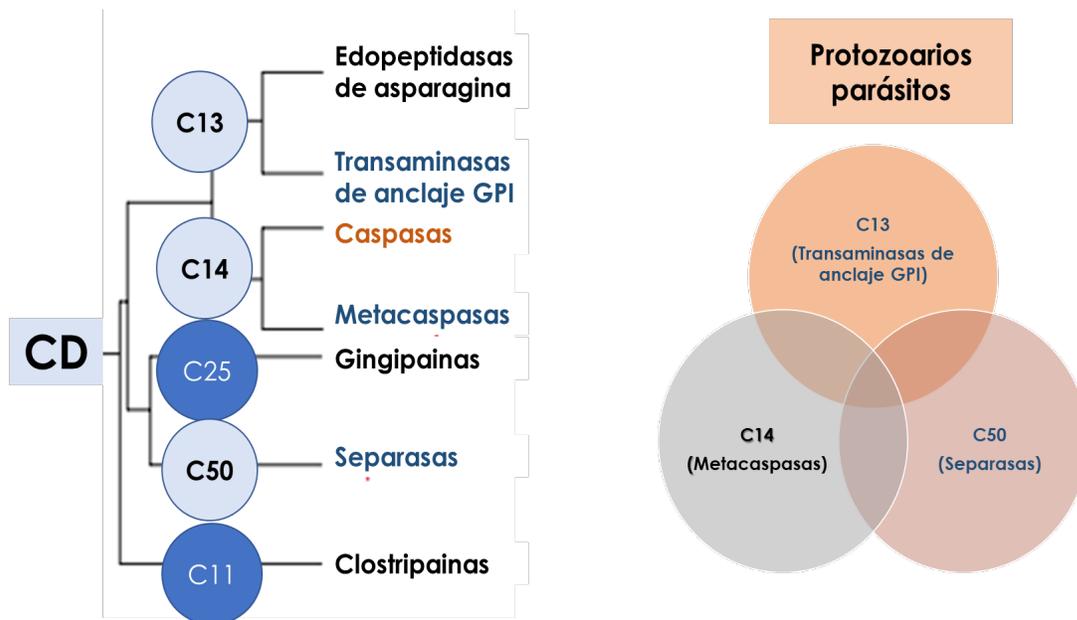


Figura 3. Peptidasas del clan CD. Relación filogenética entre el clan CD. Se muestran las peptidasas, generadas aplicando la metodología Clustal a las regiones de homología alrededor del sitio catalítico H y C. El árbol sugiere que las asparaginilo endopeptidasas y las GPI:proteínas transamidadas están relacionadas, al igual que las caspasas y las metacaspasas. Cabe señalar que cada familia tiene <25% de identidad de secuencia el resto de las familias y que la única identidad significativa reside alrededor de los residuos del sitio activo. Las tres peptidasas del clan CD descritas hasta el momento en protozoarios parásitos son la C13, C14 y C50 (modificado de Mottram y col., 2005).

4.2 Apoptosis en protozoarios

Los protozoos *Trypanosoma* y *Leishmania*, *Blastocystis hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* y *Plasmodium falciparum*, sufren un tipo de muerte similar a la apoptosis, frente a algunos estímulos nocivos. Estos parásitos presentan alteraciones morfológicas tales como la condensación cromosómica, fragmentación del DNA nuclear, encogimiento celular, pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, formación de cuerpos apoptóticos y externalización de la PS, a pesar de esos hallazgos, la maquinaria celular y las proteínas involucradas en este proceso no se han identificado (Ameisen, y cols., 1995; Arambage, y cols., 2009; Gannavaram & Debrabant, 2012).

Asimismo, los análisis bioinformáticos sugieren que en los géneros *Tetrahymena*, *Plasmodium* y *Toxoplasma*, existen proteínas proapoptóticas relacionadas a la mitocondria (Kaczanowski, y cols., 2011). Además, se ha establecido que en los metazoarios se encuentran algunas proteínas con características similares a las caspasas (Gannavaram & Debrabant, 2012), por lo que se propone una hipótesis en la que las metacaspasas son las proteasas ancestrales y que las caspasas divergieron mediante la evolución (Meslin, y cols., 2011). En algunos protozoos, unas pocas funciones de las mitocondrias son reemplazadas por proteínas citoplasmáticas como los hidrogenosomas, aunque no se conoce si este organelo interviene en la muerte celular. En *T. vaginalis*, un parásito con hidrogenosomas se ha observado que, al adicionar metronidazol o retirar nutrientes del medio, hay efectos sobre la morfología y la supervivencia celular, lo que sugiere posibles mecanismos de muerte celular regulada.

4.3 Apoptosis en *G. intestinalis*

En *G. intestinalis* se ha observado que, bajo diferentes condiciones de estrés, tales como la aplicación de β -lapachona, la privación de suero y la utilización de curcumina, se induce la formación de vesículas en la membrana celular, condensación de la cromatina, contracción celular y vacuolización citoplasmática (Chose, y cols., 2003; Pérez-Arriaga, y cols., 2006; Corrêa, y cols., 2009; Ghosh, 2009;). En un estudio, al transfectar en trofozoítos de *G. intestinalis* una proteína recombinante de la familia Bcl-2 humana (BAX), se alteró el proceso de enquistamiento y se indujo muerte celular, esto apunta a que *Giardia* podría tener proteínas sustratos para BAX posiblemente las proteínas que hacen parte de las vesículas específicas de la enquistación (ESV, del inglés, *Encystation-specific vesicles*) quienes conducen a la liberación de proteínas de la pared del quiste y a la muerte celular, sin participación de la mitocondria (Hehl, y cols., 2007).

Igualmente, se han sometido trofozoítos de *G. intestinalis* a estrés oxidante usando peróxido de hidrógeno y metronidazol observaron cambios morfológicos asociados a la muerte celular regulada similar a la apoptosis y el análisis bioinformático reveló algunos genes asociados con la autofagia tales como TOR, ATG1 y ATG16. A pesar de no haber evidenciado la presencia de caspasas, proponen que este tipo de muerte celular programada se lleva a cabo por una única vía de señalización diferente a la que ocurre en eucariotas superiores (Bagchi, y cols., 2012).

Recientemente en nuestro grupo de investigación se identificó por medio de inmunoproteómica una proteína obtenida después de la inducción de apoptosis en *Giardia* por curcumina y peróxido de hidrógeno, la cual posee un peso de 40 kDa y

388aa, con un punto isoeléctrico de 9.8, esta misma comparte una similitud del 16% con la proteína CAD de *Homo sapiens*, además fue posible ubicar algunas características estructurales más importantes de CAD, como el dominio CIDE constituido por los residuos K9, K19, y K32 de nuestra secuencia aminoacídica de CAD de *G. intestinalis*.

Asimismo, se evidenció la región consistente en el centro activo de CAD de *G. intestinalis* integrado por los aminoácidos H326, H337 y K331 correspondientes a los aminoácidos H307, H312 y K309 de *Homo sapiens* (Durán Pérez, 2014). Posteriormente se clonó el gen GCAD utilizando DNA de *G. intestinalis* y fue insertado en un vector de expresión para la posterior producción de la proteína recombinante rGCAD, la cual posee un peso aproximado de 55 kDa correspondiente al peso de la endonucleasa GCAD de *G. intestinalis* cuya secuencia aminoacídica fue registrada en la base de datos del NCBI con el siguiente número de acceso en el GenBank KAE8302647.1 (Díaz-Gaxiola, 2016; Rodríguez-Rochín, 2018). Estos resultados obtenidos dan pie a continuar investigando la cascada de señalización de la apoptosis en *G. intestinalis*, en este sentido, como ya se mencionó ICAD tiene una función importante en la inhibición de la fragmentación del DNA por CAD además de actuar como chaperona, por lo cual recientemente se identificó su ortólogo en *G. intestinalis* denominado como IGCAD (Manuscrito en preparación), sugiriendo indirectamente la participación de una proteasa con actividad similar a las caspasas, la cual podría estar implicada de manera similar en el mecanismo de exposición de la PS, una de las características morfológicas de la apoptosis.

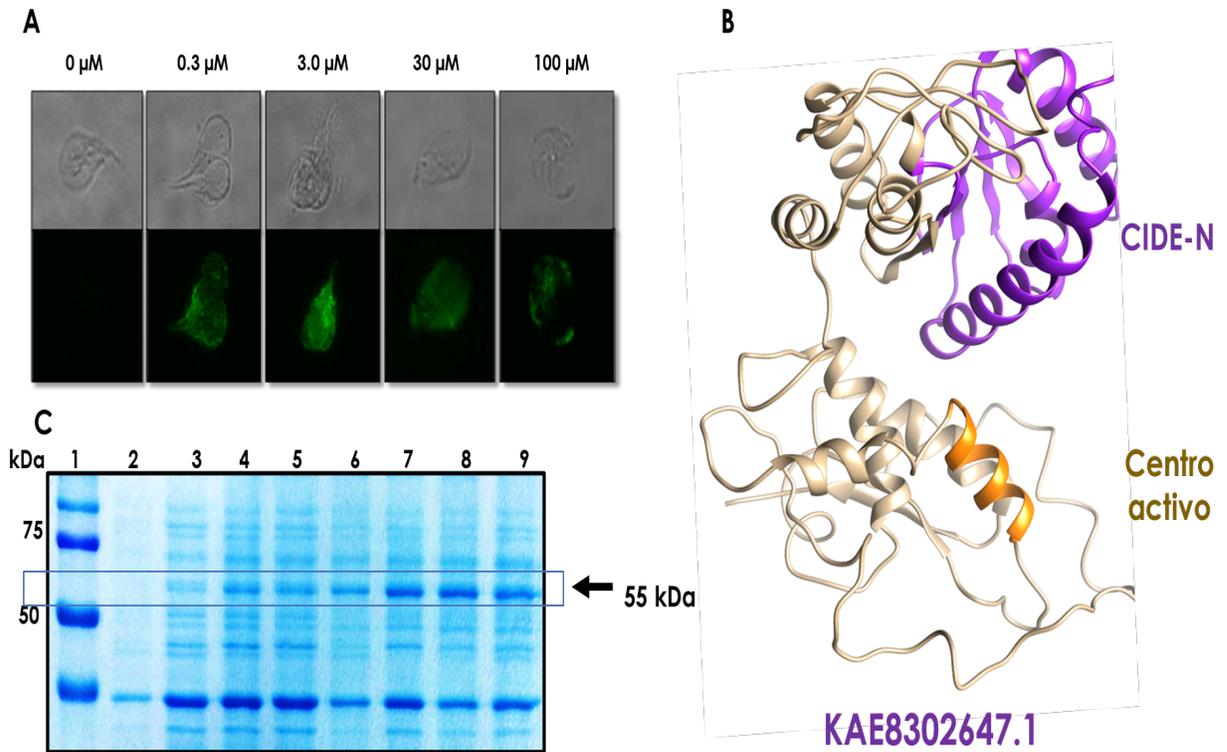


Figura 4. CAD de *G. intestinalis* (GCAD). A) GCAD fue identificada mediante el anticuerpo policlonal anti-CAD de ser humano, GCAD fue localizado subcelularmente en trofozoítos tratados con diferentes concentraciones de curcumina. B) Estructura predicha *in silico* de GCAD, se destacan los dominios CIDE-N y el dominio catalítico en el extremo carboxilo terminal, la secuencia fue registrada en el GenBank con el número de acceso que se observa. C) Producción recombinante de GCAD, se obtuvo una proteína de 55 kDa que corresponden a 13 kDa de la proteína de fusión sumo y 43 kDa de GCAD (tesis Durán Pérez, 2014; Díaz-Gaxiola, 2016; Rodríguez-Rochín, 2018).

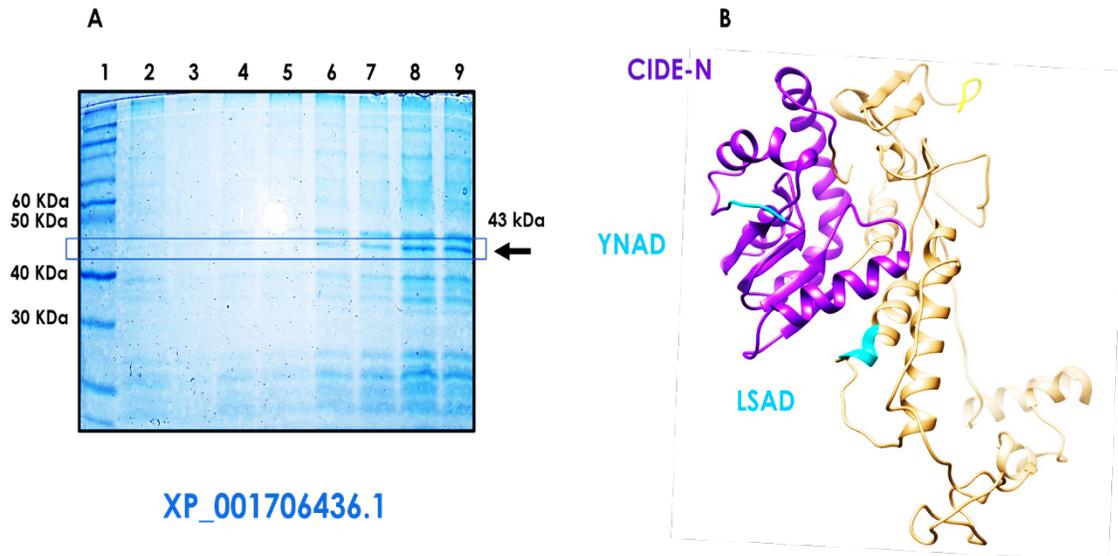


Figura 5. Identificación de IGCAD. A) Con base en el extremo N-terminal de GCAD se identificó IGCAD, posteriormente la proteína se clonó y se produjo de manera recombinante obteniendo así una proteína de 43 kDa. B) El análisis de sus dominios conservados mostró que contiene los motivos diana para caspasas en los residuos 95 y 210 que pertenecen a los sitios diana para una peptidasa similar a caspasa 1, (magenta) con base en el análisis de *Peptide Cutter* así como el dominio CIDE-N que le permitiría la interacción con la DNasa GCAD (morado) (tesis Villa-Medina, 2019).

V. JUSTIFICACIÓN

Nuestro grupo de investigación previamente identificó, clonó y expresó de forma recombinante a la DNasa activada por caspasa de *G. intestinalis*, denominada como GCAD. Recientemente, se identificó, clonó y expresó como proteína recombinante a su inhibidor, denominado IGCAD. Por tanto, para estudiar su participación como una proteína reguladora dentro de la cascada de señalización de apoptosis es necesario continuar con la caracterización inmunológica de dicha interacción, así como la identificación de la caspasa ejecutora (caspasa-3), que media la activación de GCAD. En este contexto, consideramos de gran relevancia continuar con el estudio de la cascada de señalización de la apoptosis con énfasis en estas moléculas, así como en las flipasas implicadas en la externalización de la PS, lo que permitirá dilucidar de forma integral la cascada de transducción de señales de la apoptosis de *G. intestinalis*, contribuyendo a una mejor comprensión de la biología del parásito, que es considerado tanto un eucariota primitivo como un patógeno desatendido de presencia cosmopolita, por lo que los nuevos datos sobre su muerte celular son de importancia terapéutica.

VI. HIPÓTESIS

G. intestinalis posee un ortólogo de caspasa-3 que media la proteólisis de GCAD-IGCAD, así como al menos una flipasa implicada en la externalización de PS dentro de la cascada de señalización de apoptosis.

VII. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Estudiar la interacción GCAD-IGCAD, caspasa-3 y flipasas dentro de la cascada de señalización de apoptosis de *Giardia intestinalis*

7.2 Objetivos específicos

1. Evidenciar la interacción de GCAD-IGCAD de *G. intestinalis*
2. Identificar *in silico* e *in vitro* al ortólogo de caspasa-3 implicado en la proteólisis de IGCAD y las flipasas *G. intestinalis*.
3. Determinar la actividad de flipasas en *G. intestinalis* durante la apoptosis.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Análisis de la interacción GCAD-IGCAD *in silico*

Se llevó a cabo el modelado de las proteínas GCAD e IGCAD a través del programa ALPHAFOLD empleando la secuencia aminoacídica de éstas (Jumper y col., 2021). Las estructuras obtenidas fueron empleadas para realizar un *docking* proteína-proteína en la herramienta en línea Cluspro (Desta y col., 2020). De los 20 modelos obtenidos se seleccionó uno de acuerdo con la puntuación proporcionada por el programa, al mejor favorecido en electrostática, hidrofobicidad y por fuerzas de Van der Waals, de ellos el que requería menor energía de interacción era el más probable. Una vez que se obtuvo el complejo GCAD-IGCAD este fue analizado en PDB-SUM para determinar el tipo de interacciones específicas en cada aminoácido de ambas proteínas (Laskowski y col., 2018). Finalmente, estas secuencias fueron editadas en UCSF Chimera para destacar los dominios y las regiones donde hubo interacción (Pettersen y col., 2004).

8.2 Purificación de IGCAD

Se realizó la extracción de proteínas totales de la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformada con el rDNA de rIGCAD, el pellet celular fue resuspendido en 4 mL de buffer de extracción con inhibidores de proteasas libre de EDTA adicionado con 1 mg/mL de lisozima y se incubó en hielo por 30 min, posteriormente las bacterias fueron lisadas mediante sonicación a una pulsación por 3 segundos con un nivel de intensidad 2, una vez lisadas las bacterias, la muestra se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min y se almacenó el sobrenadante a -20°C (López-Moreno y col., 2003). Se obtuvo el *pellet* con los cuerpos de inclusión, posteriormente fue resuspendido en

1 mL de tampón D para la purificación de la proteína rIGCAD por medio de cromatografía de afinidad a metales divalentes, utilizando una columna de purificación Hi-Trap (López-Moreno y col., 2003). La proteína obtenida se cuantificó y la confirmación de productos de purificación se realizó a través de SDS-PAGE al 12.5% (Piedra-Quintero y col, 2015). Una vez que se obtuvo la de proteína eluida, se realizó la diálisis para eliminar el EDTA y el sulfato de níquel. La membrana de diálisis se hirvió por 5 min en agua desionizada. Se realizó un nudo muy ajustado en la parte inferior de la membrana y se cargó la proteína, se cerró la membrana del otro extremo. Se dializó por dos horas en 2L de amortiguador salino de fosfatos (PBS) en agitación, se realizó un cambio de PBS y se dejó 2 horas, posteriormente se cambió el PBS y se dejó dializando toda la noche. Al día siguiente se cambió el PBS y se dializó una hora más. Por último, la muestra se revolcó en azúcar para concentrar la proteína y disminuir el volumen de PBS. Se retiró el exceso de azúcar con PBS y se extrajo la muestra para su cuantificación de acuerdo con el método de Bradford (López-López y col., 2018).

8.3 Producción de un anticuerpo policlonal anti-IGCAD

Se emplearon ratones de la cepa C57BL/6 con tiempo de vida de 8 semanas, se obtuvo el suero pre-inmune previo a la inmunización con la proteína (Murúa-López y col., 2019). Se llevó a cabo una emulsión con PBS (c.b.p. 250 μ L), 20 μ g de rIGCAD y 250 μ L de ACF (adyuvante completo de Freud) (Murúa-López et al., 2019). Posteriormente se realizaron inmunizaciones por vía intraperitoneal 3 veces, siendo las inmunizaciones 2 y 3 con AIF (Adyuvante Incompleto de Freud), con un intervalo de 10 días entre cada inmunización (Murúa-López y col., 2019). El suero inmune se

recolectó cinco días después de la última inmunización y fue evaluado mediante ELISA de acuerdo con el protocolo previamente establecido por nuestro grupo de investigación (Murúa-López y col., 2019).

8.4 Detección de IGCAD por *Western blot*

Se corrieron dos geles preparativos en los que se cargaron 200 µg de proteína IGCAD y el extracto crudo de *G. intestinalis* respectivamente (López-López y col., 2018). Las proteínas se apartaron con base a su peso molecular a 70 V durante 120 min en *buffer* de corrida TGS (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% p/v). las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.22 µM en amortiguador de Towbin (Tris-base 25 mM, glicina 193 mM y metanol 20% v/v) para ser utilizadas como base para los ensayos de *Western blot* (Piedra-Quintero y col, 2015). Por consiguiente, se bloquearon las membranas con caseína al 5 % p/v, se lavaron 2 veces con PBS suplementado con 0.1 % v/v Tween 20 (PBS-T), se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-IGCAD 1:100. Se lavaron tres veces con PBS-T y se incubaron con un anti-IgG de ratón 1:3000, se lavaron dos veces con PBS-T y el último lavado se realizó con PBS, finalmente se reveló con diaminobencidina y H₂O₂ siguiendo los protocolos estándar (Piedra-Quintero y col., 2015).

8.5 Ensayo *pull down*

Se llevó a cabo un cultivo de *G. intestinalis* para realizar la obtención de biomasa (Benchimol y col., 2022). Se cosecharon las células en la fase logarítmica y la biomasa se centrifugó y se lavó con 1 mL de PBS dos veces a 2500 rpm 5 min (Benchimol y col., 2022). Para realizar la extracción de proteínas se utilizó el buffer RIPA en condiciones no desnaturizantes (NaCl 150 mM, Nonidet P-40, SDS 0.1% y Tris 50

mM, pH 8), las células se resuspendieron en 200 μ L de buffer RIPA suplementado con inhibidores de proteasas (Louche y col., 2017). El lisado se incubó 20 min en hielo y se mezcló cada 5 min por inversión (Louche y col., 2017). Se centrifugó el lisado 20 min a 14000 rpm y se obtuvo el sobrenadante y se cuantificó por el método de Bradford se obtuvo una concentración 4.18 μ g/ μ L. Se empleó la columna de cromatografía de afinidad a metales (López-Moreno y col., 2003). Brevemente, se pasaron por la columna 10 mL de H₂O, se agregaron 2 mL de NiSO₄ 100mM y se incubó por 5 min. Se realizó otro lavado igual con H₂O. Se ambientó la columna con 2 mL Tampón D (Cloruro de guanidina y Tris-HCl) (López-Moreno y col., 2003). Se cargó la proteína carnada purificada rGCAD 55 μ g y rIGCAD 48 μ g en 400 μ L de Tampón D (cada una en una columna independiente) y se incubó por 30 min, se pasó por la columna nuevamente 2 mL de Tampón D (López-Moreno y col., 2003). Se cargó a la columna con 10 mL de Binding buffer (Imidazol 10 mM) y se procedió a realizar la incubación con la presa (lisado *G. intestinalis*) (Louche y col., 2017). Se cargaron 500 μ L del lisado en binding buffer (418 μ g para GCAD como presa y 450 μ g para IGCAD como presa) y se incubó a 4°C toda la noche (Louche y col., 2017). Posteriormente se realizó el lavado con 10 mL de Binding buffer se guardó el primer mL del lavado y 4 mL más, de cada 2.5 mL de lavado se recolectó 1 mL para análisis y observar si se eliminaban las proteínas inespecíficas del lisado (Louche y col., 2017). Se cargaron 500 μ L de buffer de elución en la columna (EDTA 0.5M, pH 8) y se incubó por 10 min, posteriormente se recolectaron 3 mL de la elución para análisis de las interacciones por SDS-PAGE y *Western blot* (Louche y col., 2017).

