



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología
Maestría en Biotecnología

Efecto del hierro sobre el crecimiento de *G. duodenalis*, evidencias del mecanismo de regulación.

TESIS

Que presenta

Laura Yuliana Plata Guzmán

para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Biotecnología

Directora de Tesis
Dra. Claudia del Rosario León Sicaños

Culiacán de Rosales, Sinaloa, México Junio 2015

PRESENTACIÓN

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Patología, Biología Celular y Molecular del Programa Regional del Noroeste para el Doctorado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección de la Dra. Claudia del Rosario León Sicairos. El trabajo experimental se desarrolló con fondos institucionales del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) de la Universidad Autónoma de Sinaloa, así como de la Secretaría de Educación Pública y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACYT, No de proyecto 152772) cuyo responsable es la Dra. Claudia del Rosario León Sicairos.

DEDICATORIAS

A Dios por haberme permitido llegar a este momento tan especial en mi vida y por regalarme una familia maravillosa, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres por iluminar mi camino brindándome la pauta necesaria para poder realizarme en mis estudios y vida. Agradezco los sabios consejos que en el momento exacto han sabido darme para no dejarme caer y enfrentar los momentos difíciles de mi vida estudiantil y personal. Por guiarme a tomar las decisiones que me ayudan a balancear mi vida y cumplir mis sueños. Gracias por su apoyo, paciencia, esfuerzo, dedicación y entera confianza, pero sobre todo gracias por el amor tan grande que me dan; los Amo infinitamente.

A mis hermanos Gustavo y Adolfo por su apoyo incondicional, consejos y amistad. Por ser los mejores hermanos del mundo y por brindarme la fuerza necesaria para seguir adelante.

A mis sobrinos Gustavito, Maximiliano y Jaqueline por ser el motor que me impulsa a ser mejor cada día.

A mi prima Yesica Guadalupe Plata Quintero † muchas gracias por todos los momentos compartidos. Te quiero y extraño, este logro lo comparto contigo.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Claudia del Rosario León Sicaños por permitirme formar parte de su grupo de trabajo. Por su apoyo incondicional y asesoría; por impulsarme a hacer todo de la mejor manera y sobre todo por ser usted quien me inició en el camino de la investigación. Gracias por su paciencia, disponibilidad, comprensión y amistad.

Al Dr. Héctor Samuel López Moreno por su apoyo y asesoría estando siempre dispuesto a compartir sus conocimientos.

A la MC. Liliana Soto Castro gracias por brindarme tu apoyo y amistad. Por estar siempre dispuesta ayudarme.

A la MC. Claudia Melgoza Villagómez por su valiosa asesoría y por estar siempre dispuesta a compartir sus conocimientos. Gracias por su apoyo, comprensión y amistad.

A mis compañeros de laboratorio: Perla Linares, Michelli Valle García, Milagro de Jesús Luque Ramírez, Francisco Puga por estar siempre en la mejor disposición de colaborar.

A los profesores de la Maestría en Biotecnología, que en verdad colaboraron para mi formación académica y profesional.

ÍNDICE GENERAL

	Pág
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
I RESUMEN/ABSTRACT	1
II INTRODUCCIÓN	4
III REVISIÓN DE LITERATURA	6
A <i>Giardia duodenalis</i>	6
1. Aspectos generales de <i>G. duodenalis</i>	6
2. Ciclo Biológico	6
3. Mecanismos de patogenicidad	9
4. Aspectos moleculares de <i>G. duodenalis</i>	11
5. Metabolismo	11
6. Metabolismo del hierro	13
7. Efecto del hierro en protozoarios	13
B Homeostasis del hierro en las células	14
C El sistema tipo IRE/IRP	15
D RNAm con estructuras IREs	18
IV JUSTIFICACIÓN	20
V HIPÓTESIS	21
VI OBJETIVOS	22
A Objetivo general	22
B Objetivos particulares	22
VII MATERIALES Y MÉTODOS	23
A Cultivos de <i>G. duodenalis</i>	23
B Cinética para la medición del crecimiento de <i>G. duodenalis</i> en diferentes concentraciones de hierro	23
C Análisis bioinformático del genoma del parásito <i>G. duodenalis</i>	24
1 Búsqueda de estructuras tallo-burbuja en RNAm's de Giardia	24
2 Búsqueda de la proteína IRP en el proteoma de Giardia	24
D Plásmidos pSPT-Fer y pGEX-hIRP-1	26
E Diseño de oligonucleótidos específicos y amplificación por PCR de las secuencias de interés	28
F Transcripción <i>in vitro</i> de secuencias tallo-burbuja	30
G Inducción, expresión y purificación de la hIRP-1 recombinante	30
H Ensayos de retardamiento en gel	31
VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
A Efecto del hierro sobre el crecimiento de <i>G. duodenalis</i>	32
B Estructuras tallo-burbuja (tipo IRE) en RNAm's que codifican proteínas que	35

participan en el metabolismo del hierro así como en la virulencia de <i>G. duodenalis</i>	
1. Estructuras tallo-burbuja en el RNAm de genes que codifican proteínas que participan en la virulencia del parásito	35
2. Estructuras tallo-burbuja en el RNAm de genes que codifican proteínas ribosomales del parásito	42
3. Estructuras tallo-burbuja en el RNAm de genes que codifican proteínas del citoesqueleto del parásito	54
4. Estructuras tallo-burbuja en el RNAm de genes que codifican proteínas del metabolismo del parásito	57
C Búsqueda de la proteína tipo IRP en el proteoma de <i>G. duodenalis</i>	60
D Unión de los IREs like en RNAs de <i>Giardia</i> a la proteína tipo IRP de humano	133
IX CONCLUSIÓN	140
X PERSPECTIVAS	141
XI BIBLIOGRAFÍA	142
ABREVIATURAS	153
APÉNDICE	155
ANEXOS	160

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág
1.	Secuencias de proteínas IRP utilizadas para buscar al ortólogo de IRP en el proteoma de <i>G. duodenalis</i>	25
2.	Características de los plásmidos que contienen el gen que codifica para la IRP-1 y el IRE de ferritina de humano	27
3.	Secuencia de oligonucleótidos específicos de IREs-like en RNAm's de <i>G. duodenalis</i>	29
4.	Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas de virulencia en <i>G. duodenalis</i>	37
5.	Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas ribosomales en <i>G. duodenalis</i>	44
6.	Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas del citoesqueleto en <i>G. duodenalis</i>	55
7.	Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas del metabolismo en <i>G. duodenalis</i>	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pág
1.	Ciclo biológico de <i>G. duodenalis</i>	8
2.	Sistema de Regulación IRE/IRP	17
3.	Elementos de Respuesta al Hierro (IREs)	19
4.	Efecto del hierro sobre el crecimiento de <i>G. duodenalis</i>	34
5.	Estructuras tallo-burbuja en RNAm's que codifican posibles proteínas de virulencia	40
6.	Estructuras tallo-burbuja en RNAm's que codifican posibles proteínas de virulencia.	41
7.	Estructuras tallo-burbuja en RNAm's que codifican posibles proteínas ribosomales	50
8.	Estructuras tallo-burbuja en RNAm's que codifican posibles proteínas ribosomales	51
9.	Estructuras tallo-burbuja en RNAm's que codifican posibles proteínas ribosomales	52
10.	Estructuras tallo-burbuja en RNAm's que codifican posibles proteínas ribosomales	53
11.	Estructuras tallo-burbuja en RNAm's que codifican posibles proteínas del citoesqueleto	56
12.	Estructuras tallo-burbuja en RNAm's que codifican posibles proteínas del metabolismo	59
13.	Descripción de las secuencias obtenidas del proteoma de <i>G. duodenalis</i> , utilizando como sonda la secuencia de la proteína reguladora de hierro 1 de humano	61
14.	Alineamiento en ClustalW entre la proteína IRP1 de humano y la secuencia IRP-like GL50803_14790 de <i>G. duodenalis</i>	62
15.	Alineamiento en ClustalW entre la proteína IRP1 de humano y la secuencia IRP-like GL50803_7575 de <i>G. duodenalis</i>	64
16.	Alineamiento Múltiple en ClustalW entre la proteína IRP1 de humano y las	66