8.6 Identificación *in silico* de caspasa-3 y flipasas

Se utilizaron las secuencias de la flipasas ATP11A (acceso de GenBank NP_056020.2) y la procaspasa-3 (acceso de GenBank NP_004337.2) de *Homo sapiens* como base para la búsqueda de flipasas y proteasas con actividad similar a la caspasa-3 implicadas en la muerte celular regulada en el proteoma de *G. intestinalis* mediante la herramienta DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>); las secuencias de proteínas identificadas fueron obtenidas del National Center for Biotechnology Information database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Una vez obtenidas las secuencias, se alinearon mediante la herramienta Clustal Omega (Madeira y col., 2019) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y se construyó un árbol filogenético comparando las secuencias obtenidas de *G. intestinalis* y otros protozoarios. Se determinaron los sitios diana para caspasas mediante Cascleave (Song y col., 2010) (<https://dl.acm.org/doi/10.1093/bioinformatics/btq043>). Finalmente se analizaron las secuencias aminoacídicas para determinar las posibles funciones con la herramienta de dominios conservados y los alineamientos entre las diferentes proteínas ortólogas. Se predijo la estructura terciaria de las proteínas mediante Robetta (Song y col., 2013) y Phyre2 (Kelley y col., 2016) (<https://rosetta.bakerlab.org>), las estructuras fueron visualizadas y editadas en UCSF Chimera (Pettersen y col., 2004).

8.7 Diseño de iniciadores específicos

Para el diseño de los iniciadores específicos se utilizó la secuencia del gen que codifica para la flipasa IA de *G. intestinalis* (acceso de GenBank XM_001705404) y las proteínas con dominios conservados relacionadas a las caspasas: separasa (acceso

de GenBank XM_001707699.2) y la transaminasa de anclaje GPI (acceso de GenBank XM_001707656.1). El diseño de los iniciadores llevó a cabo con la herramienta *primer-BLAST* del NCBI. Se verificó que estos iniciadores fueran correctamente diseñados, se analizó el tamaño, el porcentaje guanina-citosina, la formación de dímeros, homodímeros y horquillas y la determinación de la temperatura de alineamiento (T_m). Los iniciadores poseen los sitios de restricción para la mutagénesis dirigida según sea el caso para su posterior ligación con el vector de expresión pCDNA6. Éstos se emplearon para realizar una PCR en el *software* Serial Cloner V-8, subsecuentemente tanto el amplicón como vector de expresión plasmídico fueron digeridos con dichas enzimas y se realizó la construcción recombinante en el mismo programa, las secuencias fueron visualizadas en CLC Sequence Viewer v8.0.

8.8 Identificación de caspasa-3-like de *G. intestinalis*

Se obtuvo el extracto crudo de las proteínas de *G. intestinalis* empleando 200 μ L buffer RIPA (NaCl 150 mM, Nonidet P-40, SDS 0.1% y Tris 50 mM, pH 8) (Louche y col., 2017). Se incubó 30 min en hielo con la biomasa de *G. intestinalis* resuspendida, se mezcló por inversión 30 min (Louche y col., 2017). Posteriormente se realizó choque térmico, se centrifugó el lisado y se recuperó el sobrenadante (López-López y col., 2018). Se ajustaron las concentraciones y se emplearon 100 μ g de proteínas y se cargaron en un gel preparativo siguiendo el protocolo establecido (Piedra-Quintero y col., 2015). Las muestras se corrieron a 70 V por 2.5 h aproximadamente. Se transfirieron (1 h a 100 V) las proteínas a la membrana de nitrocelulosa y se realizó el bloqueo con caseína 5% p/v en PBS-T 1 h. Se lavaron las membranas y se cortaron para la incubación con los anticuerpos. El anticuerpo primario utilizado (α -casp-3) se

diluyó a 1:100 en PBS-T y el secundario en 1:3000 (α -IgG de conejo) en PBS-T (Linetsky y col., 2020). Alternativamente se empleó una membrana de nitrocelulosa preparativa que contenía proteínas de células mononucleares de ser humano (López-López y col., 2018).

8.9 Clonación de la separasa, la TAGPIGi, y la flipasa IA de *G. intestinalis*

Trofozoítos de la cepa WB de *G. intestinalis* (ATCC® 30957), donada gentilmente por la Dra. Guadalupe Ortega Pierres del departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN fueron cultivados en medio TYIS-33 siguiendo el protocolo de ATCC. Los trofozoítos se cosecharon una vez que el cultivo alcanzó la fase logarítmica, los tubos de cultivo se colocaron en hielo durante 20 min, el cultivo se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugó por 5 min a 1500 rpm. Los trofozoítos fueron sometidos a extracción de DNA mediante el protocolo previamente establecido por Aljanabi-Martínez (2001). Se verificó la integridad del DNA genómico mediante electroforesis en geles de agarosa. Una vez que se diseñaron y se sintetizaron los iniciadores para los genes identificados para la Flipasa (ATPasa IA) y los dominios de la caspasa-3 (separasa y TAGPIGi) se estandarizó la reacción de PCR punto final para cada gen. Los productos de PCR se purificaron de los geles de agarosa para la digestión y ligación con el vector de expresión plasmídica, así como la secuenciación (López-López y col., 2018). Se prepararon células competentes de la cepa *E. coli* TOP10 y fueron transformadas con 10 μ L de la reacción de ligación y cultivadas a 37° C en Agar BHI (del inglés *Brain Heart Infusion*) suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina toda la noche (Quinn y col., 2024). Las colonias transformadas fueron seleccionadas al azar y cultivadas en caldo BHI suplementado con 100 μ g/mL

de ampicilina y el plásmido recombinante fue purificado mediante la metodología de extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina; la presencia del gen fue evidenciado por PCR (López-López y col., 2018). Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1%. El plásmido recombinante fue utilizado en la reacción de transformación con bacterias *E. coli* BL21 (DE3) para la inducción de la expresión recombinante.

8.9 Actividad de flipasas

Una vez que se obtuvo la cepa *E. coli* BL21 (DE3) transformada con la construcción recombinante que contiene la región de 621 pb de la Flipasa IA. Se empleó para la inducción de la expresión en medio SOB (*Super Optimal Broth*) suplementado con ampicilina a 100 µg/mL una vez que el cultivo alcanzó la DO a 0.6 se agregó el inductor gratuito Isopropilo-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 1 mM. La inducción de la expresión se realizó durante 7 h y se recolectó biomasa cada hora para determinar la mejor hora para la inducción de la expresión. Al finalizar se recolectó la biomasa a 5000 rpm durante 20 min. Se solubilizaron los cuerpos de inclusión mediante el protocolo mencionado y se continuó con la purificación de la proteína con un peso molecular aproximado de 23 kDa que contiene un tag de seis histidinas.

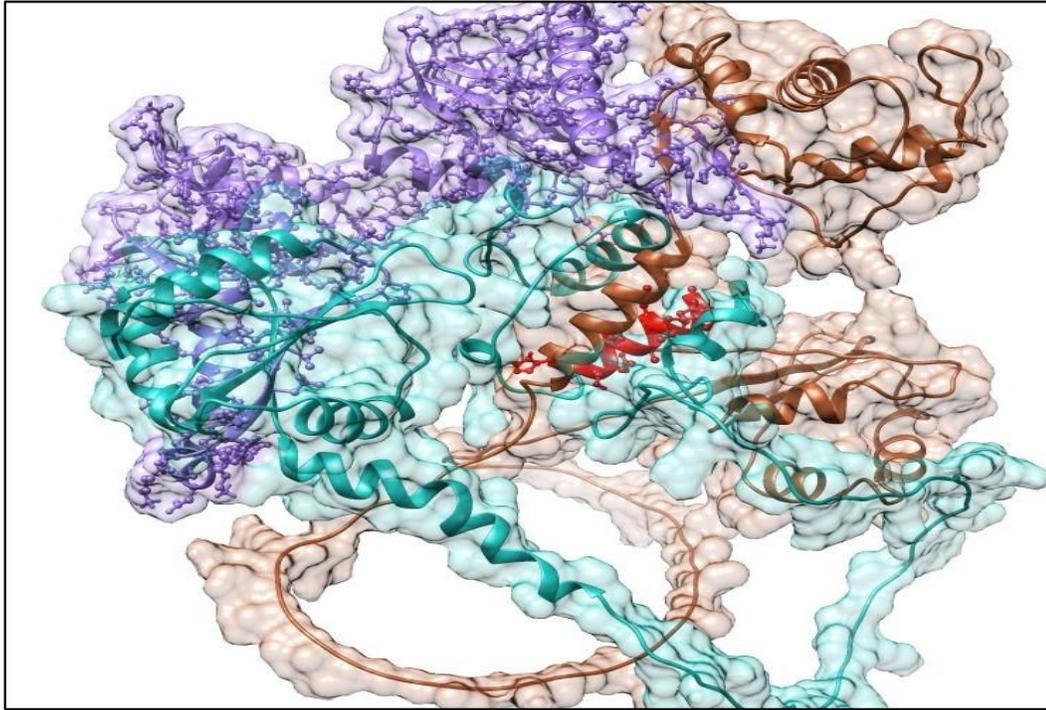
IX. RESULTADOS

9.1 Análisis de la interacción GCAD-IGCAD *in silico*

Se realizó la predicción de las estructuras de GCAD e IGCAD y se sometieron a un acoplamiento proteína-proteína para verificar la posible interacción entre ambas utilizando el *software* Cluspro, se seleccionó el mejor modelo de los 20 obtenidos basado en el mínimo de energía para su interacción y el equilibrio electrostático. Se observó interacción en el extremo *N*-terminal de ambas proteínas como se muestra en la figura 6 destacado en morado, así como el centro catalítico predicho previamente por nuestro grupo de investigación (Durán-Pérez, 2014). Se observó que los residuos críticos H307, H312 y K309 de GCAD interactúan con el extremo C-terminal de IGCAD (P224, E225, K226, R227, R228, K229, H230, I231, Q232, E233, L234, R235, E237, R238, V239, G240). Así mismo, se comprobó el tipo de interacciones entre ambas proteínas mediante PDB-SUM (Laskowski y col., 2018) las interacciones observadas fueron no covalentes (fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas), puentes de hidrógeno y puentes de sal (Figura 7).

GCAD-IGCAD

A



B

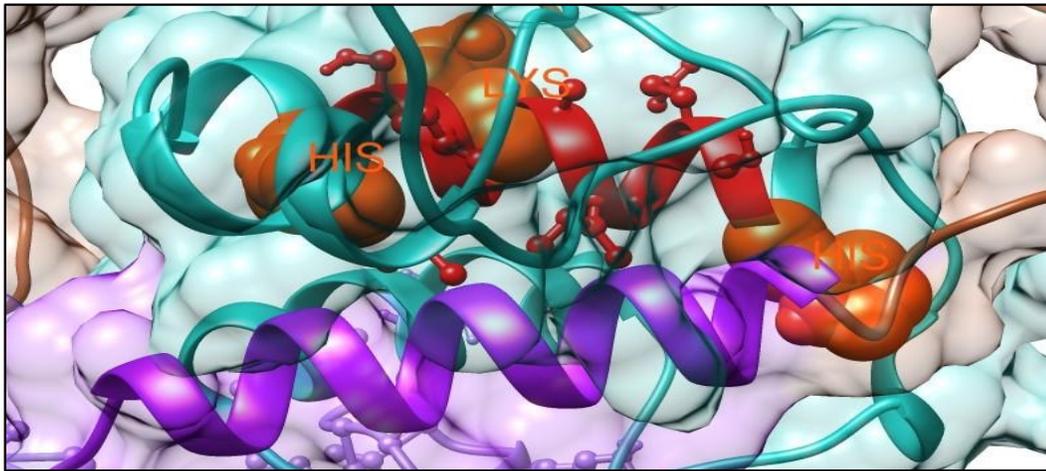


Figura 6. Interacción GCAD-IGCAD. A) Se muestra el acoplamiento proteína-proteína entre GCAD-IGCAD. GCAD se muestra en verde, IGCAD en café. Se destaca el dominio CIDE-N de ambas proteínas en morado, así como el centro catalítico de GCAD en rojo. B) Interacción del centro catalítico de GCAD en el extremo C-terminal con los residuos H-K-H destacados en naranja con el extremo C-terminal de IGCAD destacado en morado.

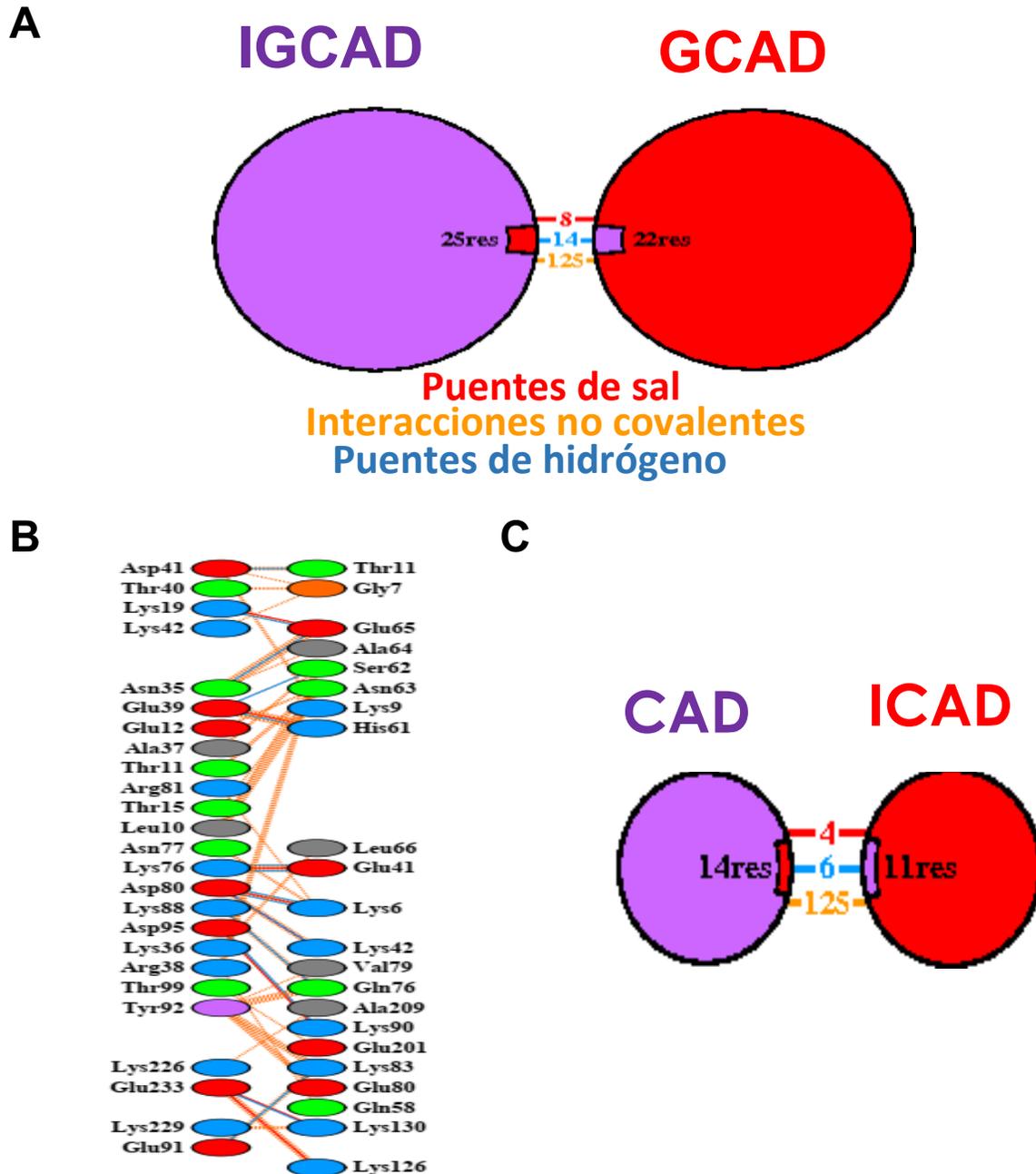


Figura 7. Principales enlaces entre GCAD-IGCAD. A) se destacan las interacciones entre GCAD e IGCAD entre 25 y 22 residuos de ambas proteínas respectivamente, que se encuentran situados en el extremo N-terminal. B) Residuos específicos de la interacción y sus enlaces. C) Enlaces entre CAD e ICAD del ser humano (figura construida con base en PDBsum de Laskowski y col., 2017).

9.2 Purificación de rIGCAD

Se purificó rIGCAD siguiendo el protocolo de purificación de nuestro laboratorio por medio de cromatografía de afinidad a metales divalentes, como resultado se obtuvo una proteína de 43 kDa (Figura 8), coincidiendo con el peso molecular de la proteína obtenida *in silico* (42.71 kDa).

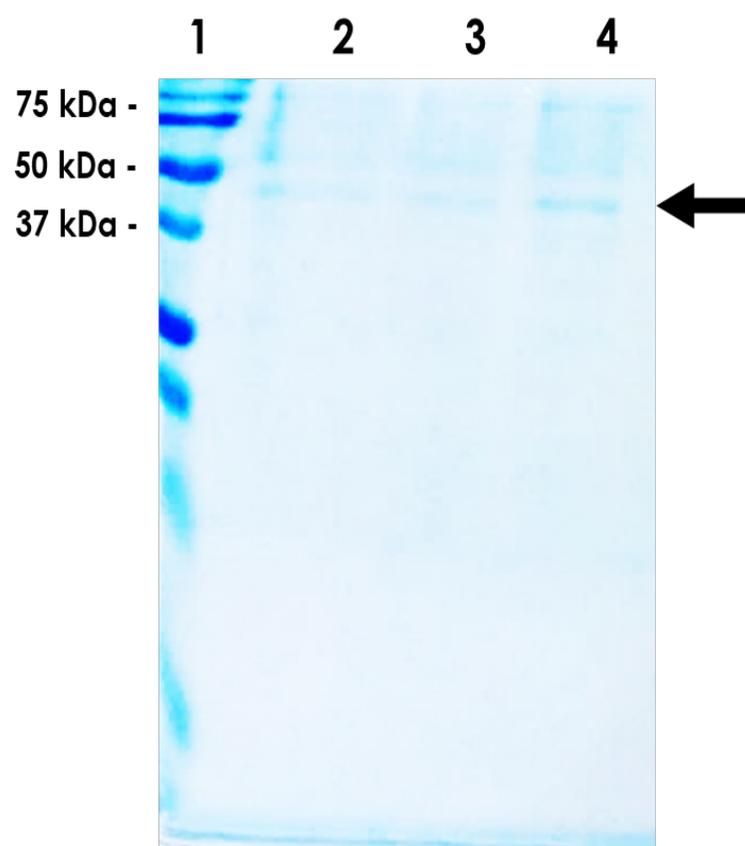


Figura 8. Purificación de rIGCAD. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2-4: Purificaciones primera elución rIGCAD 43kDa.

9.3 Determinación de los niveles de IgG α -IGCAD Ag-específicos

La proteína IGCAD recombinante (rIGCAD) fue empleada para la inmunización de ratones de la cepa C/57BL6 de 8 semanas de edad, los ratones fueron inmunizados con 25 μ g de proteína. Se recolectó el suero pre-inmune e inmune para evaluar la respuesta humoral evocada por la proteína. Posteriormente se realizó la titulación de los anticuerpos producidos contra la proteína rIGCAD empleando diluciones de los sueros a 1:100, 1:500 y 1:1000 (Figura 9). Se observó una reactividad tres veces mayor en el suero inmune con respecto al suero pre-inmune a una dilución de 1:100, a diferencia de lo observado en las diluciones 1:500 y 1:1000 como se puede apreciar en la figura. Con respecto a cuando se evaluó la reactividad de los sueros empleando como Ag el extracto crudo de *G. intestinalis* se tuvo tres veces menos reactividad que con la proteína rIGCAD no obstante, si hay un reconocimiento de la proteína ya que esta reacción es más elevada que con el suero pre-inmune.

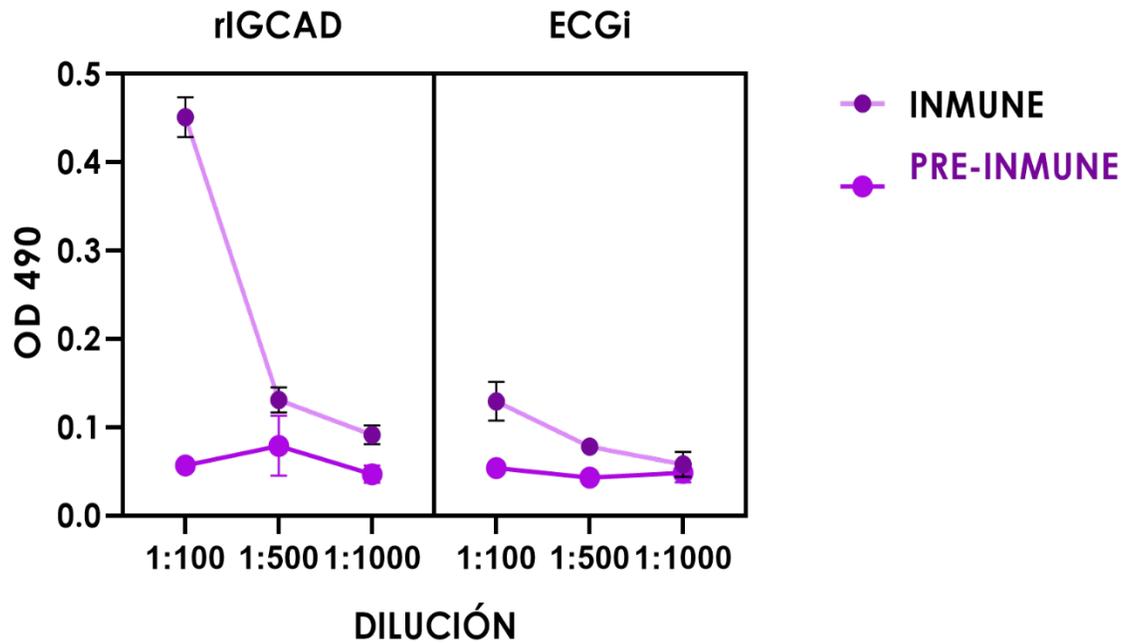


Figura 9. Niveles de IgG específicos α -IGCAD. Los niveles de IgG Ag-específicos fueron obtenidos mediante ELISA empleando como Ag 20 μ g de rIGCAD y el extracto crudo de *G. intestinalis*. En el suero inmune 1:100 se obtuvo 3 veces más reactividad que en el suero pre-inmune. Con respecto a la reactividad con el extracto crudo de *G. intestinalis* se observó más baja reactividad que con la proteína rIGCAD, pero más elevada que el suero pre-inmune.

9.4 Evaluación inmunoquímica de rIGCAD

La antigenicidad de rIGCAD se confirmó mediante *Western blot* empleando el suero de los ratones inmunizados con la proteína. Como control se utilizó suero de los ratones inmunizados con PBS. El resultado obtenido es una banda observada con un peso estimado de 43kDa (Figura 10, panel A), el cuál coincide con el peso de la proteína estimado *in silico* mismo que se puede apreciar en el carril 2 que corresponde al suero de los ratones inmunizados con la proteína. Se evaluó también la respuesta inmunológica humoral evocada por rIGCAD empleando como antígeno el extracto crudo de *G. intestinalis* (Figura 10, panel B). Se pudo detectar la presencia de una banda consistente con el peso molecular de IGCAD.

9.5 Análisis de la interacción GCAD-IGCAD *in vitro*

Para determinar si hay una interacción entre GCAD-IGCAD *in vitro* se realizó un ensayo *pull down* basado en la presencia del tag de seis histidinas con el que fueron purificadas las proteínas recombinantes, por ello ambas proteínas fungieron como carnada y el lisado de *G. intestinalis* como presa. Al emplear la proteína recombinante de 55 kDa rGCAD como carnada, el anti-IGCAD fue incapaz de detectar la presencia de IGCAD en la elución del complejo, lo cual puede ser debido a la interferencia en la interacción de la proteína de fusión sumo en el extremo *N*-terminal de la recombinante GCAD (Figura 6 A). Por el contrario, cuando se utilizó rIGCAD como carnada sí fue posible detectar la proteína GCAD en la elución del complejo observando así una banda con un peso estimado de 42 kDa que coincide con el peso molecular de GCAD (Figura 6 B), lo cual sugirió una interacción física entre ambas proteínas.

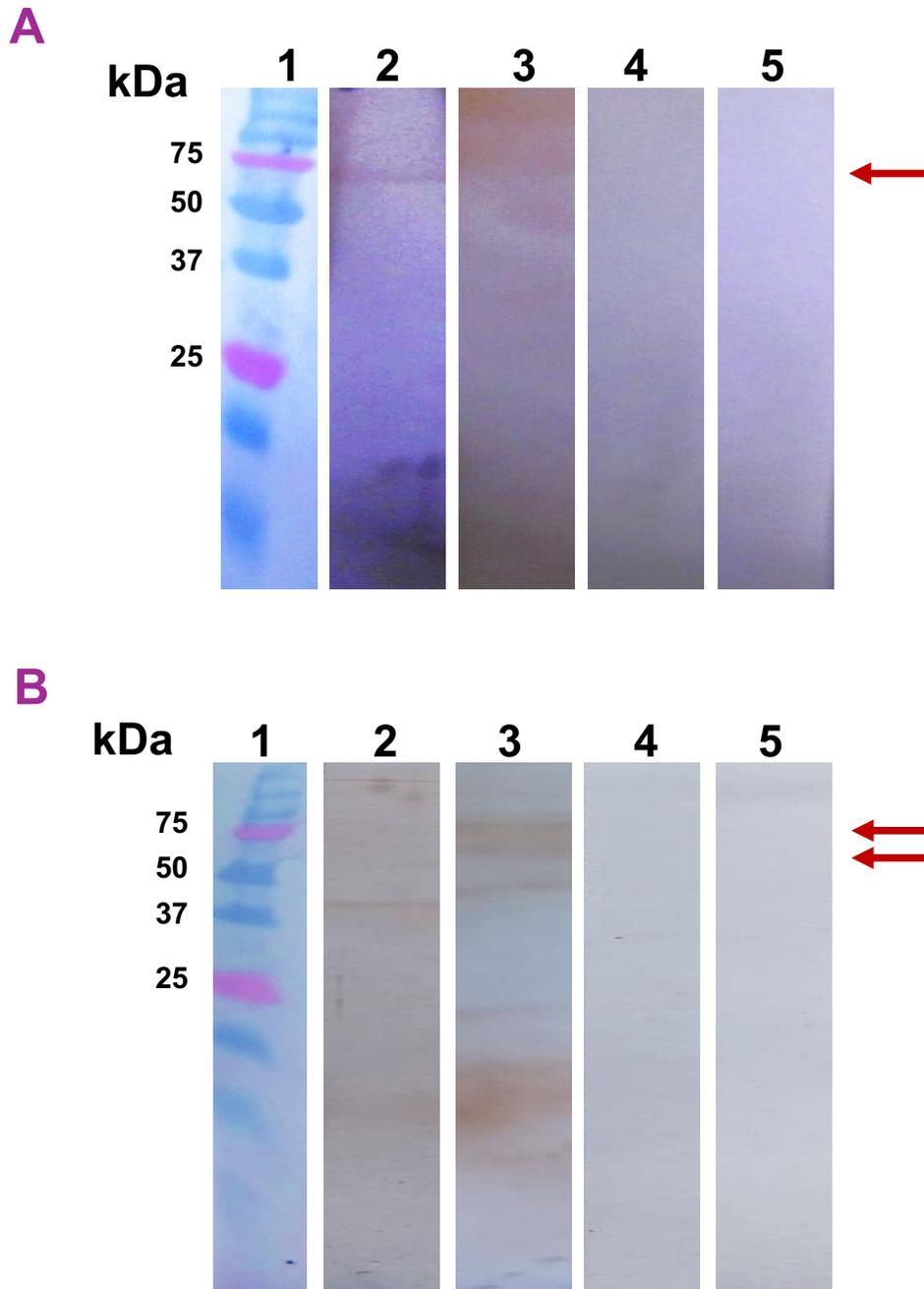


Figura 10. Evaluación de la interacción GCAD-IGCAD *in vitro*. A) Elución rGCAD como carnada. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: anti-CAD ser humano; Carril 3: anti-IGCAD; Carril 4: Blanco PBS-T; Carril 5: Testigo negativo anti-IgG conejo. B) Elución rIGCAD como carnada. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: anti-IGCAD; Carril 3: anti-CAD ser humano; Carril 4: Blanco PBST; Carril 5: Testigo negativo anti-IgG conejo.

9.6 Identificación in silico de caspasas-like de *G. intestinalis*

Para la identificación de las peptidasas con similitud a las caspasas utilizamos como base para la búsqueda la secuencia aminoacídica de la pro-caspasa-3 de *H. sapiens* (GenBank NP_004337.2) para realizar un DELTA-BLAST en el NCBI como resultado se obtuvo la separasa (GenBank ESU44720.1) y la transaminasa de anclaje GPI (GenBank XP_001707708.1) de *G. Intestinalis* (Cuadro 1), quienes presentaron un porcentaje de identidad del 39% y 31% respectivamente, no obstante se obtuvo un valor de E en ambos casos mayor a 0, lo que significa que la región donde ambas secuencias fueron alineadas es muy corta pero con alta similitud.

Cuadro 1. Identificación *in silico* de caspasas de *G. intestinalis*

| NCBI | Nombre | % Cobertura | % identidad | Valor E |
|-----------------------|-----------------|--------------------|--------------------|----------------|
| XP_001707751.2 | Separasa | 13% | 39% | 0.65 |
| XP_001707708.1 | TAGPI | 5% | 31% | 3.5 |

9.7 Análisis de dominios conservados de caspasas-like identificadas

En la separasa se observó que contiene el dominio tipo CHAT (del inglés, *Caspase HetF Associated with Tprs*), el cual se ha observado está presente en las peptidasas del clan CD que incluye las caspasas, además del dominio tipo separasa. Ambos se encuentran en la región 1397 a 1609 de la secuencia aminoacídica que contiene 1617 aminoácidos. Con respecto a la transaminasa de anclaje GPI identificada, la herramienta de dominios conservados nos mostró que contiene un dominio tipo caspasa a lo largo de su secuencia aminoacídica en la región 19-233, considerando que esta posee 250 aminoácidos, dicho dominio se ha descrito en homólogos a la enzima convertidora de interleucina-1 β , conocida mayormente como caspasa-1 (Ramos-Guzmán y col, 2023).

Se predijo la estructura terciaria de ambas proteínas con ayuda de los servidores en línea phyre2 y con la herramienta RossetaCM de modelaje comparativo de alta resolución. Se obtuvo la estructura completa separasa (Figura 12) que coincide con el dominio predicho utilizando la base de datos de dominios conservados. De acuerdo con la predicción obtenida de SWISS MODEL esta estructura tiene un porcentaje de identidad del 21.7 % con la separasa de *Saccharomyces cerevisiae*, 34.45 % con la separasa de *Caenorhabditis elegans* y 26.16 con la separasa de *H. sapiens*. Estos datos coinciden con la predicción de Phyre2 (Cuadro 2), donde además del porcentaje de identidad se obtuvo el porcentaje de confianza, el cual indica que a un porcentaje mayor al 90% las proteínas comparadas son probablemente homólogas por la arquitectura de sus regiones conservadas. Con respecto a la separasa identificada las

tres proteínas con las que se basó para realizar la predicción de la estructura terciaria son separadas y el porcentaje de confianza es casi del 100% (Cuadro 3).

Se predijo la estructura de la Transaminasa de anclaje GPI (Figura 13), la estructura terciaria de esta proteína presenta similitud estructural con las leguminasas (también conocidas como endopeptidasas de asparagina), caspasas y metacaspasas. Los datos obtenidos en SWISS MODEL mostraron que está tenía un porcentaje de identidad del 23.86 % con la leguminasa de *Arabidopsis thaliana*, 18.75 % con la caspasa 6 de *Homo sapiens*, 14.49 % con la metacaspasa 2 de *Trypanosoma brucei* y 13.19 % con la caspasa-3 de *H. sapiens* (Cuadro 4). Dichos resultados coinciden en parte con lo obtenido en Phyre 2, donde se observó que también tiene similitud con las endopeptidasas mencionadas anteriormente, no obstante, el porcentaje de identidad con las metacaspasas 1 y 4 es mayor (24%) en comparación con las endopeptidasas de asparagina. La confianza obtenida fue mayor al 90 % en todos los casos, sin embargo, por los resultados obtenidos la proteína podría tener función de endopeptidasa de asparagina y metacaspasa. Más estudios deberían de realizarse para analizar más a profundidad la función de esta proteína y si participa en la muerte celular de *G. intestinalis*. También se destaca que cada una de estas endopeptidasas se encuentran dentro del clan CD (Cuadro 4).

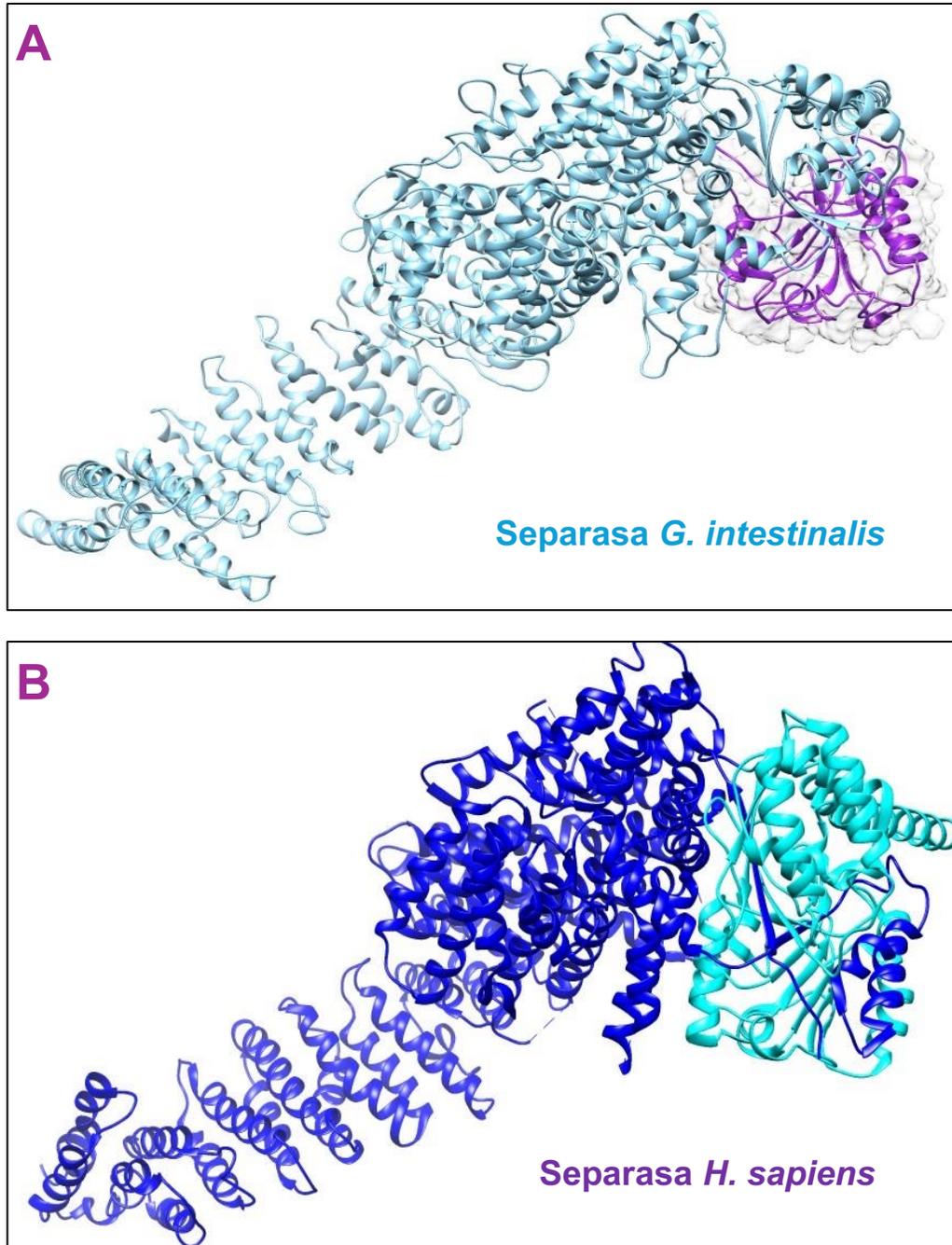


Figura 11. Estructura 3D de la separasa de *G. intestinalis*. A) Estructura de la separasa de *G. intestinalis* obtenida por homología comparativa, dominio catalítico tipo caspasa se resalta en morado (residuos 1397-1609). B) Estructura cristalizada de la separasa de *H. sapiens* (Yu y col., 2021), dominio catalítico tipo caspasa en cian.

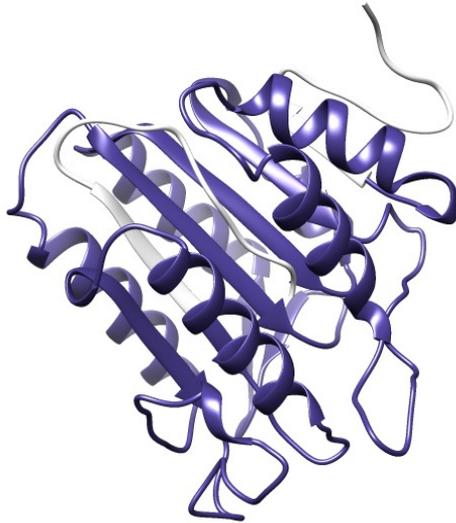
Cuadro 2. Comparación de la estructura 3D predicha *in silico* de la separasa de *G. Intestinalis* con modelos 3D de separasas cristalizadas

| % Confidencia | % de identidad | Templado |
|----------------------|-----------------------|---------------------------------|
| 99.8 | 22 | Separasa <i>C. thermophilum</i> |
| 99.6 | 22 | Separasa <i>S. cerevisiae</i> |
| 99.5 | 30 | Separasa <i>C. elegans</i> |

Cuadro 3. Comparación de la estructura 3D predicha *in silico* de la TAGPI, G. *Intestinalis* con modelos 3D de otras peptidasas del clan CD cristalizadas

| % Confidencia | % de identidad | Templado |
|--------------------------|---------------------------|--|
| 100 | 21 | Endopeptidasa de asparagina |
| 99.5 | 24 | metacaspasa-4 |
| 99.2 | 24 | metacaspasa-1 |
| 98.6 | 21 | Paracaspasa malt1 |
| 98.1 | 20 | Procaspasa-1 |
| 98 | 17 | Caspasa-8 |
| 97.9 | 14 | Caspasa-3 |

A



B



Figura 12. Estructura 3D de la Transaminasa de anclaje GPI de *G. intestinalis*. A. En azul marino se destaca el dominio catalítico tipo caspasa que incluye los residuos 19-233 de la secuencia de 250 aa. B. predicción de la estructura terciaria de la caspasa-3 de *Homo sapiens*, en rosa se muestra el dominio tipo caspasa de los residuos 7-247 del total de 247 aa. Se realizó la predicción en Robbeta por modelaje comparativo y el análisis en Phyre2.

9.8 Diseño de iniciadores específicos para caspasas-like de *G. intestinalis*

Para el diseño de iniciadores específicos se empleó la secuencia nucleotídica que codifica para el dominio catalítico tipo caspasa de la separasa y transaminasa de anclaje GPI mostrados en el cuadro 4. Empleando estos iniciadores se realizó una PCR virtual donde se generaron las amplificaciones con los sitios de restricción. Se obtuvo un producto de PCR de 654 pb para la *separasa* y 729 pb para la transaminasa de anclaje GPI (*TAGPI*). Los genes fueron digeridos y ligados al vector de expresión pcDNA6 His A. Con base en el diseño de la construcción recombinante se obtuvo una proteína recombinante para la *separasa* de 251 aa, 28.18 kDa y pI de 6.56 (Figura 14). Con respecto a la *TAGPI* se logró una proteína de 263aa, 29.71 kDa y un pI de 6.5 (Figura 15).

Cuadro 4. Diseño de los iniciadores específicos para la identificación de las caspasas-like

| Gen (Acceso GenBank) | Iniciadores | Sitio de restricción | Tamaño (pb) |
|--|---|----------------------|-------------|
| <i>Separasa</i> (fragmento) (XM_001707699.2) | FSGI-ACT GGATCC ATGGACAGCGCATTITATAGGTTTC | BamHI | 654 |
| | RSGI-CAT GAATTC GTA CTTGGTACTTGAGTCGCC | EcoRI | |
| <i>Transaminasa de anclaje GPI</i> (XM_001707656.1) | FTAGPI-ATC GGATCC ATGACTGTCTTGCTCGGTGTGG | BamHI | 729 |
| | RTAGPI-ACA TCTAGAT GGCAATGCGTCATTTCTG | XbaI | |

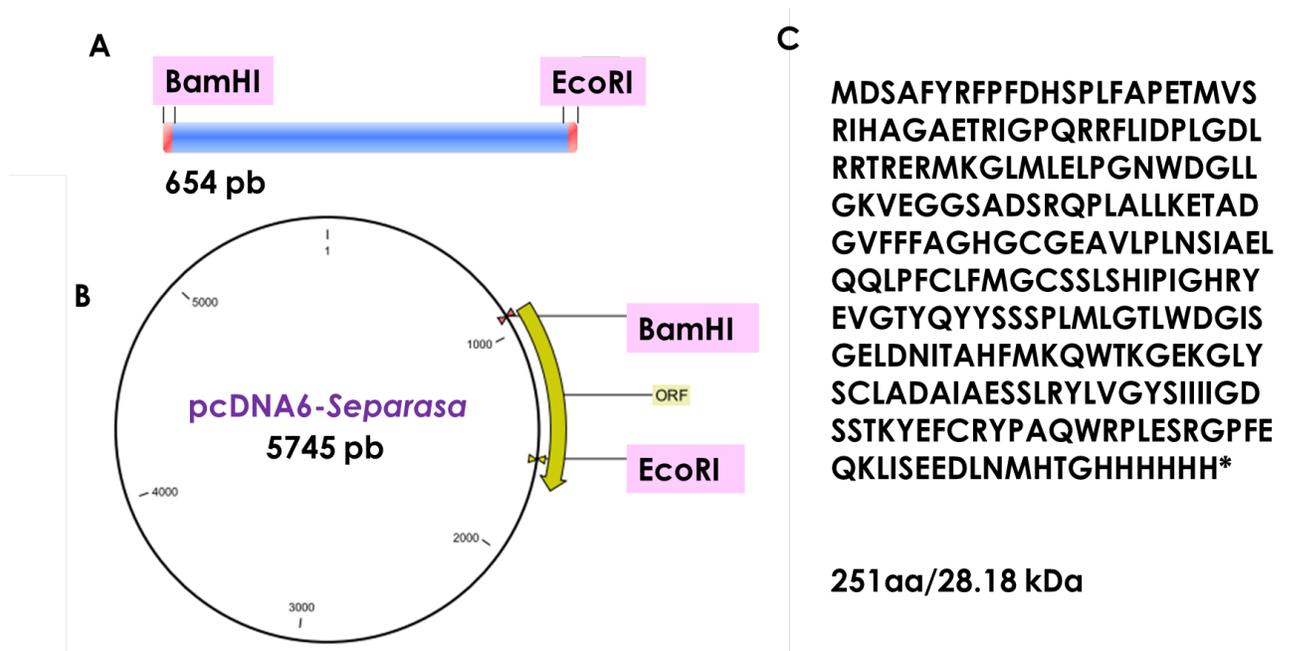


Figura 13. Clonación *in silico* del dominio catalítico tipo caspasa de la separasa. Se obtuvo un producto de PCR de 654 pb (panel A) con los sitios de restricción para las enzimas BamHI y EcoRI. La digestión y ligación tanto del producto de PCR como del vector pCDNA6 A nos permitió obtener una construcción de 5,744 (panel B) que adicionará a la secuencia codificante para la proteína un tag de 6 histidinas que permitirá la purificación de la recombinante como se muestra en el panel C.