	secuencias IRP-like GL50803_14790 y GL50803_7575 de <i>G. duodenalis</i>	
17.	Descripción de la secuencia obtenida del proteoma de <i>G. duodenalis</i> , utilizando como sonda la secuencia de la proteína reguladora de hierro de <i>A. gambiae</i>	68
18.	Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de <i>A. gambiae</i> y la secuencia IRP-like GL50803_14790 de <i>G. duodenalis</i>	69
19.	Descripción de las secuencias obtenidas del proteoma de <i>G. duodenalis</i> , utilizando como sonda la secuencia de la proteína reguladora de hierro 1A de <i>D. melanogaster</i> .	72
20.	Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1A de <i>D. melanogaster</i> y la secuencia IRP-like GL50803_103818 de <i>G. duodenalis</i>	76
21.	Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1A de <i>D. melanogaster</i> y la secuencia IRP-like GL50803_14790 de <i>G. duodenalis</i>	78
22.	Alineamiento Múltiple en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1A de <i>D. melanogaster</i> y las secuencias IRP-like GL50803_103818, GL50803_14790 de <i>G. duodenalis</i>	82
23.	Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1A de <i>D. melanogaster</i> y la secuencia IRP-like GL50803_11099 de <i>G. duodenalis</i>	84
24.	Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1A de <i>D. melanogaster</i> y la secuencia IRP-like GL50803_16220 de <i>G. duodenalis</i>	86
25.	Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1A de <i>D. melanogaster</i> y la secuencia IRP-like GL50803_86821 de <i>G. duodenalis</i>	88
26.	Alineamiento Múltiple en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1A de <i>D. melanogaster</i> y las secuencias IRP-like GL50803_11099, GL50803_16220, GL50803_86821 de <i>G. duodenalis</i>	90
27.	Alineamiento Múltiple en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1A de <i>D. melanogaster</i> y las secuencias IRP-like GL50803_103818, GL50803_14790, GL50803_11099, GL50803_16220, GL50803_86821 de <i>G. duodenalis</i>	97
28.	Descripción de las secuencias obtenidas del proteoma de <i>G. duodenalis</i> , utilizando como sonda la secuencia de la proteína reguladora de hierro 1B	99

	de <i>D. melanogaster</i>	
29.	Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1B de <i>D. melanogaster</i> y la secuencia IRP-like GL50803_93551 de <i>G. duodenalis</i>	101
30.	Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1B de <i>D. melanogaster</i> y la secuencia IRP-like GL50803_11389 de <i>G. duodenalis</i>	103
31.	Alineamiento Múltiple en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1B de <i>D. melanogaster</i> y las secuencias IRP-like GL50803_93551, GL50803_11389 de <i>G. duodenalis</i>	105
32.	Descripción de las secuencias obtenidas del proteoma de <i>G. duodenalis</i> , utilizando como sonda la secuencia de la proteína reguladora de hierro de <i>P. falciparum</i>	107
33.	Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de <i>P. falciparum</i> y la secuencia IRP-like GL50803_28635 de <i>G. duodenalis</i>	110
34.	Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de <i>P. falciparum</i> y la secuencia IRP-like GL50803_12174 de <i>G. duodenalis</i>	112
35.	Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de <i>P. falciparum</i> y la secuencia IRP-like GL50803_17385 de <i>G. duodenalis</i>	114
36.	Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de <i>P. falciparum</i> y la secuencia IRP-like GL50803_35341 de <i>G. duodenalis</i>	123
37.	Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de <i>P. falciparum</i> y la secuencia IRP-like GL50803_9327 de <i>G. duodenalis</i>	125
38.	Alineamiento Múltiple en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de <i>P. falciparum</i> y las secuencias IRP-like GL50803_12174, GL50803_17385 de <i>G. duodenalis</i>	127
39.	Alineamiento Múltiple en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de humano, proteína reguladora de hierro de <i>P. falciparum</i> y las secuencias IRP-like GL50803_12174, GL50803_17385 de <i>G. duodenalis</i>	130
40.	Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de humano, proteína reguladora de hierro de <i>P. falciparum</i> y la secuencia IRP-like GL50803_17385 de <i>G. duodenalis</i>	132
41.	Amplificación por PCR de Catepsina L11 y RPL13 de <i>G. duodenalis</i>	134

42.	Transcripción <i>in vitro</i> del IRE-ferritina y de Catepsina L11 y RPL13 de <i>G. duodenalis</i>	135
43.	Expresión y purificación de la proteína hIRP-1	136
44.	Formación de complejos entre los RNAm's de <i>G. duodenalis</i> y la proteína IRP-1 recombinante de humano	137

I RESUMEN

El protozoo parásito *Giardia duodenalis* es el agente causal de la giardiasis, una de las infecciones intestinales más frecuentes a nivel mundial al cual, además, se le asocian complicaciones como el “síndrome de mala absorción de nutrimentos” en niños y enfermedades crónicas en adultos. En cuanto a los mecanismos de patogenicidad, se han obtenido importantes avances con la ayuda de la secuenciación del genoma de este parásito, sin embargo, no hay reportes acerca de su regulación. El hierro es un elemento importante para la sobrevivencia de todos los seres vivos incluyendo los parásitos protozoarios. Estudios recientes muestran la gran necesidad de *Giardia* por el hierro y la relación directa de la presencia de esta parasitosis con anemia en niños. En otros protozoarios como *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica* se ha reportado que el hierro afecta el crecimiento, los mecanismos de patogenicidad y regula la expresión de genes de virulencia; el mecanismo propuesto es a nivel postranscripcional de tipo IRE/IRP (Iron responsive Element/Iron regulated Protein). Los IREs son estructuras de tallo-burbuja conservadas que se encuentran en las regiones no traducidas (UTR); y las IRPs son proteínas citoplasmáticas que interactúan con estas estructuras en condiciones de bajo hierro promoviendo o reprimiendo la traducción dependiendo de la localización del IRE. Recientemente, un estudio *in silico* en nuestro laboratorio mostró la presencia de estructuras tallo burbuja en diferentes RNAm lo que podría sugerir la presencia del mecanismo IRE/IRP en *G. duodenalis*. Por lo anterior, el objetivo de este proyecto fue determinar el efecto del hierro en el crecimiento del parásito así como la presencia del mecanismo IRE/IRP. Para ello, se realizaron cinéticas de crecimiento del parásito en diferentes concentraciones de hierro y se determinó la viabilidad celular. Los resultados sugieren que las condiciones de bajo hierro afectan el crecimiento del parásito. Para determinar la presencia del mecanismo de regulación postranscripcional por hierro, primeramente se realizaron análisis *in silico* en búsqueda de elementos en cis de diferentes grupos de RNAm que codifican para proteínas de virulencia, ribosomales, citoesqueleto y metabolismo. Por otra parte, para determinar la presencia de elementos en trans, se realizó la búsqueda de la proteína tipo IRP en el proteoma de *Giardia* utilizando como sondas las secuencias aminoacídicas de la IRP de humano y de organismos menos evolucionados. De este modo, se encontraron IRE-like en diferentes RNAm así como cuatro secuencias similares a la IRP de humano y *Plasmodium falciparum* lo cual sugiere la presencia de ambos elementos que componen el sistema IRE/IRP. Finalmente, mediante ensayos de retardamiento en gel, se observó formación de complejos específicos entre los IRE-like del parásito y la IRP de humano. Con lo anterior podemos sugerir que el hierro afecta el crecimiento del parásito y posiblemente su virulencia,

además se muestran, por primera vez, evidencias de un mecanismo de regulación por hierro en Giardia similar al típico IRE/IRP reportado en el ser humano. El conocimiento obtenido puede ayudar a entender la patogenia del parásito para apoyar en la generación de nuevos métodos de diagnóstico y blancos farmacológicos.