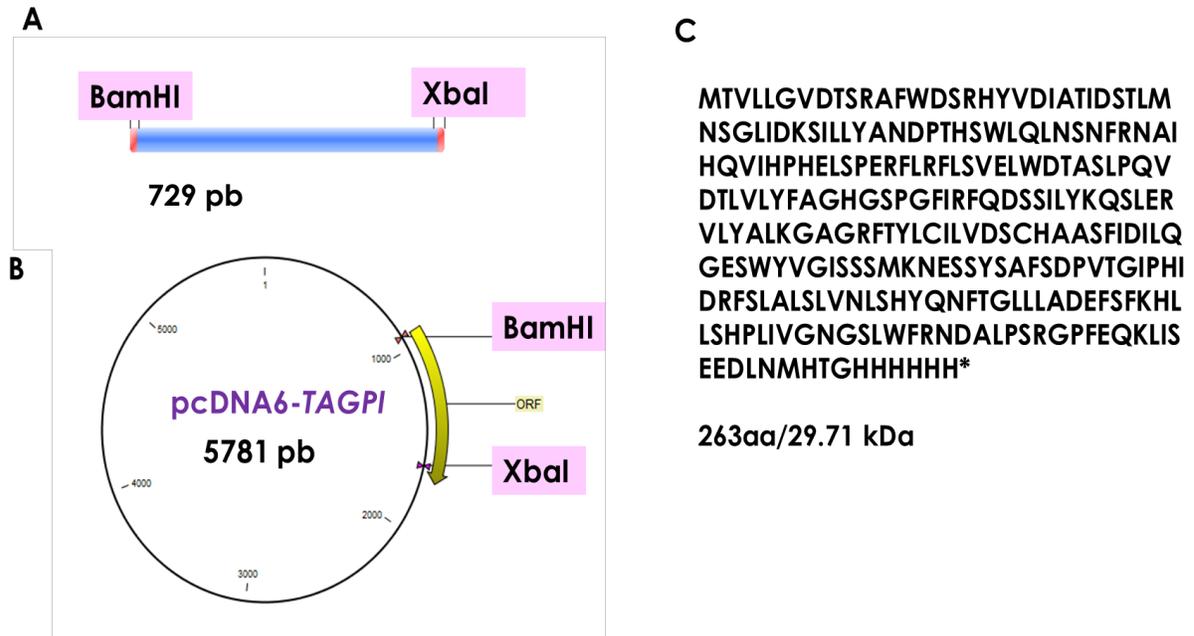


Figura 14. Clonación *in silico* del dominio catalítico tipo caspasa de la TAGPI. Se obtuvo un producto de PCR de 729 pb (panel A) con los sitios de restricción para las enzimas BamHI y XbaI. La digestión y ligación tanto del producto de PCR como del vector pCDNA6 A nos permitió obtener una construcción de 5,781 (panel B) que añadirá a la secuencia codificante para la proteína un tag de 6 histidinas que permitirá la purificación de la recombinante como se muestra en el panel C.

9.10 Identificación inmunoquímica de las caspasas 3-like

Se logró la detección de proteínas en el extracto proteico de *G. intestinalis*. Se utilizó el anticuerpo dirigido contra caspasa-3 de *H. sapiens*, una de ellas es una proteína de aproximadamente 50 kDa y la otra de alrededor de 150 kDa. De acuerdo con el análisis *in silico* realizado previamente donde se buscó identificar ortólogos de caspasa-3, se lograron identificar las proteínas observadas en los cuadros 2, 3 y 4, donde se destacan la separasa y la transaminasa de anclaje GPI que tienen dominio catalítico tipo caspasa. De las proteínas detectadas con el *Western blot* la única que podría coincidir en peso molecular es la separasa de 178 kDa, la que se observó de mayor intensidad (50 kDa) podría tratarse de otra proteína que fue imposible detectar *in silico* (figuras 14, 15 y 16).

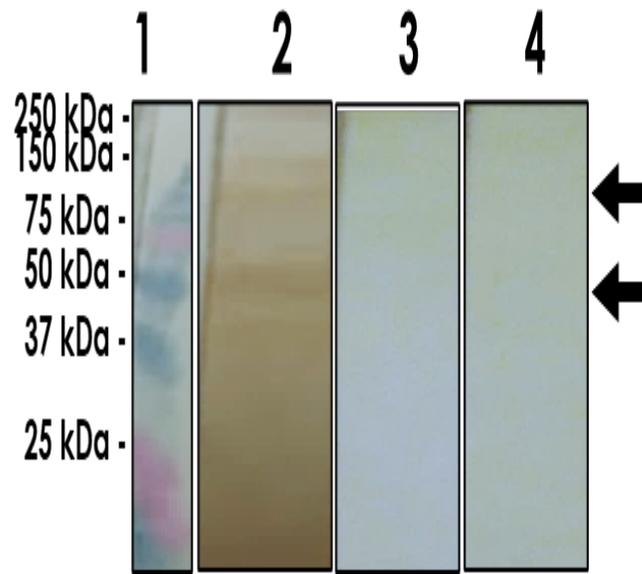


Figura 15. Detección de las proteínas tipo caspasa-3 en *G. intestinalis*. Carril 1. Marcador de peso molecular (BioRad). Carril 2: anti-caspasa-3 de ser humano. Carril 3: α -IgG de conejo. Carril 4: PBS-T.

9.11 Identificación *in vitro* de las caspasas-3-like

A partir de la biomasa recolectada se extrajo DNA genómico de *G. intestinalis* mediante el protocolo previamente establecido por Aljanabi & Martinez, (1997). El DNA extraído fue visualizado en un gel de agarosa al 1 % teñido con SYBR™ Gold, como se describió en el apartado de materiales y métodos, obteniendo como resultado una banda íntegra de peso molecular consistente con el tamaño del DNA genómico de *G. intestinalis* de 11Mb (Figura 17).

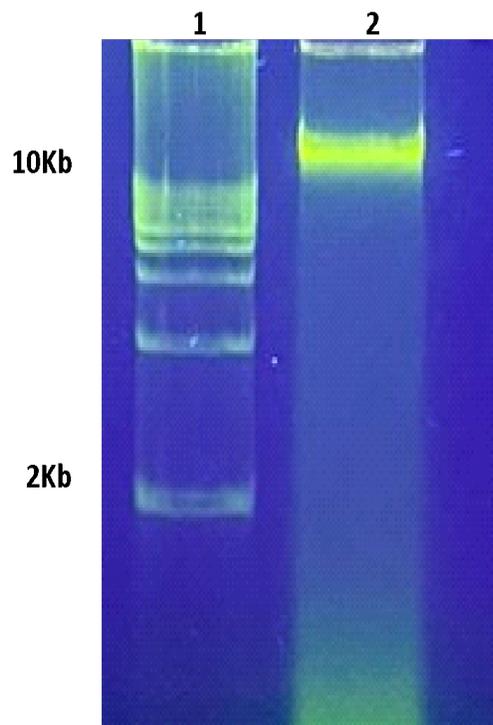


Figura 16. DNA genómico de *G. intestinalis*. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 a 10 kb. Carril 2: DNA genómico *G. intestinalis*.

9.12 Clonación de las proteínas tipo caspasa-3 de *G. intestinalis*

Se clonaron las regiones de los genes que codifican para la región del dominio catalítico tipo caspasa de la separasa y la transaminasa de anclaje GPI (*TAGPI*) de *G. intestinalis* empleando los iniciadores específicos diseñados. Se obtuvo un fragmento con un tamaño estimado de 654 pb para la región de la *separasa* y 729 pb para la *TAGPI* (Figura 18) que fue visualizado en un gel de agarosa al 1.7 % teñido con SYBR™ Gold, que coincide con los resultados obtenidos *in silico*. Además, posee sitios de restricción específicos para digestión y ligación con el vector de expresión plasmídica. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados (registro de GenBank *TAGPI* de *G. intestinalis* PP578664.1). Asimismo, se logró la purificación del vector de expresión.

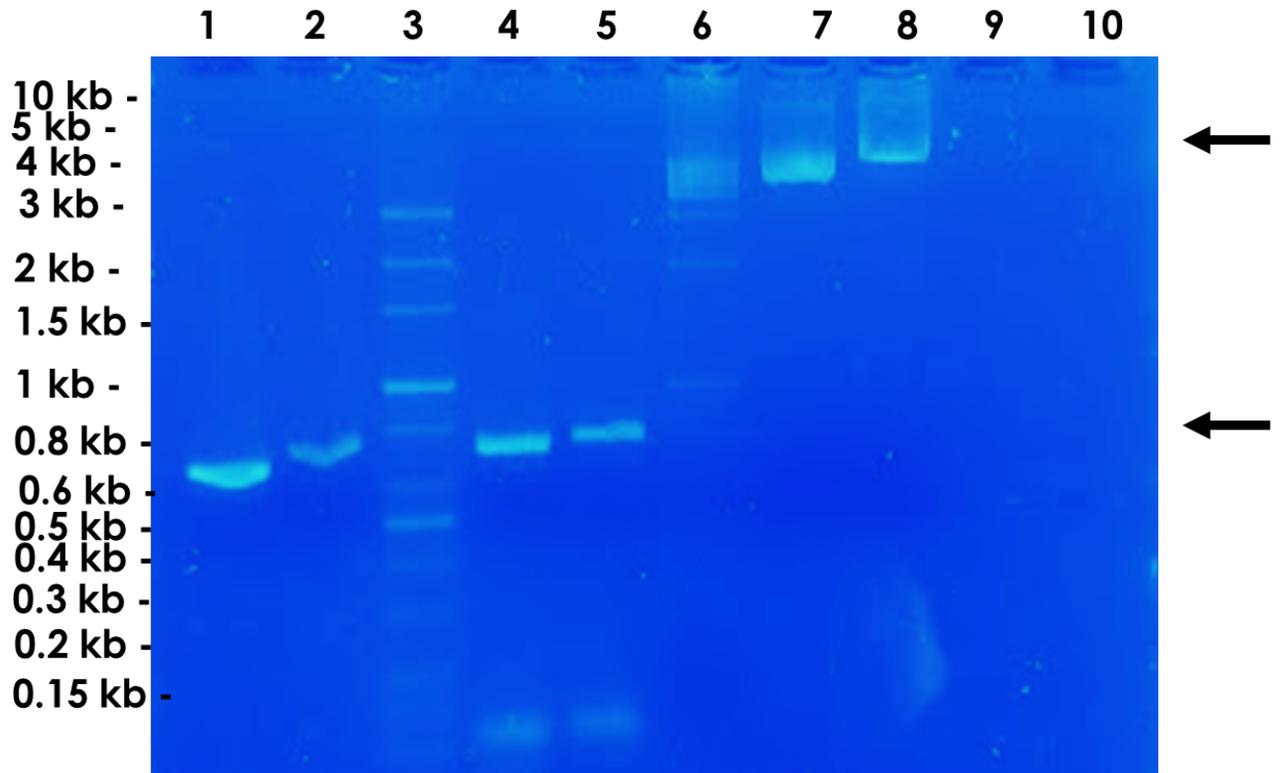


Figura 17. Clonación de las regiones catalíticas tipo caspasa de la separasa y de la transaminasa de anclaje GPI (TAGPI) de *G. intestinalis*. Carril 1 y 2.: Eluciones 1 y 2 de la región de 654 pb de la *separasa* (Tm 65 °C). Carril 3: Marcador de peso molecular mid range (*Jena bioscience*). Carril 4 y 5: Eluciones 1 y 2 de la región de 729 pb de la *TAGPI* (Tm 56 °C). Carril 6: Marcador 1-10 kb (*Jena bioscience*). Carril 7 y 8: Eluciones 1 y 2 pcDNA™6/myc-His A.

9.13 DNA recombinante de caspasa-3, *separasa* y la *TAGPI*

Los productos de PCR de los dominios de las proteínas tipo caspasa-3 fueron clonados, digeridos y ligados al vector. La construcción fue visualizada como una banda de un tamaño aproximadamente de 5.745 Kb para la *separasa* y 5.781 kb para la *TAGPI* consistente con lo predicho *in silico*. Ya que fueron visualmente más grandes que el vector vacío sin digerir. Como control negativo se empleó el plásmido vacío y sin digerir, observado como una banda de un tamaño 5 Kb (Figura 19), así como una muestra de reacción sin la ligasa, donde se pueden observar las bandas correspondientes al amplicón y plásmidos digeridos.

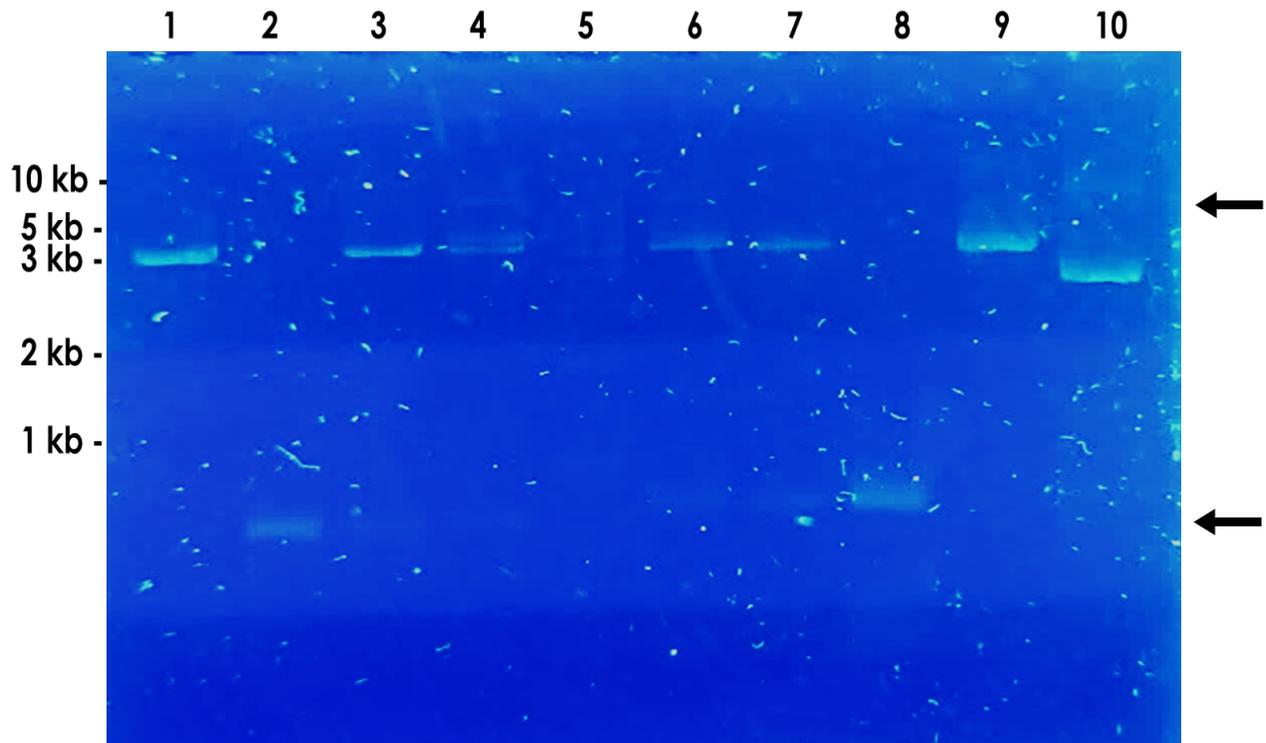


Figura 18. Construcción recombinante de las regiones catalíticas tipo caspasa de la separasa y de la transaminasa de anclaje GPI (TAGPI). Carril 1: Vector *pcDNA6mycHis6 A* digerido (*EcoRI* y *BamHI*). Carril 2: Región de la *separasa* digerida (*EcoRI* y *BamHI*). Carril 3: Control negativo de ligación *separasa*; Carril 4: Ligación *separasa* 5745 pb; Carril 5. Marcador de peso molecular 1-10 kb (*Jena bioscience*). Carril 6: Ligación *TAGPI* 5.781 kb. Carril 7: Control negativo de ligación *TAGPI*. Carril 8: *TAGPI* digerida (*XbaI* y *BamHI*). Carril 9: Vector *pcDNA6mycHis6 A* digerido (*XbaI* y *BamHI*). Carril 10: Vector *pcDNA6mycHis6 A* sin digerir.

9.14 Transformantes de los dominios catalíticos de caspasa-3, *separasa* y de la TAGPI de *G. intestinalis*

La construcción fue empleada para la transformación de una cepa de *E. coli* TOP10 y BL21(DE3) para la propagación del plásmido y expresión recombinante del dominio catalítico tipo caspasa de la *separasa*, respectivamente. Las células transformadas se propagaron en medio TSA suplementado con ampicilina, y posterior al desarrollo de colonias transformantes, se seleccionaron de 8 de ellas al azar, las cuales fueron verificadas como portadoras del fragmento génico mediante PCR, no obstante, fue imposible la detección de colonias positivas con la construcción *separasa-pCDNA6*. Estas colonias fueron propagadas y almacenadas a -80°C para su posterior verificación (Figura 20 y 21).

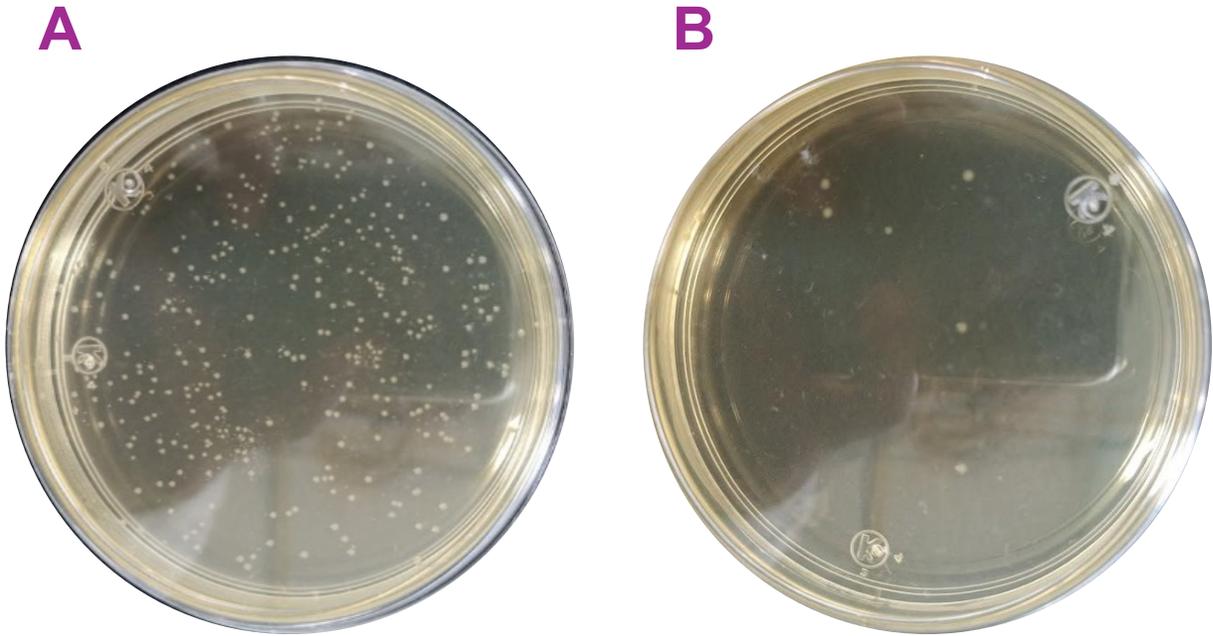


Figura 19. Transformantes con el gen de la *separasa*. A) Colonias *E. coli* TOP10 y BL21 (DE3) (B) transformadas con la construcción *separasa*-pcDNA6 en medio TSA suplementado con 100 µg/mL de ampicilina.

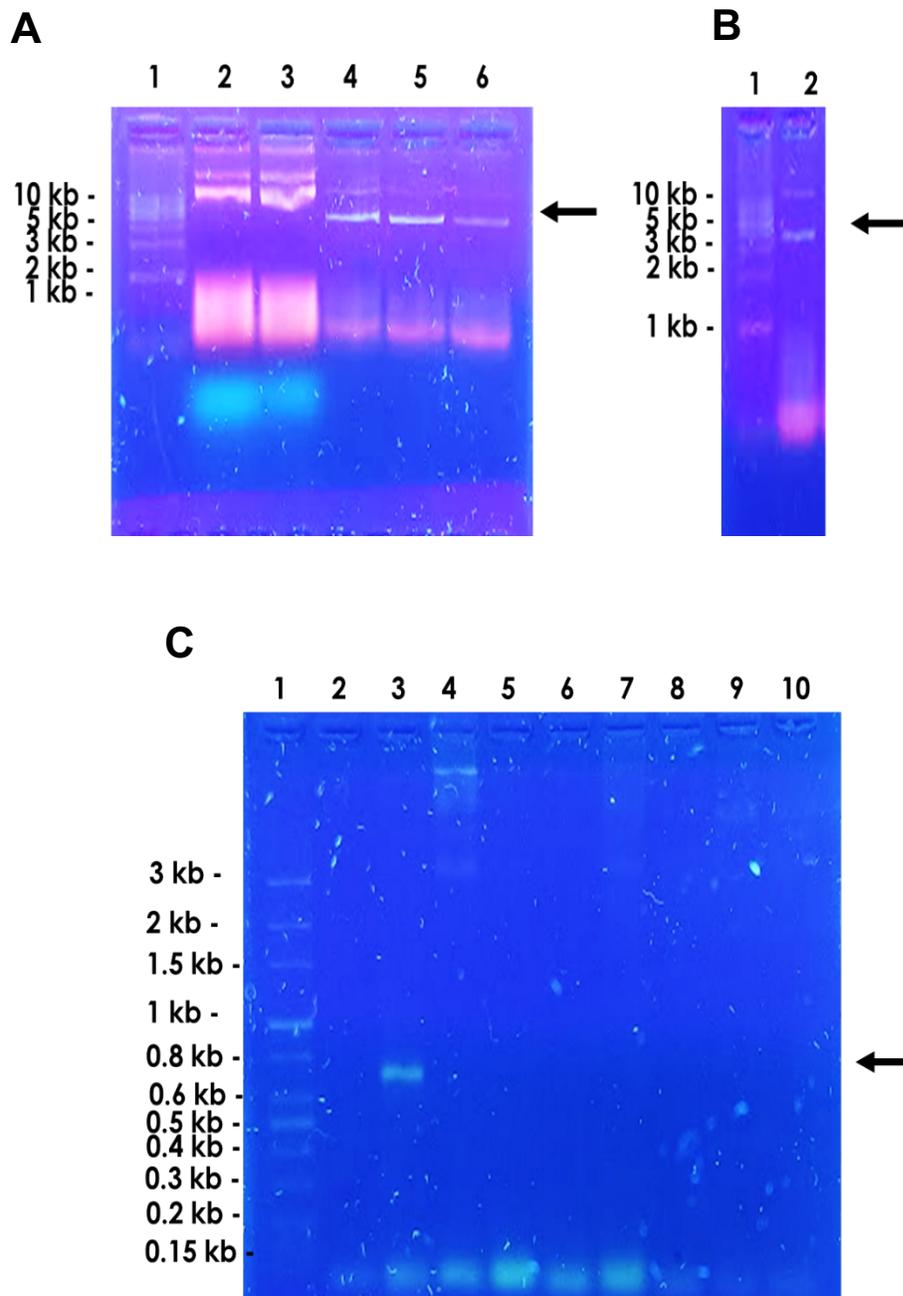


Figura 20. Producción recombinante del dominio catalítico tipo caspasa de la separasa A) DNA recombinante de las colonias de *E. coli* TOP10 y BL21(DE3). Carril 1: Marcador de 1 a 10 kb. Carril 2-5: Colonias *E. coli* TOP10. Carril 6: Colonia *E. coli* BL21 (DE3) 1 B) DNA recombinante de las colonias de *E. coli* BL21(DE3). Carril 1: Marcador 1 a 10 kb. Carril 2: *E. coli* BL21 (DE3) colonia 2 C) Análisis de colonias transformantes. Carril 1: Marcador mid range (*jena bioscience*). Carril 2: Blanco H₂O. Carril 3: Control positivo gDNA de *G. intestinalis*. Carril 4: *E. coli* BL21 (DE3) colonia 1. Carril 5: *E. coli* BL21 (DE3) colonia 2. Carril 6: *E. coli* BL21 (DE3) colonia 3. Carril 7: *E. coli* TOP 10 colonia 1. Carril 8: *E. coli* TOP 10 colonia 2. Carril 9: *E. coli* TOP 10 colonia 3. Carril 10: *E. coli* TOP 10 colonia 4.

La construcción fue empleada para la transformación de una cepa de *E. coli* TOP10 y BL21(DE3) para la propagación de la construcción y expresión recombinante del dominio catalítico tipo caspasa de la *TAGPI*, respectivamente. Las células transformadas se propagaron en medio TSA suplementado con ampicilina, y posterior al desarrollo de colonias transformantes, se seleccionaron 7 de ellas al azar, las cuales fueron verificadas como portadoras del fragmento génico mediante PCR. Se detectó una colonia positiva para la construcción *pCDNA6-TAGPI* de 5.781 kb que corresponde a la colonia 3 de la cepa *E. coli* BL21(DE3). Posteriormente se utilizó esta construcción para la transformación de *E. coli* TOP10, donde de igual manera se verificó por PCR la presencia de la *TAGPI* en la construcción. Estas colonias fueron propagadas y almacenadas a -80°C para su posterior verificación (Figura 21 y 22).

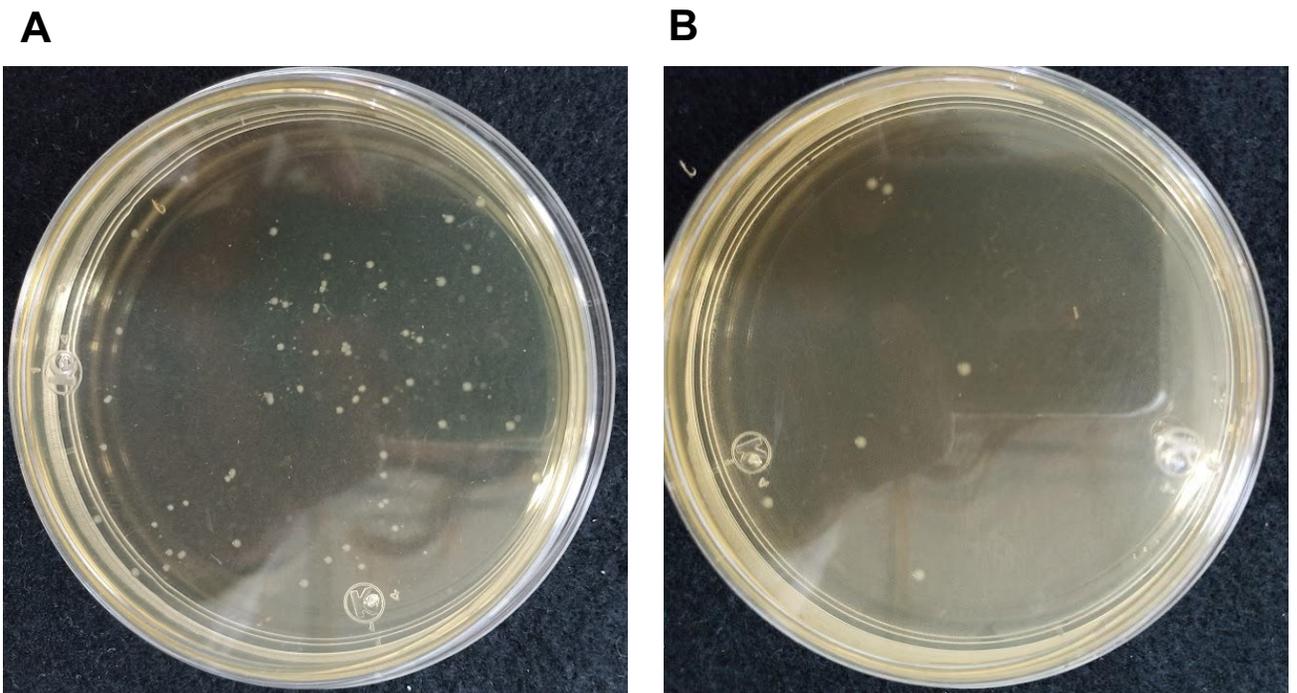
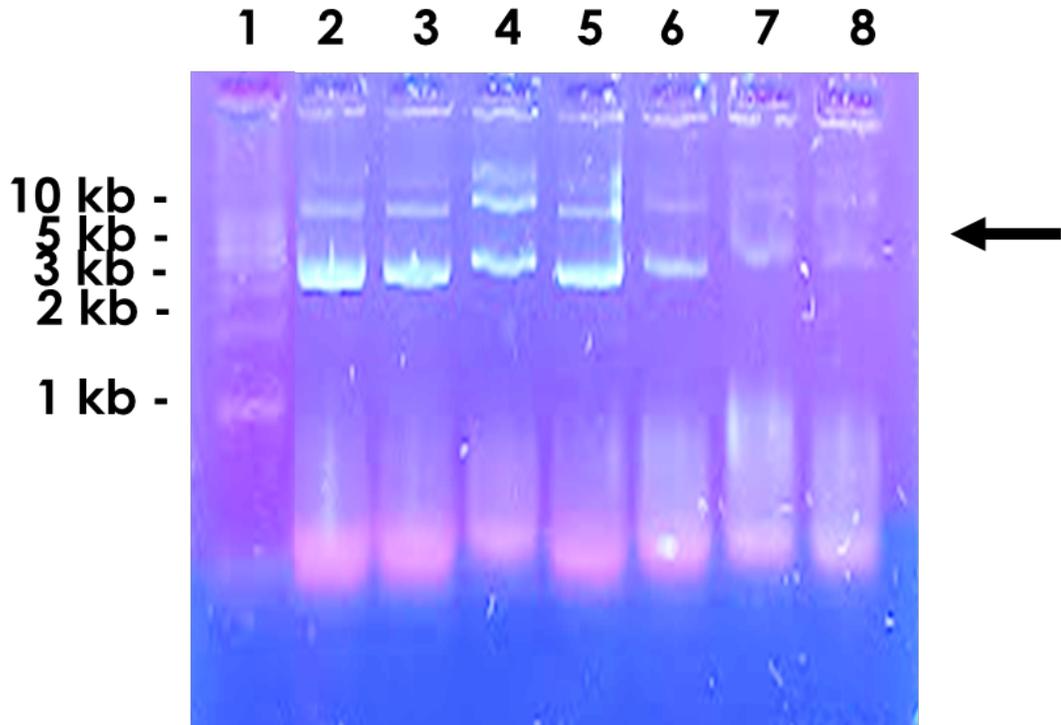


Figura 21. Transformantes con el gen *TAGPI*. A) Colonias *E. coli* TOP10 y BL21 (DE3) (B) transformadas con la construcción *TAGPI*-pcDNA6 en medio TSA suplementado con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina.

A



B

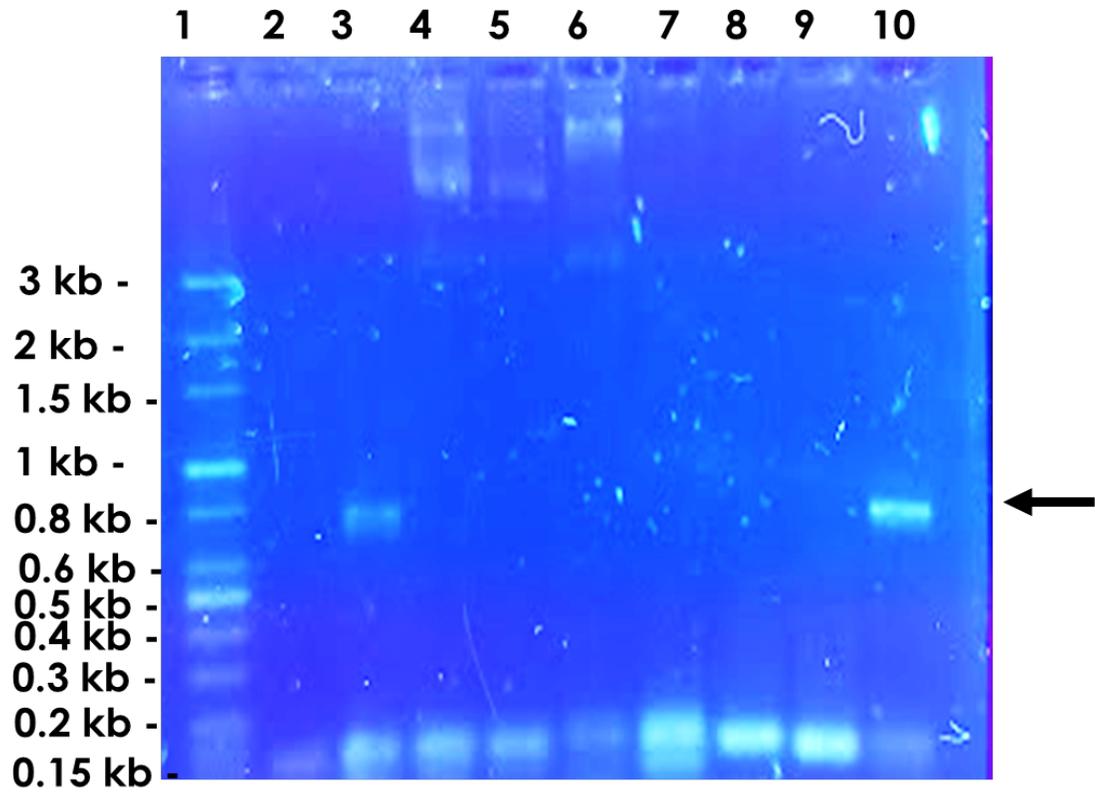


Figura 22. Producción recombinante del dominio catalítico tipo caspasa de la TAGPIGi. A) rDNA de las colonias *E. coli* TOP10 y BL21(DE3) aisladas. Carril 1: Marcador 1-10 kb; Carril 2: *E. coli* TOP10 colonia 1 TAGPI; Carril 3: *E. coli* TOP10 colonia 3 TAGPI; Carril 4: *E. coli* TOP10 colonia 4 TAGPI; Carril 5: *E. coli* TOP10 colonia 5 TAGPI; Carril 6: *E. coli* BL21 (DE3) colonia 1 TAGPI; Carril 7: *E. coli* BL21 (DE3) colonia 2 TAGPI; Carril 8: *E. coli* BL21 (DE3) colonia 3 TAGPI. B). Análisis por PCR de colonias transformantes TAGPIGi. Carril 1: Marcador; Carril 2: Blanco agua; Carril 3: Control positivo DNA genómico *G. intestinalis*; Carril 4: Control negativo pcDNA6; Carril 5: *E. coli* TOP 10 1 pcDNA-TAGPI; Carril 6: *E. coli* TOP 10 3 pcDNA-TAGPI; Carril 7: *E. coli* TOP 10 5 pcDNA-TAGPI. Carril 8: *E. coli* BL21(DE3) 1 pcDNA-TAGPI; Carril 9: *E. coli* BL21(DE3) 2 pcDNA-TAGPI; Carril 10: *E. coli* BL21(DE3) 3 pcDNA-TAGPI.

9.15 Identificación *in silico* flipasas de *G. intestinalis*

Con el objetivo de identificar las proteínas ortólogas de flipasas en el protozoario parásito *G. intestinalis*, empleamos como base para la búsqueda las secuencias de referencia de las flipasas ATP11A y ATP11C de *Homo sapiens*. Se obtuvieron 3 flipasas IA y 2 IIB como se observa en el cuadro 5. Presentaron un porcentaje de cobertura alrededor del 90%, y tuvieron porcentajes de identidad menores al 40%. Se ha reportado que las secuencias que presentan un porcentaje de identidad mayor al 40% se consideran homólogas, aunque este criterio depende de la longitud de las secuencias también. Sin embargo, debido a que estas secuencias presentan dominios funcionales altamente conservados similares a los descritos en otras flipasas se considera que son probablemente homólogos.

Cuadro 5. Identificación *in silico* de flipasas de *G. intestinalis*

| NCBI | Nombre | % Cobertura | % Identidad | E |
|-----------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------|---------------|
| XP_001710085.1 | ATPasa IA, putativa | 90% | 30.06% | 3E-81 |
| XP_001705456.1 | ATPasa IA, putativa | 90% | 19.94% | 2E-97 |
| XP_001704967.1 | ATPasa IA, putativa | 89% | 25.03% | 1E-112 |
| XP_001704293.1 | ATPasa IIB, putativa | 87% | 22.36% | 9E-29 |
| XP_001707954.1 | ATPasa IIB, putativa | 85% | 25.66% | 1E-84 |

9.16 Análisis filogenético de las flipasas de *G. intestinalis*

Las secuencias de las 14 ATPasas (también denominadas flipasas) humanas descritas hasta el momento, las identificadas en *G. intestinalis* y en otros protozoarios como como *Entamoeba histolytica*, *A. castellanii*, *Naegleria fowleri*, *T. cruzi*, *L. infantum* y *Trichomonas vaginalis* fueron utilizadas para realizar un alineamiento múltiple de secuencias y se generó un árbol filogenético (Figura 24). El alineamiento múltiple de secuencias nos mostró los dominios implicados en la fosforilación (DKTGT) y desfosforilación (DGET), estos coinciden con los observados en las flipasas de *Homo sapiens*. Con ayuda de los servidores en línea CASCLEAVE y PEPTIDE CUTTER se predijeron los sitios de reconocimiento para caspasas. Se observó que la ATPasa IA de *G. intestinalis* (XP_001705456.1) coincide en un sitio de reconocimiento de caspasas (RAND 527-530), además, estos sitios no concuerdan con los predichos *in silico* en las flipasas de *G. intestinalis*. Las ATPasas P4 son únicas porque translocan fosfolípidos a través de las membranas plasmáticas. El genoma humano codifica 14 flipasas que se organizan en cinco clases, cada clase tiene múltiples miembros: Clase 1a (ATP8A1, ATP8A2); Clase 1b (ATP8B1, ATP8B2, ATP8B3, ATP8B4); Clase 2 (ATP9A, ATP9B); Clase 5 (ATP10A, ATP10B, ATP10D); y Clase 6 (ATP11A, ATP11B, ATP11C) (Paulusma y Elferink, 2010; Van Der Mark et al., 2013). En contraste, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* contiene cinco P4-ATPasas (Drs2p, Neo1p, Dnf1p, Dnf2p, Dnf3P). Se observó en el árbol filogenético en comparación con las ATPasas de *Homo sapiens*, que las flipasas de *G. intestinalis* comparten un ancestro en común con las ATPasas-P4 de la clase 2 (ATP9A y ATP9B) específicamente las flipasas IIB (XP_001707954), IA (XP_001704967) y IIB (XP_001704293) como se puede observar en el árbol filogenético.

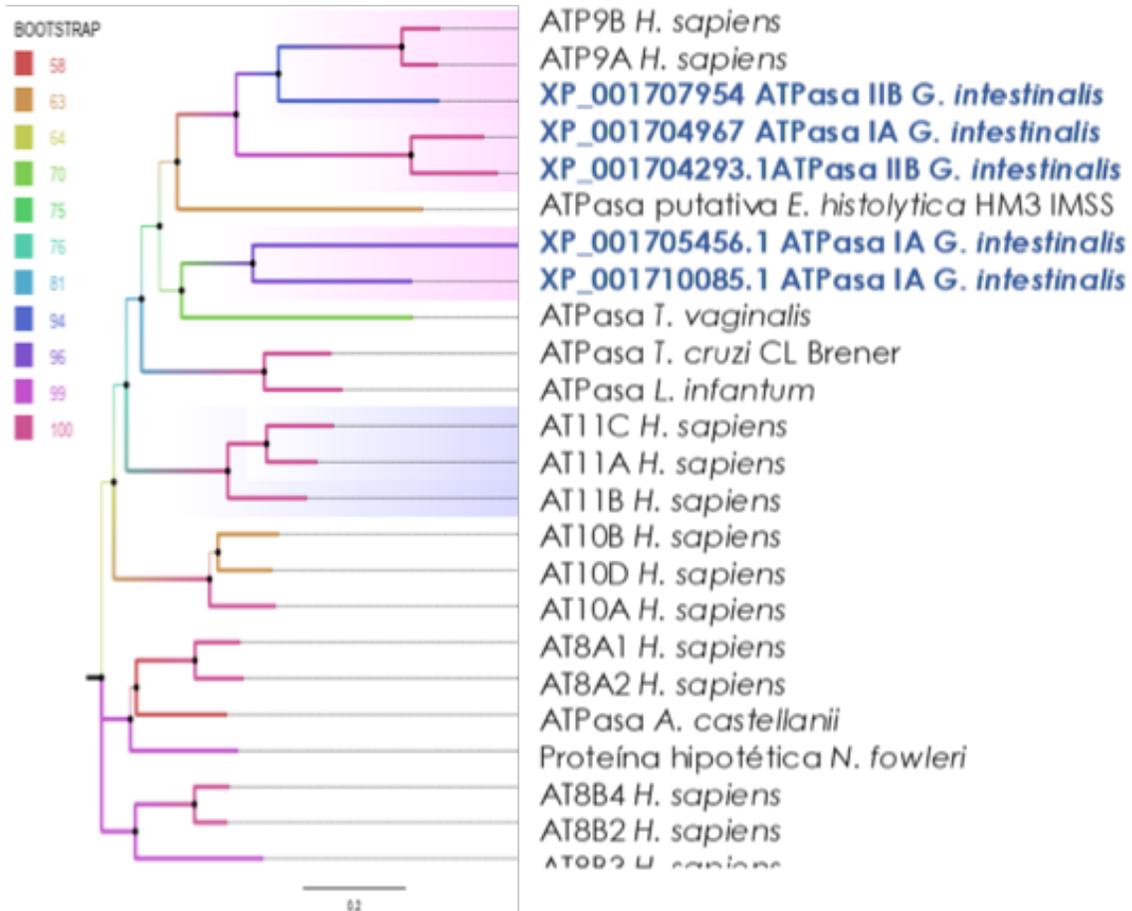
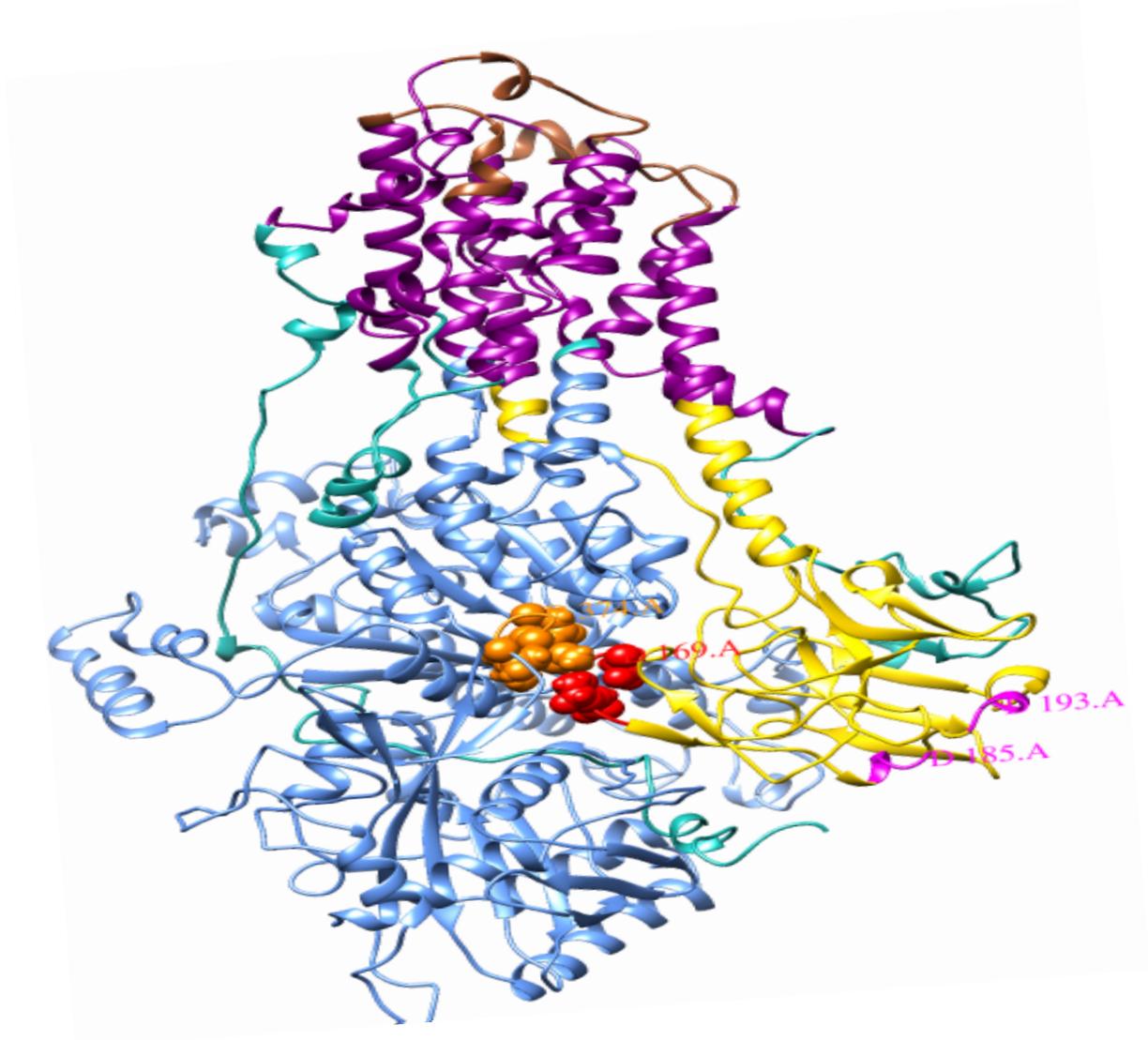