ABSTRACT

The protozoan parasite *Giardia duodenalis* is the causative agent of giardiasis, one of the most frequent intestinal infections worldwide which also is associated to complications as the "malabsorption of nutrients syndrome" in children, y chronic diseases in adults. Concerning to the mechanisms of pathogenicity, significant advances have been obtained with the genome sequencing of this parasite; however, regulation mechanisms have not been reported. Iron is important for the survival of all organisms including protozoan parasites. Recent studies show the great necessity of *Giardia* by iron y the direct relationship with the presence of this parasite with anemia in children. In other protozoa such as *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica* has been reported that iron affects growth, pathogenicity mechanisms and, the expression of virulence genes. The proposed mechanism is at the posttranscriptional level, the IRE/IRP (Iron responsive Element/Iron regulated Protein) system. IREs are conserved stem-loop structures located in untranslated regions (UTR); IRPs are cytoplasmic proteins that interact with these structures in low iron conditions promoting or repressing translation depending on the IRE location. Recently, an *in silico* analysis in our laboratory showed the presence of stem-loop structures in different mRNAs that suggest the presence of the IRE/IRP mechanism in *G. duodenalis*. Therefore, the aim of this work was to determine the iron effect on the growth of this parasite y the presence of the IRE/IRP mechanism. Hereby, parasite growth kinetics assays were performed at different concentrations of iron y cell viability was determined. The results suggest that low iron conditions affect parasite growth. To determine the presence of a posttranscriptional mechanism for iron regulation, firstly, *in silico* analyzes were performed to search *cis* elements of different groups of mRNAs encoding virulence, ribosomal, cytoskeleton y metabolism proteins. On the other hand, to determine the presence of *trans* elements, the search of IRP protein was performed in *Giardia* proteome using as probes the amino acid sequences of human y less evolved organisms. Thus, IREs-like were found in different cluster of mRNAs y two IRP-like sequences shared similarity with human y *Plasmodium falciparum* IRPs, which suggests the presence of both elements of the IRE/IRP system. Lastly, using gel shifting assays, formation of specific complexes was observed between IREs-like of the parasite y human IRP. Hence, we can suggest that iron affect parasite growth y possibly virulence, also is shown, for the first time, evidence of iron regulatory mechanism in *Giardia* similar to the typical IRE/IRP reported in humans. This knowledge can help to understythe pathogenesis of the parasite to support the generation of new diagnostic methods y pharmacological targets.

II INTRODUCCIÓN

Giardia duodenalis es el agente etiológico causante de la giardiasis, esta infección presenta una distribución muy amplia con 10-15% de la población mundial infectada en promedio, siendo una de las causas más frecuentes de brotes diarreicos a nivel mundial. Se ha estimado cerca de 1000 millones de casos de giardiasis, lo cual da como resultado 2.5 millones de muertes anualmente por enfermedad diarreica (WHO, 1998). A nivel mundial se estima que alrededor de 200 millones de personas son infectadas anualmente, principalmente en Latino América, Asia y África (Mark-Carew y col, 2013). En nuestro país, durante el 2014 la secretaria de Salud ha reportado un total de 40,239 casos de los cuales 4,611 corresponden al estado de Sinaloa, colocándonos en primer lugar nacional en casos de giardiasis (SSA, 2014), de hecho, hasta la semana 19 del presente año se reportan 363 casos por lo que continuamos en primer lugar (SSA, 2015). *G. duodenalis* es de gran interés biológico, ya que ocupa un punto de transición evolutiva entre los procariontes y eucariontes. Tiene dos estadios en su ciclo de vida; que constan de un trofozoito flagelado y de una forma quística. La infección es iniciada por la ingestión de quistes en alimentos o agua contaminada con ellos, seguido por la exquistación y colonización del intestino por trofozoitos causando la enfermedad. Algunos trofozoitos después se diferencian en quistes, los cuales son expulsados por las heces, completando el ciclo de vida (Carpenter y col, 2012; Que y col, 1996). Uno de los aspectos de gran relevancia actual en el estudio de *Giardia* y giardiasis es definir los mecanismos patogénicos de esta infección; siendo el primer paso la adhesión del parásito a las células epiteliales del intestino delgado. Así, durante este proceso ocurren una serie de eventos que permiten la interacción entre el parásito y las células epiteliales, pero se conoce poco sobre las moléculas que se expresan durante esta interacción. Algunas proteasas de tipo cisteína son liberadas por el trofozoito (Rascón y McKerrow, 2013; Rodríguez-Fuentes y col, 2006), la principal función de las cisteín proteasas es en los procesos de enquistamiento y desenquistamiento (Rascón y McKerrow, 2013) pero se necesitan más estudios para entender la patogenia de este parásito. Por otro lado, se ha reportado gran necesidad del parásito por el hierro por lo que este catión podría formar parte importante en la virulencia (Monajemzadeh y Monajemzadeh, 2008; Al-Mekhlafi y col, 2005; Olivares y col, 2004; Suchan y col, 2003) sin embargo, no hay estudios sobre el efecto del hierro en su crecimiento y en la modulación de genes o mecanismos de regulación. El hierro es un elemento esencial para todos los organismos vivos, debido a que tanto la deficiencia como la sobrecarga de hierro son perjudiciales, su absorción, concentración y estado redox deben ser regulados cuidadosamente (Wilkinson y Pantopoulos, 2014; Tandara y Salamunic, 2012; Pantopoulos, 2004;

Pérez y col, 2005). La regulación postranscripcional por el sistema IRE/IRP es la más estudiada en el humano y se compone de proteínas citoplásmicas reguladoras de hierro (IRPs) que interactúan con elementos de respuesta a hierro (IREs), los cuales son estructuras de tallo-burbuja conservadas que se encuentran en las regiones no traducidas (UTR) de los RNAm que codifican proteínas relacionadas a la homeostasis del hierro. En protozoarios como *T vaginalis* y *E. histolytica* se ha reportado que el hierro afecta el crecimiento y los mecanismos de patogenicidad (Hernández-Gutiérrez y col,2004; Hernández-Gutiérrez y col, 2003; Álvarez-Sánchez y col,2000; Lee y col,2008; Park y col,2001) así como la expresión de algunos RNAm que codifican proteínas de virulencia (Hernández-Cuevas, 2014; Sánchez-Cruz y col, 2011; Solano-González y col,2007; León-Sicairos y col,2004; Park y col,2001). En *T. vaginalis*, se ha reportado la presencia de IREs-like (Torres-Romero y Arroyo, 2009; Solano-González y col, 2007) así como de una proteína α -actinina que se une a estas estructuras (Calla-Choque y col,2014), sin embargo, en *G. duodenalis* no hay reportes a la fecha sobre este tema. Recientemente, en nuestro laboratorio, se analizó el genoma de este protozoario y se encontraron estructuras tallo burbuja en algunas regiones no codificantes de diferentes RNAm (Plata-Guzmán, 2013), sin embargo, faltan estudios que demuestren la funcionalidad de estas estructuras para sugerir un mecanismo similar al IRE/IRP de humano y que además demuestren la relación del hierro con el crecimiento y virulencia del parásito. Finalmente, el estudio del sistema de regulación de dicho catión en *G. duodenalis*, ayudaría a entender el proceso evolutivo y la biología del parásito, además de generar conocimientos que permitan la prevención y tratamiento de la giardiasis y sus complicaciones.

III REVISIÓN DE LITERATURA

AGiardia duodenalis

1. Aspectos generales de *G. duodenalis*

Las infecciones del tracto gastrointestinal por parásitos protozoarios ocurren a nivel mundial y tienen tasas de morbilidad y mortalidad significativas. En este contexto, la giardiasis, causada por *G. duodenalis* es una parasitosis cosmopolita, de alta incidencia en países en vías de desarrollo y se ha asociado a brotes epidémicos importantes en Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos de Norteamérica (Busatti y col,2013; Lane y Lloyd, 2002). La giardiasis presenta una distribución muy amplia con 10-15% de la población mundial infectada en promedio. Su mayor prevalencia se encuentra en zonas tropicales y subtropicales, donde afecta hasta el 30% de los adultos (Goyal y col,2013; Said y col,2012).

El creciente interés en el estudio de la giardiasis se explica, entre otras razones, por ser una de las causas más frecuentes de brotes diarreicos a nivel mundial. Se ha estimado que hay cerca de 1000 millones de casos de giardiasis, lo cual da como resultado 2.5 millones de muertes anualmente por enfermedad diarreica (WHO, 1998). A nivel mundial se estima que alrededor de 200 millones de personas son infectadas anualmente, principalmente en Latino América, Asia y África (Mark-Carew y col, 2013). En nuestro país, durante el 2014 la secretaria de Salud ha reportado un total de 40,239 casos de los cuales 4,611 corresponden al estado de Sinaloa colocándonos en primer lugar nacional en casos de giardiasis (SSA, 2014), de hecho, hasta la semana 19 del presente año se reportan 363 casos por lo que continuamos en primer lugar (SSA, 2015).