Figura 23. Análisis filogenético de flipasas de *G. intestinalis*

9.17 Modelado 3D de las flipasas de *G. intestinalis*

Se empleó la secuencia aminoacídica de cada una de las flipasas de *G. intestinalis* previamente mencionadas para la predicción de la estructura terciaria, para lo cual se utilizó Robbeta (<https://robeta.bakerlab.org/>), mediante la herramienta de modelaje comparativo, como base se utilizó la estructura cristalizada de DRS2 de *Saccharomyces cerevisiae*. Después, los dominios estructurales fueron analizados en PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/?disopred=1>), se predijo la región consistente con las hélices transmembranales, regiones extracelulares y citoplasmáticas. Las secuencias fueron editadas en UCSF Chimera. Los tres dominios citoplasmáticos involucrados en el ciclo catalítico de las flipasas fueron detectados en la secuencia aminoacídica de las flipasas de *G. intestinalis*: el dominio N se une a ATP; la fosforilación o dominio P contiene el residuo de ácido aspártico (D) dentro del motivo DKTGT conservado que sufre fosforilación transitoria; y el actuador o el dominio A tiene el motivo DGET (TGES en Ca²⁺-ATPase y Na⁺ / K⁺-ATPase) que facilita la desfosforilación del intermediario fosforilado (Lenoir et al., 2009; Coleman et al., 2012). El dominio de membrana o el dominio M sirve como vía para la translocación de sustratos lipídicos a través de las membranas celulares y se predice que contiene 10 hélices transmembranales fue detectado también logrando así detectar la localización subcelular de las flipasas, a excepción de la ATPasa IIB (XP_001707954) que presentó 11 hélices transmembranales. (Figura 25). En la predicción de la estructura terciaria de las flipasas de *G. intestinalis* estos dominios fueron observados. No obstante, los sitios de reconocimiento para caspasa no se localizaron en el dominio N en todas las estructuras de *Giardia* en comparación con ATP11A y ATP11C (Figura 26), solamente

la ATPasa IA (XP_001705456.1) y la ATPasa IIB (XP_001707954.1) se ubicaron en este dominio (Figura 25).



- Hélices transmembranales
- Dominio citoplasmático A ("actuador")
- Sitio de fosforilación (DKTG)
- Sitio de desfosforilación (DGET)
- Dominio de unión a nucleótidos N
- Región extracelular
- Sitio de reconocimiento de caspasa

Figura 24. Análisis estructural de los dominios conservados de la flipasas de *G. intestinalis*

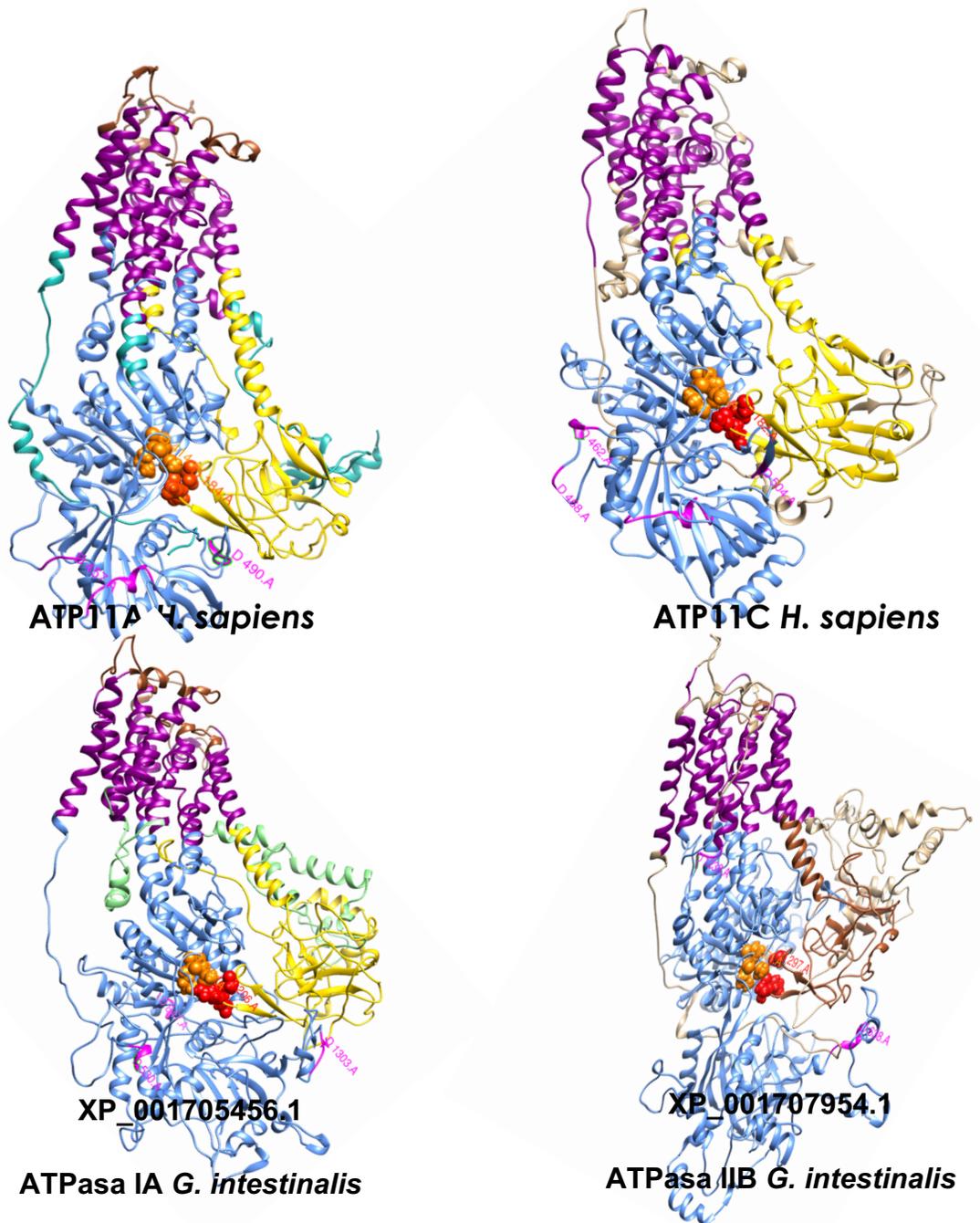


Figura 25. Comparación estructural de flipasas de *G. intestinalis*

9.18 Clonación y expresión recombinante de la flipasa IA de *G. intestinalis*

Se clonó la región que codifica para el dominio A de la flipasa IA de *G. intestinalis* empleando los iniciadores específicos diseñados. Se obtuvo un fragmento con un tamaño estimado de 621 pb (Figura 27A). El fragmento fue visualizado en un gel de agarosa al 1.7 % teñido con SybrGold, que coincide con los resultados obtenidos *in silico*. Además, tiene sitios de restricción específicos para digestión y ligación con el vector de expresión plasmídica. Los productos de PCR fueron purificados para su posterior procesamiento. El producto de PCR de la Flipasa IA fue clonado, digerido y ligado al vector. La construcción recombinante (rDNA) fue empleada para la transformación de una cepa de *E. coli* TOP10 (Figura 27B) para la propagación del plásmido. Las células transformadas se propagaron en medio SOB-amp, y posterior al desarrollo de colonias transformantes, se seleccionaron de 6 de ellas al azar, las cuales fueron verificadas como portadoras del fragmento génico mediante PCR (Figura 27C). Estas colonias fueron propagadas en un mayor volumen de medio SOB-amp. De la biomasa se extrajo el rDNA, y con él se realizó la transformación de la cepa *E. coli* BL21 (Figura 27D) para facilitar su posterior expresión recombinante. De nueva cuenta, la presencia del gen de la flipasa 1A fue confirmada por PCR, al detectar el producto de 621 pb tanto en el genoma de *G. intestinalis*, como en 6 clonas seleccionadas al azar (Figura 27E).

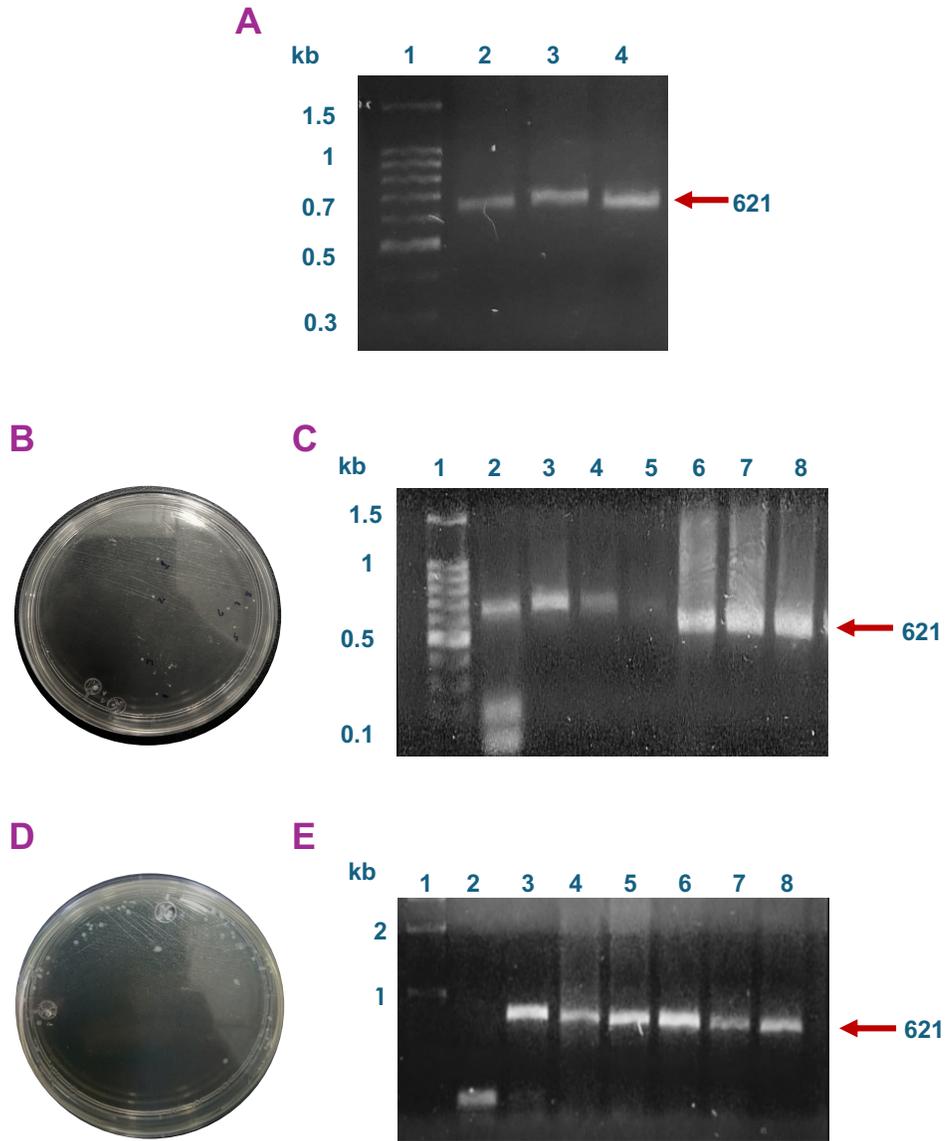


Figura 26. Clonación y construcción recombinante de la *Flipasa 1A* de *G. intestinalis*. A) Clonación de la *flipasa 1A*. Carril 1: Marcador molecular 100 pb; Carril 2-4: Amplicón de 621 pb de la *flipasa 1A* flecha roja (T_m 60 °C, 62 °C y 65 °C respectivamente). B) Placa de cultivo representativa de transformantes *E. coli* Top10 con el rDNA (pcDNA6-*Flipasa 1A*), en agar SOB-amp. C) Confirmación de la presencia del gen de la *flipasa 1A* en las transformantes. Carril 1: Marcador molecular de 100 pb; Carril 2: gDNA *G. intestinalis*; Carril 3-8 colonias 1 al 6 portadoras del gen *Flipasa 1A*. D) Placa de cultivo representativa de transformantes *E. coli* BL21 con el rDNA (pcDNA6-*Flipasa 1A*), en agar SOB-amp. E) Confirmación de la presencia del gen de la *flipasa 1A* en las transformantes. Carril 1: Marcador molecular de 1 kb; Carril 2: control negativo sin DNA; Carril 3 gDNA de *G. intestinalis*; 4-8 colonias 1 al 6 portadoras del gen *Flipasa 1A*: amplicón de 621 pb de la *flipasa 1A* flecha roja.

Una colonia fue seleccionada para la expresión piloto recombinante y llevada a fase logarítmica y se indujo la expresión recombinante con IPTG por 7 horas, el resultado se visualizó en electroforesis SDS-PAGE al 12 %, en el cual se puede observar la expresión de la proteína cada hora (Figura 28). El resultado consistió en una gama de proteínas de las cuales una resalta por el aumento de expresión al pasar el tiempo y un tamaño aproximado de 23 kDa que concuerda con los datos obtenidos *in silico*. Pudimos determinar que la hora 4 era la óptima para la expresión recombinante de la flipasa IA.

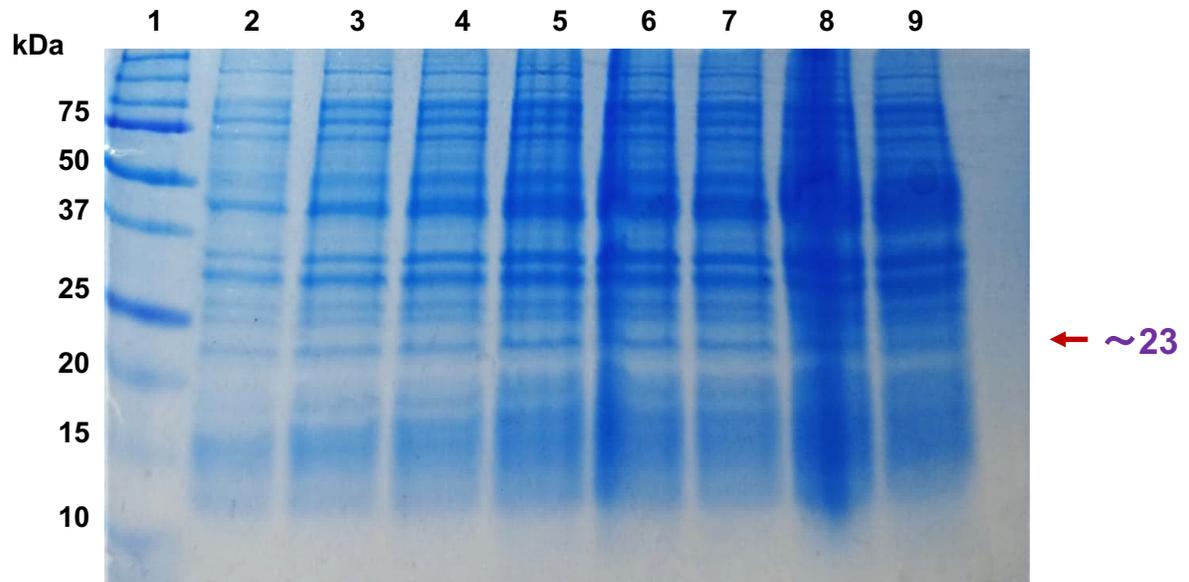


Figura 27. Expresión piloto recombinante de la Flipasa IA. Cinética de expresión procarionte, de la flipasa IA de Gi de ~23 kDa (flecha roja). En el carril 1: Marcador de peso molecular; Carriles del 2 al 9, extractos proteicos obtenidos de la transformante a diferentes horas (de 0 a 7h) postinducción.

9.19 Purificación de la Flipasa IA

Se purificó la región de la Flipasa que consiste en el dominio A de la proteína siguiendo el protocolo de purificación de nuestro laboratorio por medio de cromatografía de afinidad a metales divalentes, como resultado se obtuvo una proteína de 23 kDa (Figura 29), los cuales coinciden con el peso molecular de la proteína obtenida *in silico*, no obstante, aún es necesario continuar con la estandarización de la purificación para obtener una mejor visualización de la proteína.

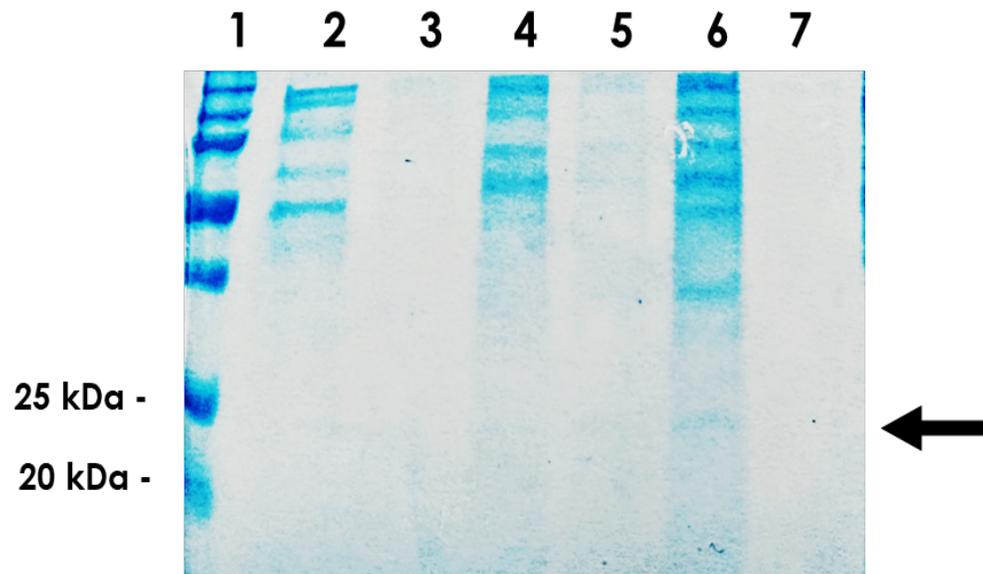


Figura 28. Purificación Flipasa IA. Carril 1: Marcador; Carril 2: Elución 1; Carril 3: Elución 2 sobrenadante; Carril 4: Elución 1 *pellet*; Carril 5: Carril 5: Elución 2 *pellet*. Observándose una banda de ~23kDa.

X. DISCUSIÓN

10.1 Evaluación de la interacción IGCAD.GCAD *in silico* e *in vitro*

Nuestro grupo de investigación se enfocó en estudiar la cascada de señalización de la apoptosis en *G. intestinalis*, el blanco natural consistió en la identificación de la vía de señalización independiente de mitocondrias, logrando identificar mediante inmunoproteómica a la endonucleasa GCA,D la cual se definió como una endonucleasa ortóloga a CAD (Durán-Pérez, 2014). La endonucleasa CAD en mamíferos y otros metazoarios se encuentra asociada con su inhibidor (ICAD) formando un complejo heterodimérico. (Dhanasekaran & Reddy, 2017).

Basándose en esta premisa y en que se hipotetizó que GCAD presenta el extremo amino terminal al igual que su inhibidor, que incluye al dominio CIDE-N, nuestro grupo de investigación identificó el inhibidor de la endonucleasa GCAD (IGCAD), se clonó y se expresó de manera recombinante. Se obtuvo una proteína de 43 kDa que contiene un tag de 6 histidinas para su purificación. Por ello en este proyecto de investigación se propuso poner en evidencia la interacción de IGCAD con GCAD. Se inició con la purificación de IGCAD mediante cromatografía de afinidad a metales divalentes, se obtuvo una proteína con un peso molecular estimado de 43 kDa. Estos resultados coinciden con el análisis *in silico* (Villa-Medina., 2019) donde se estimaba que se obtendría una proteína con un peso molecular teórico de 42.71 kDa. Además, difieren de lo reportado por Widlak y cols., 2003 quienes expresaron y purificaron ICAD del ser humano en un sistema heterólogo con *E. coli* y obtuvieron una proteína de 45 kDa fusionada con el tag de 6 histidinas, esto debido a sus diferencias en la longitud de la secuencia aminoacídica.

Subsecuentemente, rIGCAD fue dializada y empleada para la inmunización de ratones de la cepa C57BL/6, se obtuvieron anticuerpos específicos anti-IGCAD y se llevó a cabo la determinación de los niveles de IgG mediante ELISA. Se observó que los anticuerpos tuvieron mayor reactividad a una dilución 1:100 que con las diluciones mayores del suero inmune (1:500 y 1:1000). Además, se obtuvo una reacción antígeno-anticuerpo tres veces mayor con la proteína recombinante que con el extracto crudo de *G. intestinalis*. Estos resultados son similares a los de Garzón y cols., 2020,

quienes generaron anticuerpos policlonales contra aislados de *G. intestinalis* cepa GS al emplear una menor dilución de los anticuerpos (1:10) y concentraciones más altas de antígeno (200 µg), por lo que se confirmó la respuesta humoral evocada por la proteína rIGCAD.

Alternativamente se realizó un *Western blot* para confirmar la respuesta inmunológica humoral evocada por la proteína rIGCAD antígeno-específica. Se logró la detección de la proteína rIGCAD empleando los sueros inmunes, observando así una banda marrón de 43 kDa, a diferencia de cuando se utilizó el suero inmune y el suero control donde no se logró la detección de una banda consistente con el peso de rIGCAD. Asimismo, se reveló IGCAD en el lisado de *G. intestinalis* observando así una banda con un peso estimado de la proteína. Estos resultados son similares a lo reportado por Widlak y cols., 2003 quienes produjeron anticuerpos anti-ICAD de ser humano y evaluaron su reactividad en líneas celulares (HeLa y HL60) observando bandas consistentes con el peso molecular de ICAD 45 kDa y otras subunidades con un peso aproximado de 35 kDa.

Para evidenciar la posible interacción de GCAD con IGCAD se llevaron a cabo estrategias *in silico in vitro*. Para la primera se realizó un *docking* proteína-proteína donde logramos observar interacción entre ambas proteínas principalmente en la región amino terminal de ambas donde previamente se había identificado el dominio CIDE conservado en CAD e ICAD de ser humano. Por otro lado, observamos interacción entre el centro catalítico de GCAD con el extremo C terminal de IGCAD, para investigar el tipo de interacciones posible encontradas fueron interacciones no covalentes, puentes de hidrógeno y puentes salinos, lo cual concuerda con lo reportado con Zhou y col. en 2001 quienes reportaron este tipo de interacciones entre CAD e ICAD de ser humano.

Para evidenciar la interacción *in vitro* empleamos un ensayo *pull down*, basado en la presencia del tag de histidinas en las recombinantes generadas de GCAD e IGCAD, que fueron independientemente empleadas como carnadas. Como resultado observamos interacción física entre rIGCAD y GCAD en el extracto de *G. intestinalis* confirmando así la posible interacción, a diferencia cuando se utilizó a rGCAD como

carnada donde no fue posible la detección de IGCAD en el lisado de *G. intestinalis*, lo cual pudo ser debido a la proteína de fusión presente en la recombinante de GCAD en el extremo N-terminal.

10.2 Identificación *in silico* e *in vitro* de proteínas tipo caspasa en *G. intestinalis*

Se ha reportado que las caspasas entre sus múltiples proteínas diana pueden regular la exposición de la fosfatidilserina al inactivar por escisión las flipasas ATP11A y ATP11C en *H. sapiens* permitiendo así la activación de escramblasas (XKR8 principalmente), este mecanismo se ha asociado con caspasa-3 principalmente (Nagata y cols., 2020). En *G. intestinalis* la muerte celular regulada se ha reportado observando una de las características morfológicas distintivas como es la exposición de la fosfatidilserina (Bagchi y cols., 2012) y para determinar si las flipasas son reguladas por una proteína ortólogo a caspasas en *G. intestinalis*, en este trabajo se propuso también la búsqueda *in silico* y posterior identificación *in vitro* de proteasas con actividad similar a las caspasas. Como base para la identificación de caspasas-*like* se utilizó la secuencia de la pro-caspasa-3, se logró obtener dos proteínas la separasa y la transaminasa de anclaje GPI, ambas pertenecientes al clan CD grupo al que pertenecen las caspasas (Jeong y cols., 2020). Se obtuvo un porcentaje de identidad del 39.47% y 31.25% respectivamente. Se dice que un porcentaje de identidad mayor al 40% entre dos secuencias se considera que podrían ser posibles homólogos, en este caso el porcentaje es menor al 40% y aunque el porcentaje de cobertura también es menor del 13 y 5% respectivamente, las regiones de las secuencias donde presentan similitud son pertenecientes a dominios funcionales importantes de las proteínas. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Mottram y cols., 2003 quienes describieron que cada familia del clan CD tiene al menos un 25% de identidad de secuencia con todas las otras familias y que esta identidad reside alrededor del sitio activo. Al realizar la detección de dominios conservados en las secuencias de la separasa observamos que esta presentaba un sitio catalítico tipo caspasa, además de un dominio tipo separasa en su extremo carboxilo terminal. Las separasas han sido descritas por su participación en la división celular (meiosis y mitosis) al ser activadas durante la transición metafase-anafase que resulta en la

degradación de sus inhibidores (securina y ciclina B) por la proteína ubiquitina ligasa (Complejo promotor de anafase) que permite la separación de las cromátidas hermanas (Jeong y cols., 2020). Estudios recientes han vinculado la inducción de apoptosis con las separasas al escindir sustratos como Mcl-1 y BCL a través de la ruta intrínseca en líneas celulares del ser humano (Hellmuth & Stemmann, 2020). Se demostró en *C. elegans* que la separasa (SEP-1) y la caspasa (CED-3) llevan a cabo funciones compartidas en la división y muerte celular programada (Jeong y cols., 2020).

Adicionalmente, realizamos la detección de los dominios conservados de la transaminasa de anclaje GPI de *G. intestinalis* y se detectó un dominio tipo caspasa 1 en los residuos 19 al 233, de los 250 aminoácidos que presenta la proteína. Se predijo la estructura tridimensional de la proteína. Se observó que la transaminasa tiene similitud estructural con las leguminasas, metacaspasas, paracaspasas y caspasas. En específico se observó que tuvo el 24% de identidad con la metacaspasa 1 de *T. brucei*, a pesar de que la similitud encontrada sugiere que provienen de un ancestro en común al igual que las otras peptidasas del clan CD, la longitud y la construcción de sus láminas beta de la estructura terciaria, muestran que su arquitectura es muy distinta y por tanto la cascada de señalización en la que podrían participar.

Con base a la probabilidad de que las leguminasas (endopeptidasas de asparagina), caspasas y metacaspasas sean posibles homólogos se logró observar que la transaminasa GPI es un homólogo de las leguminasas y de las metacaspasas al presentar 100 y 99.5% de probabilidad respectivamente, de acuerdo con los resultados obtenidos de la predicción de la estructura terciaria. No obstante, la identidad es mayor con la metacaspasa 1 y 4 de *T. brucei*. Las metacaspasas han sido distintamente relacionadas con las caspasas al participar en la muerte celular programada en plantas, levaduras y protozoarios parásitos. Sin embargo, difieren significativamente de las caspasas debido a que son activadas por calcio, son peptidasas específicas de arginina y no requieren procesamiento o dimerización para llevar a cabo su actividad catalítica (McLuskey y cols., 2012). En *S. cerevisiae* la transaminasa de anclaje GPI tiene una función esencial en las modificaciones postraduccionales con glicossilfosfatidilinositol de anclaje a la membrana y comparte

baja similaridad con las caspasas y contiene la díada catalítica de cisteína-histidina (Meitzler y cols., 2007). al igual que la transaminasa de anclaje GPI identificada en *G. intestinalis*.

No obstante, se tiene muy poca información sobre la participación de la transaminasa de anclaje GPI de *G. intestinalis* dentro de la cascada de señalización de apoptosis o bien en las modificaciones postraduccionales al agregar glicosilfosfatidilinositol como se ha reportado en otros de sus homólogos. Por ello en este trabajo se propuso adicionalmente continuar con el estudio de estas moléculas, las flipasas involucradas en la exposición de fosfatidilserina y las separasas. Para tal fin se realizó el diseño de iniciadores específicos para las secuencias nucleotídicas reportadas para una región de la flipasa IA de 644 pb que involucra el dominio A y el sitio de desfosforilación, el dominio tipo separasa de 654 pb y la región del gen completo de la transaminasa de anclaje GPI de 729 pb. Se les agregó en el extremo 5' un sitio de restricción a cada uno de los iniciadores sentido y anti-sentido para realizar mutagénesis dirigida. Los genes fueron digeridos y ligados a un vector de expresión plasmídica *in silico* para obtener una construcción recombinante.

10.3 Identificación in silico e in vitro de flipasas de *G. intestinalis*

Para continuar con el estudio de la cascada de señalización de *G. intestinalis* se realizó la búsqueda *in silico* de flipasas en la base de datos del NCBI. Se evidenciaron 5 secuencias consistentes con la flipasas ortólogas de *G. intestinales*, tres de ellas identificadas como IA y dos IIB. Estas flipasas presentaron un porcentaje de identidad menor al 40 % sin embargo, el valor E es menor que 0 y se considera es un alineamiento significativo, ya que en las regiones donde tienen similitudes pertenecen a dominios conservados importantes para la función de la proteína. Estos resultados son similares a lo reportado previamente por Villazana-Kretzer., 2008 (Tesis Maestría) quien identificó *in silico* e *in vitro* las flipasas IA (XP_001704967.1 y XP_001705456.1) de *G. intestinalis*.

Las secuencias de las 14 flipasas descritas hasta la fecha en *H. sapiens*, las descritas en protozoarios parásitos y las identificadas en *G. intestinalis* fueron utilizadas para un alineamiento múltiple de secuencias y posteriormente para la construcción de un árbol filogenético, donde pudimos observar que las flipasas identificadas en *G. intestinalis*, en específico la ATPasa IIB (XP_001707954), se agrupan cercanamente al menos por dos nodos a las flipasas ATP9A y ATP9B de *H. sapiens*. Las flipasas ATP9A y ATP9B pertenecen a la clase 2 y son ortólogos de la flipasa Neo1p en *S. cerevisiae* que es esencial para el crecimiento celular (Andersen y cols., 2016), asimismo se ha evidenciado que una parcial de la asimetría de la membrana plasmática y exposición de PS en células HepG2 al eliminar la ATP9A. En *S. cerevisiae* la deficiencia del ortólogo de ATP9A, Neo1, también resulta en la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática y exposición de PS y PE (Naik y cols., 2019). Se ha sugerido que ATP9A tiene una actividad levemente más alta hacia la fosfatidilserina y a la fosfatidiletanolamina que con otros fosfolípidos de la membrana plasmática y otros organelos del sistema endomembranoso como el aparato de Golgi (Yen-Chun y cols., 2011).

El alineamiento múltiple de secuencias nos permitió identificar los residuos críticos para la desfosforilación (DGET para ATPasa IA XP_001704967, ATPasa IIB XP_001704293.1, ATPasa IIB XP_001707954; LTGE para ATPasa IA

XP_001705456.1; DGES para ATPasa IA XP_001710085.1) y el motivo de fosforilación DKTG conservado o dominio P que contiene el residuo de ácido aspártico (D) que sufre fosforilación transitoria, fue observado en todas las flipasas analizadas en este trabajo, estos resultados son consistentes lo reportado por Andersen y cols., (2016), incluyendo las de los protozoarios parásitos mencionados a excepción de *A. castellani*. El dominio de membrana o el dominio M sirve como vía para la translocación de sustratos lipídicos a través de las membranas celulares (Vestergaard y cols., 2014) y se predice que contiene 10 hélices transmembranales, este dominio se logró identificar en la flipasas de *G. intestinalis* a excepción de la ATPasa IIB (XP_001707954) que tiene 11 hélices transmembranales.

Se detectaron también mediante CASCLEAVE sitios de reconocimiento para caspasas dentro de la secuencia aminoacídica de las flipasas de *G. intestinalis*. Estos sitios fueron localizados en la región citoplasmática de las estructuras tridimensionales predichas, estos resultados concuerdan con lo reportado por Segawa y cols., (2014) quienes evidenciaron que las flipasas ATP11A y ATP11C de *H. sapiens* tiene sitios de reconocimiento de caspasas en el dominio N de unión a nucleótidos, a pesar de que en el análisis filogenético no se agruparon cercanamente con estas flipasas de la clase 6 (ATP11A, ATP11C y ATP11B).

De las flipasas identificadas *in silico* se continuó con la identificación *in vitro* de la flipasa IA (ATPasa XM_001705404) debido a que sus sitios de escisión para caspasas fueron detectados en el sitio de unión a nucleótidos al igual que las flipasas ATP11A y ATP11C de *H. sapiens*. Para ello se diseñaron iniciadores específicos para la clonación de una región de la flipasa IA de *G. intestinalis* de 644 pb que consisten en la región citoplasmática del dominio actuador A (residuos 24-330) que tiene el sitio de desfosforilación (LTGE). Se realizó una PCR punto final y se logró obtener una región con el peso estimado de 621 pb como se predijo *in silico*. Estos resultados difieren a lo reportado por Villazana-Kretzer., 2008 (Tesis Maestría) quien identificó *in vitro* a la Flipasa IA de *G. intestinalis* con el mismo número de acceso, esto debido a que se trató de la secuencia nucleotídica que codifica para el gen completo de la Flipasa. La clonación de la Flipasa IA permitirá la producción recombinante de la proteína y posterior evaluación durante la apoptosis de *G. intestinalis*.

XI. CONCLUSIONES

11.1 Conclusión general

Este estudio inmunoquímico permitió evidenciar la interacción GCAD-IGCAD, caspasa-3-like y flipasas dentro de la cascada de señalización de apoptosis de *Giardia intestinalis*.

11.2 Conclusiones específicas

1. Se mostró la interacción proteína-proteína mediante interacciones no covalentes entre IGCAD-GCAD *in silico*, principalmente en el dominio CIDE-N al igual reportado previamente en el complejo CAD-ICAD. La interacción fue confirmada *in vitro* mediante *pull-down* al emplear rIGCAD.
2. Las flipasas IA y IIB de *G. intestinalis* identificadas comparten similitudes estructurales con flipasas de eucariotas superiores como *H. sapiens*, además, los sitios diana para caspasas predichos en su secuencia aminoacídica coinciden con las flipasas ATP11A y ATP11C de *H. sapiens*, sugiriendo un mecanismo de regulación similar.
3. Se identificaron *in silico* proteínas tipo caspasas. La separasa identificada *in silico* muestra un dominio similar a las separasas y un sitio catalítico tipo caspasa. A su vez, la transaminasa de anclaje GPI conserva un dominio tipo caspasa, pero se considera podría tener una actividad similar a las metacaspasas debido a su estructura.
4. Se identificaron *in vitro* proteínas con similitud a la caspasa-3 al ser detectadas con el anticuerpo anti-caspasa-3 de *H. sapiens* en *G. intestinalis*.
5. Se logró la clonación de las regiones codificantes para el dominio catalítico tipo caspasa de la separasa de 654 pb y de la TAGPI de 729 pb.
6. Se clonó, expresó y purificó la flipasa IA de *G. intestinalis*, se obtuvo una proteína de 23 kDa lo que permitirá su posterior evaluación durante la apoptosis de *G. intestinalis*.

XII. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

1. Evidenciar la actividad de endonucleasa de GCAD, así como estudiar la interacción GCAD-IGCAD utilizando como carnada GCAD sin una proteína de fusión.
2. Identificar la secuencia aminoacídica de las caspasas identificadas inmunoquímicamente con el anti-caspasa-3 por inmunoproteómica.
3. Purificar los dominios catalítico tipo caspasa de la separasa y la TAGPI como base para la producción de anticuerpos que permitan continuar con el estudio de la apoptosis de *G. intestinalis*, así como obtener recombinantes con la secuencia completa de dichas proteínas para evaluar si su actividad enzimática es similar a la de caspasa-3.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adam, R. D. (2021). *Giardia duodenalis*: Biology and Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(4). https://doi.org/10.1128/CMR.00024-19/SUPPL_FILE/CMR.00024-19-S0001
- Aguilar-Diaz, H., Canizalez-Roman, A., Nepomuceno-Mejia, T., Gallardo-Vera, F., Hornelas-Orozco, Y., Nazmi, K., Bolscher, J. G. M., Carrero, J. C., Leon-Sicairos, C., & Leon-Sicairos, N. (2017). Parasitocidal effect of synthetic bovine lactoferrin peptides on the enteric parasite *Giardia intestinalis*¹. *Biochemistry and Cell Biology*, 95(1), 82–90. <https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0079>
- Ahsan, N., Shariq, M., Surolia, A., Raj, R., Khan, M. F., & Kumar, P. (2024). Multipronged regulation of autophagy and apoptosis: emerging role of TRIM proteins. In *Cellular and Molecular Biology Letters* (Vol. 29, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s11658-023-00528-8>
- Ameisen, J., Idziorek, T., Billaut-Mulot, O., Loyens, M., Tissier, J. ., Potentier, A., & Ouaiissi, A. (1995). Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differ*, 2(1993), 285, 300. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(96\)80652-1](https://doi.org/10.1016/0169-4758(96)80652-1)
- Arambage, S. C., Grant, K. M., Pardo, I., Ranford-Cartwright, L., & Hurd, H. (2009). Malaria ookinetes exhibit multiple markers for apoptosis-like programmed cell death in vitro. *Parasites and Vectors*, 2(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-32>
- Araya, L. E., Soni, I. V., Hardy, J. A., & Julien, O. (2021). Deorphanizing Caspase-3 and Caspase-9 Substrates in and out of Apoptosis with Deep Substrate Profiling. *ACS Chemical Biology*, 16(11), 2280–2296. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00456>
- Arif, M., Syed, A., Mahmood, A., Khan, S., Rizwan, M., & Munir, A. (2020). Modeling of apoptosis through gene interaction network and analysis of gene expression pattern. *Meta Gene*, 25. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2020.100730>

- Ashkenazi, A., & Salvesen, G. (2014). Regulated Cell Death: Signaling and Mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 337–356. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013226>
- Ai, Y., Meng, Y., Yan, B., Zhou, Q., & Wang, X. (2024). The biochemical pathways of apoptotic, necroptotic, pyroptotic, and ferroptotic cell death. In *Molecular Cell* (Vol. 84, Issue 1, pp. 170–179). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.11.040>
- Alway, S. E. (2021). Linking mitochondrial dysfunction to sarcopenia. *Sarcopenia: Molecular Mechanism and Treatment Strategies*, 1–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822146-4.00004-1>
- Andersen, J. P., Vestergaard, A. L., Mikkelsen, S. A., Mogensen, L. S., Chalal, M., & Molday, R. S. (2016). P4-ATPases as phospholipid flippases-structure, function, and enigmas. *Frontiers in Physiology*, 7(JUL). <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00275>
- Argüello-García, R., Carrero, J. C., & Ortega-Pierres, M. G. (2023). Extracellular Cysteine Proteases of Key Intestinal Protozoan Pathogens—Factors Linked to Virulence and Pathogenicity. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 16). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms241612850>
- Battistelli, M., & Falcieri, E. (2020). Apoptotic bodies: Particular extracellular vesicles involved in intercellular communication. In *Biology* (Vol. 9, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biology9010021>
- Bagchi, S., Oniku, A. E., Topping, K., Mamhoud, Z. N., & Paget, T. A. (2012). Programmed cell death in Giardia. *Parasitology*, 139(7), 894–903. <https://doi.org/10.1017/S003118201200011X>
- Banas, T., Pitynski, K., Okon, K., & Czerw, A. (2017). DNA fragmentation factors 40 and 45 (DFF40/DFF45) and B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) protein are underexpressed in uterine leiomyosarcomas and may predict survival. *Oncotargets and Therapy*, 10, 4579–4589. <https://doi.org/10.2147/OTT.S142979>
- Barash, N. R., Maloney, J. G., Singer, S. M., & Dawson, S. C. (2017). Giardia Alters

Commensal Microbial Diversity throughout the Murine Gut. *Infection and Immunity*, 85(6), 1–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/IAI.00948-16>. Editor

Benchimol, M., Gadelha, A. P. R., & de Souza, W. (2022). *Cell Biology of the Life Cycle of Giardia intestinalis*. 465–539. https://doi.org/10.1007/978-3-030-80682-8_11

Bock, F. J., & Riley, J. S. (2023). When cell death goes wrong: inflammatory outcomes of failed apoptosis and mitotic cell death. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 30, Issue 2, pp. 293–303). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01082-0>

Bai, L., You, Q., Jain, B. K., Duan, H. D., Kovach, A., Graham, T. R., & Li, H. (2020). Transport mechanism of P4 ATPase phosphatidylcholine flippases. *ELife*, 9, 1–20. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.62163>

Banas, T., Pitynski, K., Okon, K., & Winiarska, A. (2018). Non-endometrioid and high-grade endometrioid endometrial cancers show DNA fragmentation factor 40 (DFF40) and B-cell lymphoma 2 protein (BCL2) underexpression, which predicts disease-free and overall survival, but not DNA fragmentation factor 45 (DFF45) underexpression. *BMC Cancer*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4333-6>

Behuria, H. G., Dash, S., & Sahu, S. K. (2022). Phospholipid Scramblases: Role in Cancer Progression and Anticancer Therapeutics. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.875894>

Benchimol, M., Gadelha, A. P. R., & de Souza, W. (2022). *Cell Biology of the Life Cycle of Giardia intestinalis*. 465–539. https://doi.org/10.1007/978-3-030-80682-8_11

Castro, M. A. A., Dalmolin, R. J. S., Moreira, J. C. F., Mombach, J. C. M., & de Almeida, R. M. C. (2008). Evolutionary origins of human apoptosis and genome-stability gene networks. *Nucleic Acids Research*, 36(19), 6269–6283. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn636>

Chose, Olivier; Sarde, Claude Olivier; Noel, Christophe; Gerbod, Delphine; Jimenez, Juan Carlos; Brenner, Catherine; Capron, Monique; Viscogliosi, Eric & Roseto, A.