2. Ciclo Biológico

Este parásito tiene un ciclo de vida directo simple con dos estadios que permiten su sobrevivencia. La entidad patogénica o vegetativa conocida como trofozoito se adhiere a las células del intestino ocasionando los síntomas de la giardiasis, en tanto que el quiste constituye la entidad infectiva. Así, este parásito presenta dos procesos de diferenciación que se llevan a cabo en el hospedero: el desenquistamiento y el enquistamiento. La infección se inicia mediante transmisión directa persona-persona y oro-fecal por la ingestión de quistes que se encuentran en agua o alimentos contaminados con ellos (Rascón y McKerrow, 2013; Carranza y Lujan, 2009; Craun, 1986).

Una vez que el quiste se localiza en el estómago del hospedero se inicia el desenquistamiento desencadenado por la actividad de las enzimas hidrolíticas pancreáticas así como por el medio ácido de este órgano. Este proceso culmina en el duodeno y finaliza cuando se rompe la pared quística y emerge del quiste una masa tetranucleada de protoplasma denominada excizoito (Humen y col,2011; Bernander y col,2001). A partir de un quiste se generan cuatro trofozoitos que se adhieren a las microvellosidades intestinales del duodeno y se dividen por fisión binaria, colonizando profusamente la mucosa intestinal. El enquistamiento se realiza principalmente en el yeyuno, probablemente por la acción de la bilis (Rascón y McKerrow, 2013; Bazán-Tejeda y col,2008). Los quistes son expulsados por el huésped y permanecen en estado de latencia en el medio ambiente. Debido a las características, particularmente de la pared del quiste, puede sobrevivir en el medio externo aún y cuando se presentan variaciones drásticas de pH (Argüello-García y col,2002). Asimismo, la eficiencia de la transmisión de Giardia depende en forma decisiva de la formación adecuada de esta estructura (Figura 1).

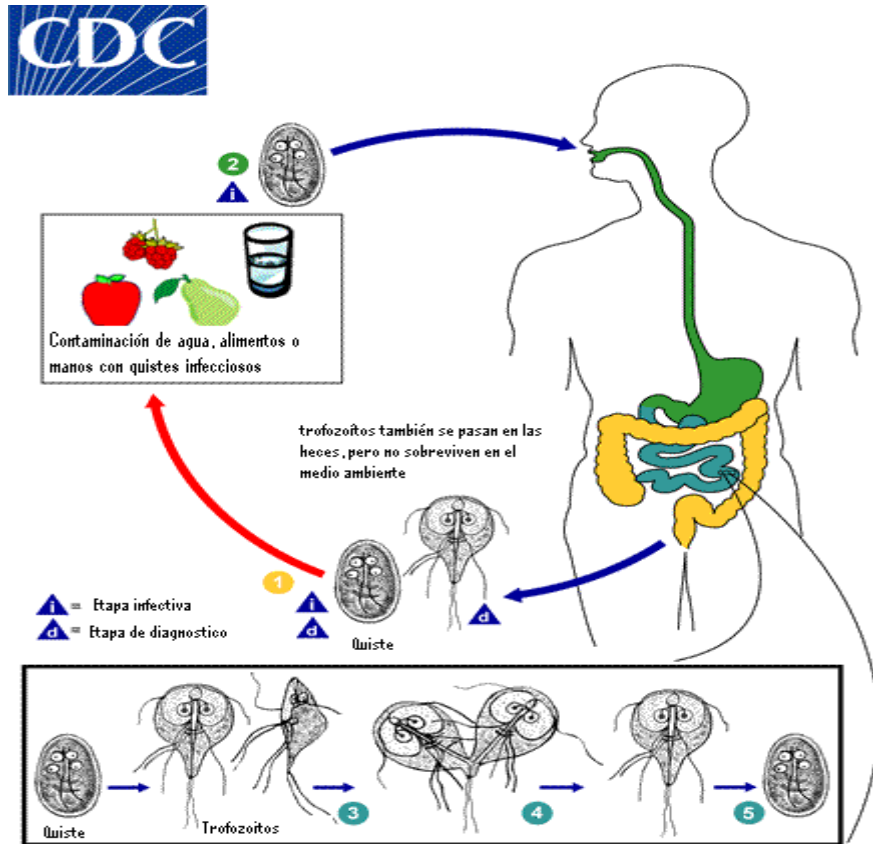


Fig 1. Ciclo biológico de *G. duodenalis*. El parásito *G. duodenalis* tiene dos estadios en su ciclo de vida: trofozoito flagelado y quiste. La infección es iniciada por la ingestión de quistes en alimentos o agua contaminada con ellos, seguido por la exquistación y colonización del intestino por trofozoitos causando la enfermedad (CDC, 2010).

3. Mecanismos de Patogenicidad

Uno de los aspectos de gran relevancia actual en el estudio de *Giardia* y giardiasis es definir los mecanismos patogénicos de esta infección. La patogénesis de *G.duodenalis* es un proceso multifactorial que comienza con la adhesión del parásito hacia los enterocitos del duodeno. La adhesión de los trofozoitos al epitelio intestinal es a través de un disco especializado y es crucial para iniciar la colonización, así como para mantener la infección. Las α -giardinas, son proteínas relacionadas a las anexinas que son altamente expresadas en *Giardia*, las cuales están implicadas en la unión del parásito a la mucosa intestinal, así como en el montaje y desmontaje del citoesqueleto que marca la transición de trofozoitos infecciosos transmisibles a quiste (Yoshida y col,2011).

Se han propuesto diferentes mecanismos posibles de adhesión de este parásito: A) la **fuerza de succión** generada por debajo del disco ventral por movimientos propulsivos del flagelo ventral; B) **Procesos mecánicos** relacionados con proteínas contráctiles del disco ventral y del fleco ventrolateral (Yoshida y col,2011; Peattie, 1990; Crossley y col,1983), y C) Participación de **moléculas de superficie** que permiten la unión del trofozoito a receptores en las células epiteliales del hospedero (Pegado y col,1994). Con el propósito de estudiar el fenómeno de adhesión del parásito a células epiteliales se han empleado diversos modelos, los cuales han aportado conocimientos en cuanto a los factores que participan en la adhesión del parásito a la célula hospedera, pero se conoce poco sobre las moléculas que se expresan durante esta interacción y que pueden jugar un papel importante en el establecimiento del parásito.

Hay pocos estudios acerca de cómo *Giardia* causa la enfermedad; sin embargo la idea más aceptada es que la sintomatología ocasionada es debida a un acortamiento del borde en cepillo de las microvellosidades del epitelio, la cual representa un factor clave en la producción de las enfermedades diarreicas a través de malabsorción y mala digestión (Danquah y col,2014; Halliez y Buret., 2013; Chávez y col,1986; Gillon, 1984).

Estudios previos, en los cuales se han utilizado parásitos de pacientes con sintomatología de giardiasis, han establecido que *Giardia* causa un fenómeno de malabsorción de glucosa, sodio y agua, así como una reducción en la actividad de la disacaridasa debido a la pérdida de la superficie absorbente del epitelio intestinal (Halliez y Buret., 2013; Cotton y col,2011; Gascón, 2006; Müller, 2005; Buret y col,2002). Además, debido a este fenómeno de malabsorción, se observa una hipersecreción de cloro y electrolitos que provoca acumulación de fluidos en el lumen de intestino durante la infección crónica

(Cotton y col,2011; Troeger y col,2007). Asimismo, se ha descrito la reducción y distorsión del borde de las microvellosidades, aumento en el índice mitótico de las células de las criptas epiteliales, interferencia en el metabolismo de sales y ácidos biliares (Halliday y col,1988).

Se ha observado también secreción de moco como producto de la irritación que produce la presencia de los trofozoitos en la pared del epitelio intestinal lo que produce una respuesta inflamatoria. Recientemente se confirmó que las lesiones del borde en cepillo y las deficiencias de disacaridasa en pacientes con giardiasis son dependientes de la presencia de linfocitos CD8+ (Halliez y Buret, 2013; Scott y col,2004) y que un número incrementado de linfocitos intraepiteliales están íntimamente relacionados con el proceso de malabsorción durante la infección por *Giardia* (Gascón, 2006; Müller, 2005; Buret y col,2002). Aunado a esto, se ha observado que los trofozoitos de *G. duodenalis* son capaces de alterar la barrera epitelial incrementando la permeabilidad de los enterocitos principalmente a través de la ruptura de las uniones estrechas, producir modificaciones en el citoesqueleto de las células epiteliales, así como la inducción de la apoptosis de dichas células (Buret, 2007; Troeger y col,2007).

Se ha planteado que el principal mecanismo por el cual los trofozoitos de *Giardia* son capaces de inducir un daño citotóxico es a través de la liberación de proteinasas, lectinas e incluso se ha propuesto la presencia de una “enterotoxina” de 58 kDa que es secretada y en conjunto son responsables directos del daño ocasionado en el borde de las microvellosidades (Humen y col,2011; Shant y col,2004; Kaur y col,2001).

Algunas proteasas de tipo cisteína son liberadas por el trofozoito (Rascón y McKerrow, 2013; Rodríguez-Fuentes y col,2006), la principal función de las cisteín proteasas se encuentra en los procesos de enquistamiento y desenquistamiento (Rascón y McKerrow, 2013). El transcrito de la cisteín proteasa 2 (*CP2*) se sobreexpresa en las etapas vegetativa y de enquistamiento de los trofozoitos. La *CP2* participa en la degradación de proteínas de la pared quística y se encuentra co-localizada en vesículas específicas para el enquistamiento; dichas vesículas contienen los materiales precursores necesarios para la formación de la pared del quiste (Rascón y McKerrow, 2013; Dubois y col,2008). La actividad atribuida a otras proteasas se ha observado en cultivos de *G. duodenalis* (Rascón y McKerrow, 2013; de Carvalho y col,2008; Rodríguez-Fuentes y col,2006; Coradi y col,2006; Williams y col, 1995) e independientemente del análisis del genoma se ha confirmado la presencia de serina, treonina, metalo, aspártico y aminopeptidasas. Sin embargo, sólo dos proteasas han sido caracterizadas parcialmente en *Giardia*; la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV) (Rascón y McKerrow, 2013;

Touz y col,2002).y la proproteína convertasa subtilisina (GSPC) (Rascón Jr y McKerrow, 2013; Davids y col,2011), ambas son proteasas de serina que se encuentran implicadas en los procesos de enquistamiento (DPP IV y GSPC) y desenquistamiento (GSPC).

4. Aspectos moleculares de *G. duodenalis*

Giardia, al igual que los otros organismos amitocnariados, como *T. vaginalis* y *E. histolytica*, recibe gran interés debido a su infectividad. Aunque las posiciones evolutivas exactas de estos protozoarios permanece incierta, existen evidencias considerables que los ubican en una posición muy cercana en la evolución (Vanacova y col,2003).

Recientemente, se obtuvo el borrador de la secuencia del genoma de Giardia el cual tiene un tamaño aproximado de 12 Mbp (Franzén y col,2013; Jex y col,2013). El trofozoito de Giardia es inusual ya que contiene dos núcleos de igual tamaño y morfológicamente indistinguibles. Estos dos núcleos contienen la misma cantidad de DNA y ambos son transcripcionalmente activos. Los trofozoitos parecen ser tetra haploides con el DNA arreglado en cinco cromosomas. El contenido de G+C es de 42-49% (Vanacova y col,2003; Prucca y Lujan, 2009).

Las regiones promotoras de este parásito parecen ser muy compactas y sus regiones intergénicas son muy cortas (a veces menos que 250 pb). Este parásito contiene las regiones no traducidas más cortas reportadas (1-6 nt). Sin embargo, estas regiones poseen todos los elementos requeridos para la regulación transcripcional, los cuales son ricos en A+T. El elemento iniciador de este parásito consta de 8-11 nt (ATTAAAA en la posición -30), con sus variantes. Una A en el medio de la secuencia rica en A-T podría ser el mejor sitio de inicio de la transcripción (Tolba y col, 2013). Resulta interesante saber cómo Giardia regula sus genes debido a la aparente limitada secuencia de sus regiones promotoras. Los genes de Giardia no poseen estructura cap en su 5'-UTR por lo que se sugiere que una secuencia corta de 6 nt podría actuar como sitio de anclaje de los ribosomas para la síntesis de proteínas. Por otra parte, la posible señal de poliadenilación se encuentra 20-30 nt río debajo de codón de paro (AGTPuAApy) (Vanacova y col,2003). A la fecha poco se sabe sobre la regulación de este parásito aún cuando se tiene casi completa la secuencia de su genoma.

5. Metabolismo

Dado que el duodeno es el primer punto de absorción de los alimentos, esto por ser la región inmediata al estómago y recibir enzimas del páncreas y bilis del hígado, se postula que la predilección de los trofozoitos de Giardia por esta región sugiere que requieren una alta concentración de nutrientes para

su supervivencia y proliferación, especialmente los que el parásito no es capaz de sintetizar de *novo* (Yichoy y col,2011; Hernández y col,2007; Das y col,2002).

En ausencia completa de oxígeno, los trofozoitos de *G. duodenalis* metabolizan la glucosa hasta etanol o alanina, mientras que a concentraciones sub-tóxicas de oxígeno, los productos finales son CO₂ y acetato.

El metabolismo energético de *G. duodenalis* está ligado al metabolismo de algunos aminoácidos, entre los que se encuentran la Arginina, que constituye su principal fuente de energía, y la Alanina, producto final del metabolismo en su ambiente natural. Los trofozoitos poseen un mecanismo de transporte para captar la Alanina, a pesar de que pueden producirla desde piruvato, mediante la enzima alanin amino-transferasa (Humen y col,2011; Ringqvist y col,2008).

En lo que se refiere a los lípidos, los trofozoitos de *Giardia* requieren de lípidos y sales presente en la bilis, como son el colesterol, fosfatidilcolina, glicolato y glicoldesoxicolato, importantes para su mantenimiento y crecimiento en cultivos axénicos (Humen y col,2011; Yichoy y col,2011). También se ha demostrado que este parásito es capaz de incorporar ácido palmítico y en menor proporción ácido araquidónico, así como ácidos grasos en forma de fosfolípidos, tanto mediante deacilación como vía reacilación. Incluso se ha propuesto un modelo en como *Giardia* presenta toda una vía desde la entrada de los lípidos hasta su utilización a través de la remodelación de fosfolípidos (Humen y col,2011).

Se ha observado que *Giardia* necesita para su crecimiento de un gran número de nutrientes y metabolitos preformados como carbohidratos, aminoácidos, purinas, pirimidinas, ácidos grasos y esteroides, esto se debe a que carecen de citocromos y de las rutas metabólicas principales como la de los ácidos tricarbónicos y de la fosforilación oxidativa por la carencia de mitocondrias. Sin embargo se ha reportado la presencia de unas estructuras llamadas mitosomas que podrían llevar a cabo una función ancestral de las mitocondrias ya que se han encontrado proteínas que realizan transporte de electrones y una enzima tipo piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFO) (Dolezal y col,2005; Tovar y col, 2003; Townson y col,1996).

La proteínas que se han localizado en los mitosomas son principalmente proteínas involucradas en reacciones oxido-reducción a través de grupos hierro-azufre y proteínas involucradas en la formación precisamente de estos grupos hierro-azufre, como la ferredoxina que junto con la PFO se encargan de activar a los derivados de nitroimidazol, que son los antiparasitarios más utilizados contra *Giardia duodenalis*.

6. Metabolismo del hierro

Todos los organismos vivos, desde el más primitivo hasta el más complejo, requieren de hierro para una amplia variedad de funciones biológicas: procesos de óxido-reducción, en la respiración celular, síntesis de DNA y como transportador de electrones, entre otras. Sin embargo, debido al elevado potencial *redox* del hierro, junto a su facilidad para promover la formación de compuestos tóxicos reactivos los cuales causan daño oxidativo tanto en proteínas como en ácidos nucleicos, determinan que el metabolismo del hierro se debe controlar por un sistema regulador estricto (Shiflett y Johnson, 2010; Jedelsky y col,2011; Tandara y Salamunic, 2012; Wilkinson y Pantopoulos, 2014)

En vertebrados el contenido total de hierro en los humanos es regulado a través del proceso de absorción intestinal. El proceso tiene lugar en la membrana apical de los enterocitos del duodeno y parte inicial del yeyuno. El hierro contenido en la dieta se encuentra principalmente como hierro férrico (Fe^{3+}) o como hierro hemo. El hierro férrico forma fácilmente complejos insolubles y para su absorción debe ser previamente reducido a ferroso por una reductasa situada en la membrana apical del enterocito que recibe el nombre de Dcytb (citocromo b duodenal). Ya como Fe^{2+} puede ser transportado hacia el interior de la célula por el transportador de metales divalentes (DMT1 o Nramp2). El hierro hemo presente en la dieta se absorbe directamente a través de un transportador no identificado, pero donde se ha visto la participación de un transportador de folatos (PCTF) (Inoue y col, 2008; Makai y col,2007; Qui y col,2006).