- (2003). Cell Death in Protists without Mitochondria. *New York Academy of Sciences*, 26, 3–7. <https://doi.org/10.1196/annals.1299.021>
- Corrêa, G., Vilela, R., Menna-Barreto, R. F. S., Midlej, V., & Benchimol, M. (2009). Cell death induction in *Giardia lamblia*: Effect of beta-lapachone and starvation. *Parasitology International*, 58(4), 424–437. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.08.006>
- Desta, I. T., Porter, K. A., Xia, B., Kozakov, D., & Vajda, S. (2020). Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure*, 28(9), 1071-1081.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.06.006>
- Dixon, B. R. (2021). *Giardia duodenalis* in humans and animals – Transmission and disease. *Research in Veterinary Science*, 135, 283–289. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2020.09.034>
- Durán-Pérez, S. A. (2014). Identificación del ortólogo de la endonucleasa CAD del protozooario parásito *Giardia duodenalis* (Tesis de maestría). *Universidad Autónoma de Sinaloa; Facultad de Ciencias Químico Biológicas*, 86.
- Delavallée, L., Mathiah, N., Cabon, L., Mazeraud, A., Brunelle-Navas, M. N., Lerner, L. K., Tannoury, M., Prola, A., Moreno-Loshuertos, R., Baritaud, M., Vela, L., Garbin, K., Garnier, D., Lemaire, C., Langa-Vives, F., Cohen-Salmon, M., Fernández-Silva, P., Chrétien, F., Migeotte, I., & Susin, S. A. (2020). Mitochondrial AIF loss causes metabolic reprogramming, caspase-independent cell death blockade, embryonic lethality, and perinatal hydrocephalus. *Molecular Metabolism*, 40. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101027>
- Elamin, T., Brandstetter, H., & Dall, E. (2022). Legumain Activity Is Controlled by Extended Active Site Residues and Substrate Conformation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20). <https://doi.org/10.3390/ijms232012548>
- Eom, J. W., Lim, J. W., & Kim, H. (2023). Lutein Induces Reactive Oxygen Species-Mediated Apoptosis in Gastric Cancer AGS Cells via NADPH Oxidase Activation. *Molecules*, 28(3). <https://doi.org/10.3390/molecules28031178>

- Euceda-Padilla, E. A., Mateo-Cruz, M. G., Ávila-González, L., Flores-Pucheta, C. I., Ortega-López, J., Talamás-Lara, D., Velazquez-Valassi, B., Jasso-Villazul, L., & Arroyo, R. (2024). *Trichomonas vaginalis* Legumain-2, TvLEGU-2, Is an Immunogenic Cysteine Peptidase Expressed during Trichomonal Infection. *Pathogens*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens13020119>
- Einarsson, E., Ma'ayeh, S., & Svärd, S. G. (2016). An up-date on Giardia and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.019>
- Furuta, Y., & Zhou, Z. (2023). How do necrotic cells expose phosphatidylserine to attract their predators—What's unique and what's in common with apoptotic cells. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1170551>
- Gannavaram, S., & Debrabant, A. (2012). Programmed cell death in Leishmania: biochemical evidence and role in parasite infectivity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00095>
- García-Cervantes, P. C., Báez-Flores, M. E., Delgado-Vargas, F., Ponce-Macotela, M., Nawa, Y., De-La-Cruz-Otero, M. D. C., Martínez-Gordillo, M. N., & Díaz-Camacho, S. P. (2017). Giardia duodenalis genotypes among schoolchildren and their families and pets in urban and rural areas of sinaloa, Mexico. *Journal of Infection in Developing Countries*, 11(2), 180–187. <https://doi.org/10.3855/jidc.8223>
- Ghosh, E. (2009). Oxidative stress-induced cell cycle blockage and a protease-independent programmed cell death in microaerophilic Giardia lamblia. 103–110.
- Green, D. R. (2022). Caspases and Their Substrates. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 14(3), a041012. <http://cshperspectives.cshlp.org/>
- Han, Y. H., Wang, Y., Lee, S. J., Jin, M. H., Sun, H. N., & Kwon, T. (2023). Regulation of anoikis by extrinsic death receptor pathways. In *Cell Communication and Signaling* (Vol. 21, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01247-5>

- Hay, Z. L. Z., & Slansky, J. E. (2022). Granzymes: The Molecular Executors of Immune-Mediated Cytotoxicity. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23031833>
- Hussar, P. (2022). Apoptosis Regulators Bcl-2 and Caspase-3. *Encyclopedia*, 2(4), 1624–1636. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2040111>
- Hehl, A. B., Regos, A., Schraner, E., & Schneider, A. (2007). Bax function in the absence of mitochondria in the primitive protozoan *Giardia lamblia*. *PLoS ONE*, 2(5), 2–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000488>
- Hellmuth, S., & Stemmann, O. (2020). Separase-triggered apoptosis enforces minimal length of mitosis. *Nature*, 580(7804), 542–547. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2187-y>
- Hernández Atehortua, P. C., Chaparro Olaya, J., Velandia, M. L., Álvarez M., W. A., & Pérez N., P. A. (2015). Muerte celular programada en protozoarios: el caso de *Giardia intestinalis*. *Revista Salud Bosque*, 2(1), 25. <https://doi.org/10.18270/rsb.v2i1.84>
- Huang, Y., Takar, M., Best, J. T., & Graham, T. R. (2020). Conserved mechanism of phospholipid substrate recognition by the P4-ATPase Neo1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(2), 158581. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.158581>
- Ivanova, H., Vervliet, T., Monaco, G., Terry, L. E., Rosa, N., Baker, M. R., Parys, J. B., Serysheva, I. I., Yule, D. I., & Bultynck, G. (2020). Bcl-2-protein family as modulators of ip3 receptors and other organellar ca^{2+} channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035089>
- Jeong, P. Y., Kumar, A., Joshi, P. M., & Rothman, J. H. (2020). Intertwined Functions of Separase and Caspase in Cell Division and Programmed Cell Death. *Scientific Reports*, 10(1), 6159. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63081-w>
- Jiménez García, L. F., & Merchant Larios, H. (2003). *Biología celular y molecular*. PEARSON EDUCACIÓN.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

Julien, O., & Wells, J. A. (2017). Caspases and their substrates. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 24, Issue 8, pp. 1380–1389). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.44>

Kansal, V., Kinney, B. L. C., Uppada, S., Saba, N. F., Stokes, W. A., Buchwald, Z. S., & Schmitt, N. C. (2023). The expanding role of IAP antagonists for the treatment of head and neck cancer. In *Cancer Medicine* (Vol. 12, Issue 13, pp. 13958–13965). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/cam4.6011>

Kari, S., Subramanian, K., Altomonte, I. A., Murugesan, A., Yli-Harja, O., & Kandhavelu, M. (2022). Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. In *Apoptosis* (Vol. 27, Issues 7–8, pp. 482–508). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10495-022-01735-y>

Kashyap, D., Garg, V. K., & Goel, N. (2021). Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 125, pp. 73–120). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.01.003>

Kim, R., Kin, T., & Beck, W. T. (2024). Impact of Complex Apoptotic Signaling Pathways on Cancer Cell Sensitivity to Therapy. In *Cancers* (Vol. 16, Issue 5). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cancers16050984>

Kaczanowski, S., Sajid, M., & Reece, S. E. (2011). Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasites & Vectors*, 4(1), 44. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-44>

- Kesavardhana, S., Subbarao Malireddi, R. K., & Kanneganti, T.-D. (2020). *Annual Review of Immunology Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis*. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-073119>
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2016). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, *10*(6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015-053>
- Kulbay, M., Bernier-Parker, N., & Bernier, J. (2021). The role of the DFF40/CAD endonuclease in genomic stability. In *Apoptosis* (Vol. 26, Issues 1–2, pp. 9–23). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10495-020-01649-7>
- Li, J., Zhao, Y., & Wang, N. (2023). Physiological and Pathological Functions of TMEM30A: An Essential Subunit of P4-ATPase Phospholipid Flippases. *Journal of Lipids*, *2023*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2023/4625567>
- Linetsky, M., Guo, J., Udeigwe, E., Ma, D., Chamberlain, A. S., Yu, A. O., Solovyova, K., Edgar, E., & Salomon, R. G. (2020). 4-Hydroxy-7-oxo-5-heptenoic acid (HOHA) lactone induces apoptosis in retinal pigment epithelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, *152*, 280–294. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.017>
- López-López, K., Apodaca-Medina, A. I., León-Sicairos, C. R., Murúa-López, C. C., Ortiz-Navarrete, V. F., Chávez-Ontiveros, J., Beltrán-López, E., & López-Moreno, H. S. (2018). Cloning and recombinant expression of elongation factor-1 α of *Leishmania mexicana*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *18*(12), 709–712. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2347>
- López-Moreno, H. S., Correa, D., Laclette, J. P., & Ortiz-Navarrete, V. F. (2003). Identification of CD4 + T cell epitopes of *Taenia solium* paramyosin. In *Parasite Immunology* (Vol. 25). www.facs.scripp.edu/software
- Louche, A., Pinto Salcedo, S., Bigot, S., & Salcedo, S. P. (2017). Protein-Protein Interactions: Pull-Down Assays Chapter 20 Protein-Protein Interactions: Pull-Down Assays. *Methods in Molecular Biology*, *1615*, 247–255. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9_20

- Lyons, J. A., Timcenko, M., Dieudonné, T., Lenoir, G., & Nissen, P. (2020). P4-ATPases: how an old dog learnt new tricks — structure and mechanism of lipid flippases. In *Current Opinion in Structural Biology* (Vol. 63, pp. 65–73). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.04.001>
- Larisch, S. (2021). *The “ARTS” of Cell Death in Service of Life: How Do We Force Cancer Cells to Commit Suicide?*
- Laskowski, R. A., Jabłońska, J., Pravda, L., Vařeková, R. S., & Thornton, J. M. (2018). PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein Science*, 27(1), 129–134. <https://doi.org/10.1002/pro.3289>
- Lechardeur, D., Drzymala, L., Sharma, M., Zylka, D., Kinach, R., Pacia, J., Hicks, C., Usmani, N., Rommens, J. M., & Lukacs, G. L. (2000). Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD). *Journal of Cell Biology*, 150(2), 321–334. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.2.321>
- Levain, N., Jean, M., & Legembre, P. (2020). CD95 Structure, Aggregation and Cell Signaling. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00314>
- MacDonald, G., Shi, L., Vande Velde, C., Lieberman, J., & Greenberg, a H. (1999). Mitochondria-dependent and -independent regulation of Granzyme B-induced apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(1), 131–144. <https://doi.org/10.1084/jem.189.1.131>
- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- Martínez-Espinosa, R., Argüello-García, R., Saavedra, E., & Ortega-Pierres, G. (2015). Albendazole induces oxidative stress and DNA damage in the parasitic protozoan *Giardia duodenalis*. *Frontiers in Microbiology*, 6(AUG), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00800>

- McLuskey, K., Rudolf, J., Proto, W. R., Isaacs, N. W., Coombs, G. H., Moss, C. X., & Mottram, J. C. (2012). Crystal structure of a *Trypanosoma brucei* metacaspase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(19), 7469–7474. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200885109>
- Meitzler, J. L., Gray, J. J., & Hendrickson, T. L. (2007). Truncation of the caspase-related subunit (Gpi8p) of *Saccharomyces cerevisiae* GPI transamidase: Dimerization revealed. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *462*(1), 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.03.035>
- Meslin, B., Zalila, H., Fasel, N., Picot, S., & Bienvenu, A. L. (2011). Are protozoan metacaspases potential parasite killers? *Parasites and Vectors*, *4*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-26>
- Markova, K., Uzlikova, M., Tumova, P., Jirakova, K., Hagen, G., Kulda, J., & Nohynkova, E. (2016). Absence of a conventional spindle mitotic checkpoint in the binucleated single-celled parasite *Giardia intestinalis*. *European Journal of Cell Biology*, *95*(10), 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.07.003>
- McElhinney, K., Imnaten, M., & O'Brien, C. (2023). p53 and Myofibroblast Apoptosis in Organ Fibrosis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms24076737>
- McKenzie, B., Khazen, R., & Valitutti, S. (2022). Greek Fire, Poison Arrows, and Scorpion Bombs: How Tumor Cells Defend Against the Siege Weapons of Cytotoxic T Lymphocytes. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.894306>
- McLuskey, K., & Mottram, J. C. (2015). Comparative structural analysis of the caspase family with other clan CD cysteine peptidases. In *Biochemical Journal* (Vol. 466, pp. 219–232). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BJ20141324>
- Minina, E. A., Staal, J., Alvarez, V. E., Berges, J. A., Berman-Frank, I., Beyaert, R., Bidle, K. D., Bornancin, F., Casanova, M., Cazzulo, J. J., Choi, C. J., Coll, N. S., Dixit, V. M.,

- Dolinar, M., Fasel, N., Funk, C., Gallois, P., Gevaert, K., Gutierrez-Beltran, E., ... Bozhkov, P. V. (2020). Classification and Nomenclature of Metacaspases and Paracaspases: No More Confusion with Caspases. In *Molecular Cell* (Vol. 77, Issue 5, pp. 927–929). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.020>
- Murúa-López, C. del C., González-Orozco, M., & López-Moreno, H. S. (2019). Plasmacytoid dendritic cells evoke the Salmonella-specific CTL effector response. *Biomedica*, 39, 172–181. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4349>
- Nagata, S. (2018a). *Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells*. January, 1–29.
- Nagata, S. (2018b). Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu. Rev. Immunol*, 361829(1), 1–18. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol>
- Nagata, S., Sakuragi, T., & Segawa, K. (2020). Flippase and scramblase for phosphatidylserine exposure. *Current Opinion in Immunology*, 62, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.11.009>
- Nagata, S., & Tanaka, M. (2017). Programmed cell death and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 17(5), 333–340. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.153>
- Nagata, S., & Segawa, K. (2021). Sensing and clearance of apoptotic cells. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 68, pp. 1–8). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.07.007>
- Naim, S., & Kaufmann, T. (2020). The Multifaceted Roles of the BCL-2 Family Member BOK. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.574338>
- Pérez-Arriaga, L., Mendoza-Magaña, M. L., Cortés-Zárate, R., Corona-Rivera, A., Bobadilla-Morales, L., Troyo-Sanromán, R., & Ramírez-Herrera, M. A. (2006). Cytotoxic effect of curcumin on *Giardia lamblia* trophozoites. *Acta Tropica*, 98(2), 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.03.005>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M.,

- Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Piedra-Quintero, Z. L., Apodaca-Medina, A. I., Beltrán-López, E., León-Sicairos, C. R., Chávez-Ontiveros, J., Rendón-Maldonado, J. G., Ortiz-Navarrete, V. F., & López-Moreno, H. S. (2015). Immunoproteomic Identification of p29 Antigen as the Elongation Factor-1 α of *Leishmania mexicana*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(7), 449–452. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1712>
- Pomowski, A., Usón, I., Nowakowska, Z., Veillard, F., Sztukowska, M. N., Guevara, T., Goulas, T., Mizgalska, D., Nowak, M., Potempa, B., Huntington, J. A., Potempa, J., & Gomis-Rüth, F. X. (2017). Structural insights unravel the zymogenic mechanism of the virulence factor gingipain K from *Porphyromonas gingivalis*, a causative agent of gum disease from the human oral microbiome. *Journal of Biological Chemistry*, 292(14), 5724–5735. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.776724>
- Qian, S., Wei, Z., Yang, W., Huang, J., Yang, Y., & Wang, J. (2022). The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.985363>
- Quinn, M. W., Daisley, B. A., Vancuren, S. J., Bouchema, A., Niño, E., Reid, G., Thompson, G. J., & Allen-Vercoe, E. (2024). *Apirhabdus apintestini* gen. nov., sp. nov., a member of a novel genus of the family Enterobacteriaceae, isolated from the gut of the western honey bee *Apis mellifera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 74(4). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006346>
- Ramírez-Labrada, A., Pesini, C., Santiago, L., Hidalgo, S., Calvo-Pérez, A., Oñate, C., Andrés-Tovar, A., Garzón-Tituaña, M., Uranga-Murillo, I., Arias, M. A., Galvez, E. M., & Pardo, J. (2022). All About (NK Cell-Mediated) Death in Two Acts and an Unexpected Encore: Initiation, Execution and Activation of Adaptive Immunity. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.896228>

- Ramos-Guzmán, C. A., Ruiz-Pernía, J. J., Zinovjev, K., & Tuñón, I. (2023). Unveiling the Mechanistic Singularities of Caspases: A Computational Analysis of the Reaction Mechanism in Human Caspase-1. *ACS Catalysis*, *13*(7), 4348–4361. <https://doi.org/10.1021/acscatal.3c00037>
- Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (2013). Introduction: The Clans and Families of Cysteine Peptidases. In *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Vol. 2, pp. 1743–1773). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00404-X>
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., & Finn, R. D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D624–D632. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>
- Roufayel, R., Younes, K., Al-Sabi, A., & Murshid, N. (2022). BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis. In *Life* (Vol. 12, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/life12020256>
- Sakuragi, T., Kanai, R., Tsutsumi, A., Narita, H., Onishi, E., Nishino, K., Miyazaki, T., Baba, T., Kosako, H., Nakagawa, A., Kikkawa, M., Toyoshima, C., & Nagata, S. (2021). The tertiary structure of the human Xkr8–Basigin complex that scrambles phospholipids at plasma membranes. *Nature Structural and Molecular Biology*, *28*(10), 825–834. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00665-8>
- Sakuragi, T., & Nagata, S. (2023). Regulation of phospholipid distribution in the lipid bilayer by flippases and scramblases. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 24, Issue 8, pp. 576–596). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00604-z>
- Sakkas, D., & El-fakahany, H. M. (2018). Apoptosis in Ejaculated Spermatozoa and in the Normal and Pathological Testes: Abortive Apoptosis and Sperm Chromatin Damage. In *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage* (In: Zini A, pp. 197–218). Springer, Cham. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-71815-6_12

- Segawa, K., & Nagata, S. (2015a). An Apoptotic “Eat Me” Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends in Cell Biology*, 25(11), 639–650. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.003>
- Segawa, K., & Nagata, S. (2015b). An Apoptotic “Eat Me” Signal: Phosphatidylserine Exposure. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 25, Issue 11, pp. 639–650). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.003>
- Seyrek, K., Ivanisenko, N. V., Richter, M., Hillert, L. K., König, C., & Lavrik, I. N. (2020). Controlling Cell Death through Post-translational Modifications of DED Proteins. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 30, Issue 5, pp. 354–369). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.02.006>
- Song, J., Tan, H., Shen, H., Mahmood, K., Boyd, S. E., Webb, G. I., Akutsu, T., & Whisstock, J. C. (2010). Cascleave: Towards more accurate prediction of caspase substrate cleavage sites. *Bioinformatics*, 26(6), 752–760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq043>
- Song, Y., Dimaio, F., Wang, R. Y. R., Kim, D., Miles, C., Brunette, T., Thompson, J., & Baker, D. (2013). High-resolution comparative modeling with RosettaCM. *Structure*, 21(10), 1735–1742. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.08.005>
- Susanto, O., Stewart, S. E., Voskoboinik, I., Brasacchio, D., Hagn, M., Ellis, S., Asquith, S., Sedelies, K. A., Bird, P. I., Waterhouse, N. J., & Trapani, J. A. (2013). Mouse granzyme A induces a novel death with writhing morphology that is mechanistically distinct from granzyme B-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 20(9), 1183–1193. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.59>
- Tajbakhsh, A., Kovanen, P. T., Rezaee, M., Banach, M., Moallem, A., & Sahebkar, A. (2020). Regulation of efferocytosis by caspase-dependent apoptotic cell death in atherosclerosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 120(June 2019), 105684. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105684>
- van IJzendoorn, S. C. D., Agnetti, J., & Gassama-Diagne, A. (2020). Mechanisms behind the polarized distribution of lipids in epithelial cells. In *Biochimica et Biophysica Acta -*

Biomembranes (Vol. 1862, Issue 2). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183145>

Wang, J., Yu, C., Zhuang, J., Qi, W., Jiang, J., Liu, X., Zhao, W., Cao, Y., Wu, H., Qi, J., & Zhao, R. C. (2022). The role of phosphatidylserine on the membrane in immunity and blood coagulation. In *Biomarker Research* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd.
<https://doi.org/10.1186/s40364-021-00346-0>

White, K. (2023). Sayonara to some evolutionary puzzles in the Bcl-2 family. *The EMBO Journal*, 42(8). <https://doi.org/10.15252/embj.2023113980>

Yadav, K., Kuldeep, J., Shabeer Ali, H., Siddiqi, M. I., & Tripathi, R. (2023). Metacaspase (Pf MCA-1) as antimalarial drug target: An in silico approach and their biological validation. *Life Sciences*, 335. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122271>

Youle, R. J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 47–59.
<https://doi.org/10.1038/nrm2308>

Yu, J., Raia, P., Ghent, C. M., Raisch, T., Sadian, Y., Cavadini, S., Sabale, P. M., Barford, D., Raunser, S., Morgan, D. O., & Boland, A. (2021). Structural basis of human separase regulation by securin and CDK1–cyclin B1. *Nature*, 596(7870), 138–142. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03764-0>