7. Efecto del hierro en protozoarios

Se ha reportado que el hierro es un catión esencial para los seres vivos y en protozoarios se ha relacionado con los mecanismos de patogenicidad; por ejemplo, los mecanismos de adhesión y citotoxicidad de *T. vaginalis* y *E. histolytica* se ven aumentados en condiciones de alto hierro (Hernández-Gutiérrez y col,2004; 2003; Álvarez- Sánchez y col,2001; Lehker y col,1991; Lee y col,2008; Park y col,2001).

En *T. vaginalis*, se ha reportado que el hierro modula negativamente algunas cisteín proteinasas, ya que a concentraciones altas de hierro en el medio de cultivo se reduce la actividad y expresión de superficie de estas CPs (Hernández-Gutiérrez y col,2003; Hernández-Gutiérrez y col,2004; Álvarez-Sánchez y col,2000). En *E. histolytica*, mediante ensayos de "Northern blot" utilizando parásitos crecidos en condiciones normales y de bajo hierro, se observó regulación negativa por hierro de seis diferentes proteinasas de tipo cisteína (CP1, CP2, CP3, CP4, CP5 y CP6) (Park y col, 2001). Por otra parte, Lee y

col, (2008) reportaron que el hierro es un factor importante en la adherencia y citotoxicidad de *E. histolytica* a las monocapas de células CHO (células de ovario de hámster chino). Estos estudios mostraron que la ausencia de hierro en el medio afecta el crecimiento de los parásitos, pero que una concentración elevada de este catión no afecta dicho crecimiento. Sin embargo, la capacidad adhesiva y citotóxica de las amibas aumenta en altas concentraciones de hierro (285 μM) (Lee y col, 2008). Por otro lado, Cruz-Castañeda y Olivares-Trejo identificaron una proteína de 45 kDa, Ehhmbp45, que se une a hemoglobina como fuente de hierro y encontraron que los niveles de RNAm son regulados negativamente por hierro (Cruz-Castañeda y Olivares-Trejo, 2008). Sin embargo, los mecanismos por los cuales ocurre esta modulación son poco estudiados a la fecha. En *G. duodenalis*, la gran necesidad por hierro se refleja en la anemia causada sobre todo en niños con giardiasis (Bartelt y col, 2013), donde después del tratamiento con metronidazol se observa aumento de hemoglobina en la sangre (Monajemzadeh y Monajemzadeh, 2008; Olivares y col, 2004) por lo que la presencia de *Giardia* en niños está estrechamente relacionada con malnutrición y se ha considerado un predictor de dicha condición (Bartelt y col, 2013; Al-Mekhlafiy col, 2005). A pesar de ello, la modulación por hierro en este protozoario ha sido menos estudiada.

B Homeostasis del hierro en las células

El hierro es un elemento esencial para todos los organismos vivos. En soluciones acuosas, el hierro puede encontrarse en dos estados de oxidación estables: Fe^{2+} (ferroso) y Fe^{3+} (férrico). Esta propiedad le permite participar en reacciones que abarcan gran parte de la bioquímica de la célula, incluyendo aquellas que controlan el flujo de electrones a través de rutas bioenergéticas, la síntesis de DNA y el aporte de oxígeno a los tejidos. La deficiencia del hierro en la célula afecta su crecimiento y lleva a la muerte celular. Sin embargo, el exceso de hierro libre también es tóxico para la célula. Esta toxicidad se debe a la habilidad del hierro libre de generar especies reactivas de oxígeno. Dado que tanto la deficiencia como la sobrecarga de hierro son perjudiciales, su absorción, concentración y estado redox deben ser regulados cuidadosamente (Wilkinson y Pantopoulos, 2014; Tandara and Salamunic, 2012; Pérez y col, 2005; Pantopoulos, 2004).

En procariontes, la regulación por hierro se da principalmente por la proteína represora Fur la cual regula los genes que están involucrados en la captación de hierro y la biosíntesis de sideróforos (queladores específicos para Fe^{3+}) en respuesta al nivel de hierro en la célula. La secuencia que reconoce Fur es GATAATGATAATCATTATC conocida como caja Fur (Hantke, 2001).

En eucariontes, el hierro se encuentra formando parte de dos compartimientos: uno funcional y otro de depósito. El transporte de hierro unido a la transferrina facilita el intercambio de metal entre ambos compartimientos. El exceso de hierro se deposita intracelularmente asociado a ferritina (Rouault y Harford, 2000; Ponka y col, 1998; Hentze y Kuhn, 1996). Por otra parte, transferrina se une al receptor de transferrina y este complejo es endocitado y acidificado por una bomba de protones en el endosoma temprano por lo que se afecta la conformación del complejo transferrina/receptor de transferrina para liberar el hierro (Aisen y col, 1980). Las proteínas que participan en la captura, almacenamiento, utilización y transporte de este metal deben ser reguladas coordinadamente. Las señales y mecanismos regulatorios que orquestan su secreción involucran la modulación de la transcripción, estabilidad del RNAm, traducción y modificaciones postraduccionales (Pérez y col, 2005; Hentze y col, 2004).

C El sistema tipo IRE/IRP

La regulación postranscripcional por el sistema IRE/IRP es la más estudiada. Las proteínas citoplásmicas reguladoras de hierro, IRP-1 e IRP-2, interactúan con elementos de respuesta a hierro (IREs), los cuales son estructuras de tallo-burbuja conservadas que se encuentran en las regiones no traducidas (UTR) de los RNAm que codifican proteínas relacionadas a la homeostasis del hierro (Selezneva y col, 2013; Goforth y col, 2010). Un solo IRE localizado en el extremo 5'-UTR del RNAm de ferritina es reconocido por la proteína IRP y este complejo IRE/IRP inhibe su traducción (Muckenthaler y col, 1998). El segundo tipo de regulación ocurre cuando el IRE está localizado en el extremo 3'-UTR del RNAm. El receptor de transferrina, por ejemplo, posee cinco estructuras IREs en esta región y sirven para estabilizar el RNAm cuando se une la IRP (Hentze y Kuhn, 1996). Los IREs son estructuralmente similares. Los IREs canónicos tienen 31-nt de los cuales seis forman una burbuja con la secuencia consenso 5'-CAGUGN-3', un tallo de cinco bases apareadas, una pequeña asa o protuberancia asimétrica con una citocina no apareada en la hebra 5' y un tallo adicional de longitud variable (Hentze y Kuhn, 1996).

El almacén de hierro celular regula la unión de las proteínas IRP-1 e IRP-2 por mecanismos distintos (Henderson y Kuhn, 1995). Cuando los niveles de hierro son altos, un grupo 4Fe-4S de la IRP-1 se ensambla y se inhibe la actividad de unión al IRE por lo que se convierte en aconitasa (Haile, 1992; Haile y col, 1992). Cuando los niveles de hierro celular son bajos, la IRP-1 se une al IRE, por lo que la IRP-1 actúa como una proteína bifuncional (Figura 2) (Selezneva y col, 2013; Goforth y col, 2010; Brazzalotto y col, 2002; Gegout y col, 1999; Pantopoulos y col, 1996). La IRP-2 posee el 62% de

homología con la IRP-1 pero, a diferencia de ella, no posee el grupo Fe-S y no tiene actividad de aconitasa. La IRP-2 tiene la capacidad de unirse con elevada afinidad a secuencias IRE en condiciones de bajo hierro, pero en alto hierro se degrada vía proteasoma (Hentze y Kuhn, 1996; Iwai y col, 1995). La IRP-2 contiene una inserción de 73 aminoácidos ricos en prolina y cisteína en el extremo amino-terminal que se ha involucrado en la detección de hierro y en la degradación mediada por proteosoma (Guo y col, 1995).

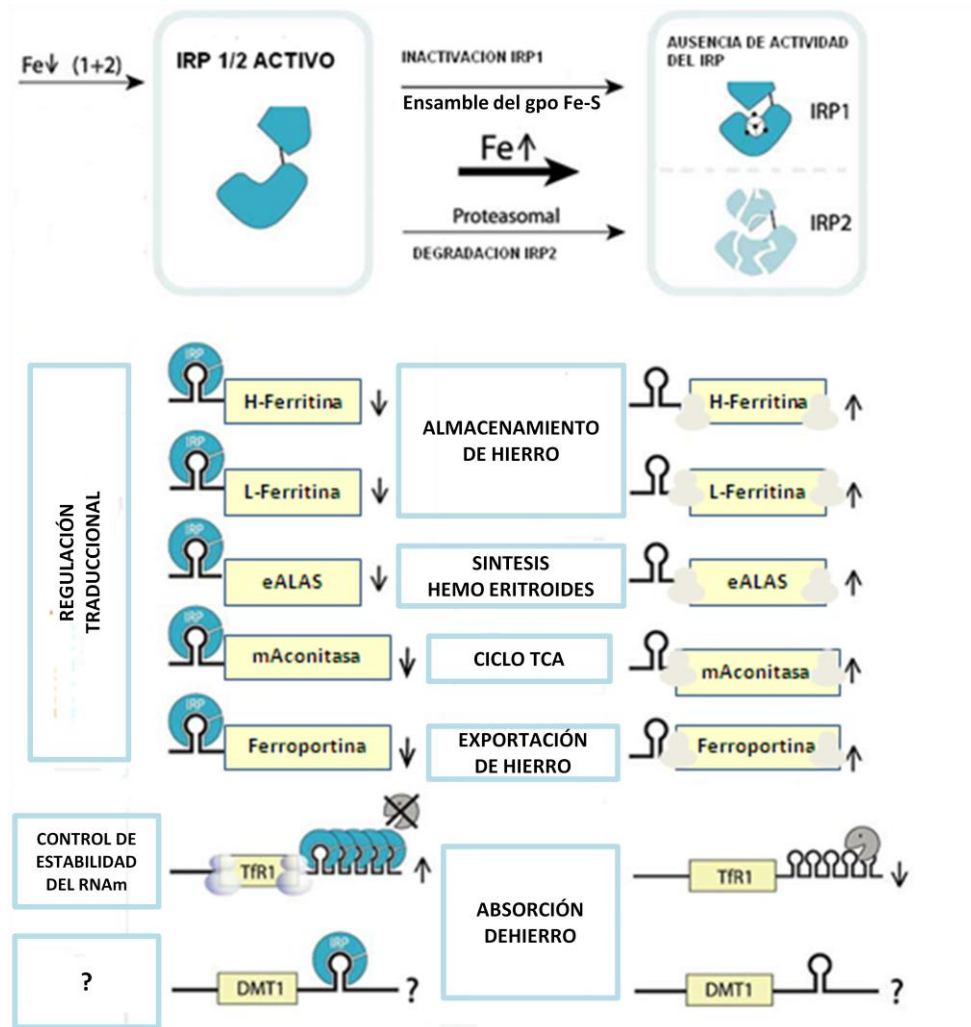


Fig 2. Sistema de Regulación IRE/IRP. Proteínas involucradas en el almacenamiento de hierro (Hentze y col, 2004).

D RNAm con estructuras IREs

Otros RNAm eucariontes que contienen IREs en su 3'-UTR son: DMT1 (transportador de metales), CDC14A (que participa en la división celular) y MRCK α (cinasa de unión a Cdc42) los cuales no han sido bien estudiados (Leipuviene y Theil, 2007). Y aquellos RNAm de eucariontes primitivos son: *tvcp12* (cisteína proteinasa del parásito protozoario *Trichomonas vaginalis*) (León-Sicairos y col, 2015, *en revisión*) y en algunos que codifican para proteínas hipotéticas del parásito protozoario *P. falciparum* (Militello y col, 2004; Loyevsky y col, 2003). En cuanto a los RNAm que contienen IREs en su 5'-UTR se encuentran ACO2/acon (aconitasa mitocondrial), ferroportina, Subunidad β de la succinato deshidrogenada, ALAS2/ALASE/ASB (5'-aminolevulínico ácido sintetasa) y EPAS1/HIF-1 α (dominio endotelial PAS, inducible en hipoxia) (Leipuviene y Theil, 2007). En eucariontes primitivos, *tvcp4* (cisteína proteinasa 4 de *T. vaginalis*) (Solano-González y col, 2007), como se muestra en la Figura 3. Todos estos RNAm codifican proteínas que participan en el metabolismo del hierro o en la virulencia. Además, se encuentra relación estrecha entre algunos polimorfismos de estos genes con enfermedades importantes como anemia, cáncer, diabetes, enfermedades infecciosas y deficiencias del sistema inmune (Malquori y col, 2008; Leipuviene y Theil, 2007; Good y col, 1988). Sin embargo, en el parásito protozoario *G. duodenalis* no se han realizado estudios que sugieran la presencia de un mecanismo tipo IRE/IRP aún cuando evolutivamente es un microorganismo muy relacionado con *T. vaginalis* y *P. falciparum* en los cuales recientemente se ha reportado la presencia de este mecanismo de regulación por hierro. En nuestro laboratorio hemos realizado análisis preliminares donde se han encontrado estructuras tallo-burbuja en RNAm, sin embargo, faltan estudios para demostrar que estas estructuras son estables y funcionales, lo que sugeriría un mecanismo de regulación postranscripcional por hierro tipo IRE/IRP en este protozoario. Por otro lado, aunque ha sido poco estudiado, el hierro forma parte importante en el crecimiento y virulencia de *Giardia*, la gran necesidad del parásito por dicho catión se refleja en la anemia causada sobre todo en niños con giardiasis (Bartelt y col, 2013), donde, después del tratamiento con metronidazol se observa aumento de hemoglobina en la sangre (Monajemzadeh y Monajemzadeh, 2008; Olivares y col, 2004) por lo que la presencia de *Giardia* en niños está estrechamente relacionada con malnutrición y se ha considerado un marcador de dicha condición (Bartelt y col, 2013; Al-Mekhlafi y col, 2005).

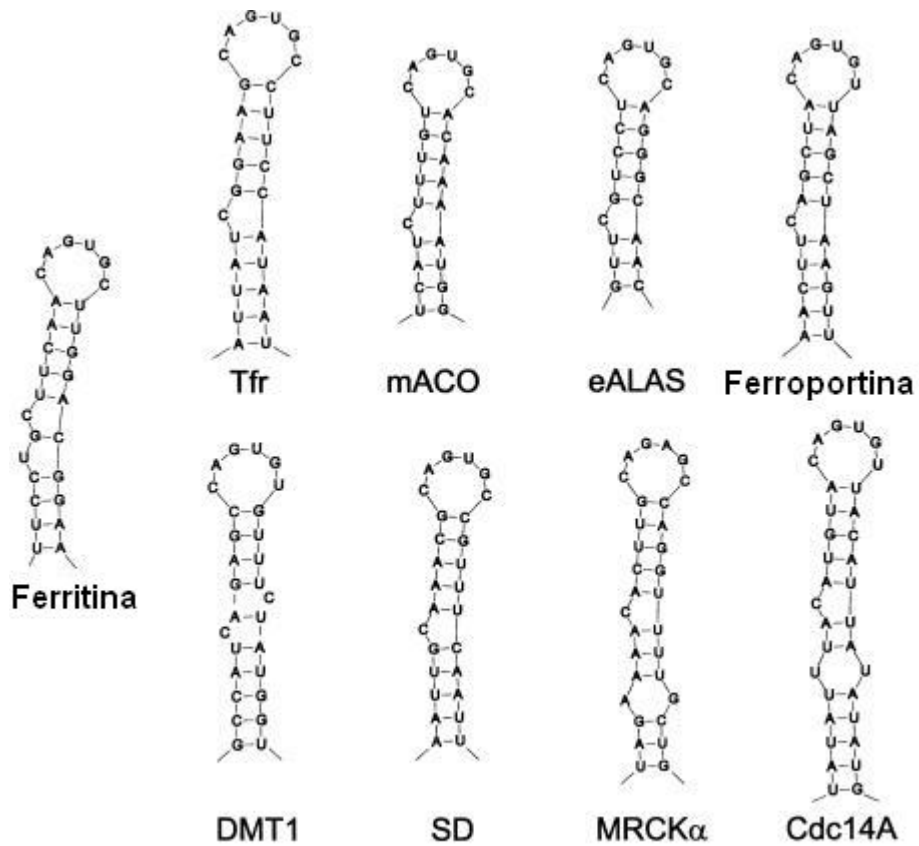


Fig 3. Elementos de Respuesta al Hierro (IREs). Estructuras tallo burbuja de RNAm de eucariontes superiores; Ferritina, Tfr, mACO, eALAS, Ferroportina, DMT1, MRCK y Cdc14A son genes de humano y SD es gen de *Drosophila melanogaster*. Tomado de Piccinelli y Tore, 2007.

IV JUSTIFICACIÓN

La presencia de *G. duodenalis* en niños está estrechamente relacionada con malnutrición reflejando una necesidad de hierro por este parásito de importancia clínica. A pesar de ello, no se cuenta con estudios acerca del efecto del hierro en el crecimiento y patogenicidad del parásito, mucho menos acerca de la modulación de sus genes. Estudios preliminares de nuestro equipo de trabajo muestran la presencia de estructuras tallo-burbuja en diferentes RNAm, sin embargo faltan estudios para demostrar que estas estructuras son estables y funcionales, lo que sugeriría un mecanismo de regulación postranscripcional por hierro tipo IRE/IRP en este protozoario. El estudio de la regulación por hierro, ayudaría a entender el proceso evolutivo y la biología de este parásito, además de obtener conocimientos que permitan apoyar la prevención y tratamiento de la giardiasis. Así mismo *G. duodenalis* representa un modelo de estudio interesante para demostrar la presencia del mecanismo IRE/IRP en su forma más primitiva.

VHIPÓTESIS

El hierro afecta el crecimiento de *G. duodenalis* al igual que sucede con otros protozoarios patógenos evolutivamente cercanos y por lo tanto presenta un mecanismo de adquisición y regulación del hierro similar al de eucariontes superiores.

VIOBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del hierro sobre el crecimiento de *G. duodenalis*, así como la presencia de un mecanismo de regulación postranscripcional.

B OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto del hierro sobre el crecimiento de *G. duodenalis*.
2. Investigar la presencia de estructuras tallo-burbuja en RNAm de *G. duodenalis*.
3. Investigar la presencia de la proteína IRP en el proteoma de *G. duodenalis*.
4. Determinar la formación de complejos ribonucleoproteicos entre RNAm de *G. duodenalis* y la proteína reguladora de hierro de humano.

VIIMATERIALES Y MÉTODOS

A Cultivos de *G. duodenalis*

El aislado WB de *G. duodenalis* fue donada gentilmente por la Dra. Guadalupe Ortega Pierres del departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN y Dr. Héctor Samuel López Moreno de nuestra Facultad. El cultivo se realizó en medio TYI-S-33 enriquecido con suero fetal bovino al 10%, bilis 1 g/L, pH de 7.0, 50 µg/mL de gentamicina y se filtró con membrana de 0.45µm. Al medio de cultivo se le añadió citrato de amonio férrico (sigma) a una concentración de 110 µM para obtener las condiciones de alto hierro, y resina quelex para las condiciones de bajo hierro (7.7 µM) previo al inóculo de los parásitos crecidos en condiciones normales. Las giardias fueron cosechadas en tubos falcom de 15 mL con medio nuevo por enfriamiento a 4°C, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min (Bagchi, 2012), posteriormente se decantó el sobrenadante, luego la pastilla se resuspendió en 1.5 mL de suero fetal bovino; se homogenizó y se resuspendió en 13.5 mL de medio nuevo, finalmente se incubó a 37 °C por 24 h (Tasca y col, 2005). El cultivo se observó periódicamente en un microscopio invertido (Leica) para verificar su crecimiento y descartar contaminación, al llegar a su fase logarítmica los trofozoitos fueron decantados en tubos falcom de 15 mL, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4°C posteriormente se decantó el sobrenadante, luego la pastilla se procesó de acuerdo a los ensayos necesarios o se resuspendió en 90% de suero fetal bovino y 10% de DMSO para su almacenamiento a -70 °C y uso posterior (Bagchi, 2012).

B Cinética para medición del crecimiento de *G. duodenalis* en diferentes concentraciones de hierro

Para la medición del crecimiento del protozooario *G. duodenalis*, se partió del medio de cultivo TYI-S-33 en condiciones normales de hierro (55 µM) el cual fue descrito anteriormente. Para obtener las condiciones de alto hierro, al medio de cultivo se le añadió citrato de amonio férrico a una concentración de 110 µM y para las condiciones de bajo hierro (7.7 µM) se adicionaron 1.25 g de la resina quelex dejándose en agitación en un ambiente frío (4 C) durante 16 h. Para la realización de la cinética de crecimiento 4.9×10^6 trofozoitos crecidos en condiciones normales se inocularon en las diferentes condiciones de hierro y se incubaron a 37 °C para obtener los tiempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 168 h, transcurrido el tiempo los cultivos con las diferentes condiciones de hierro se centrifugaron en tubos falcom de 15 mL a 1500 rpm, 4 °C durante 5 min, a la pastilla se le realizó un lavado con PBS 1X, se homogenizó y se colocaron 10 µL en la cámara de Neubauer para realizar el conteo de trofozoitos. De igual manera se preparó una dilución 1:10 con azul de tripano y se añadieron 10 µL en la cámara de

Neubauer para corroborar la viabilidad de *G. duodenalis*. El conteo, viabilidad y morfología del parásito se observaron en un microscopio invertido (Leica).

C Análisis bioinformático del genoma del parásito *G. duodenalis*

1. Búsqueda de estructuras tallo-burbuja en RNAm's de *G. duodenalis*

Se utilizó la base de datos de la secuencia del genoma de *G. duodenalis* (www.giardiadb.org), se tomaron las secuencias que codifican proteínas de virulencia, del citoesqueleto, proteínas ribosomales y del metabolismo. Los extremos de las secuencias se delimitaron de la siguiente manera. Para la región 5'UTR se delimitó de acuerdo a lo reportado por Knodler y col, 1999; Elmendorf y col, 2000 donde proponen regiones ricas de A/T como iniciadores de la transcripción. Una A en el medio de la secuencia rica en A/T podría ser el mejor sitio de inicio de la transcripción (Tolba y col, 2013). En la región 3'UTR se buscó la señal consenso poliA AGTPuAA (Peattie y col, 1989), la cual es levemente degenerada en las posiciones 1, 2 y 3 al igual que la señal ATGGAA ubicada de 9-13 pb río arriba de donde se lleva a cabo la poliadenilación (Que y col, 1996). Una vez delimitadas las secuencias, las estructuras secundarias se analizaron mediante el programa mfold de Zuker (Zuker y col, 2003) en busca de estructuras tallo-burbuja.

2. Búsqueda de la proteína IRP en el proteoma de *G. duodenalis*

Mediante análisis *in silico* se buscó el ortólogo IRP en el genoma de Giardia(www.giardiadb.org) utilizando como sonda las secuencias de las IRPs: proteína citoplasmática reguladora de hierro 1 (*Homo sapiens*), proteína citoplasmática reguladora de hierro 2 (*Homo sapiens*), proteína reguladora de hierro (*Anopheles gambiae*), proteína reguladora de hierro 1A (*Drosophila melanogaster*), proteína reguladora de hierro 1B (*Drosophila melanogaster*), proteína reguladora de hierro (*Plasmodium falciparum*), obtenidas del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) que codifican para proteínas tipo IRP de humano y de otros organismos (Cuadro 1). Por último dichas secuencias se utilizaron para realizar alineamientos múltiples en el programa bioinformático Biology Workbench (www.workbench.sdsc.edu).

Cuadro 1.- Secuencias de proteínas IRP utilizadas para buscar al ortólogo de IRP en el proteoma de *G. duodenalis*

Proteína	Número de Acceso
Proteína citoplasmática reguladora de hierro 1 (<i>Homo sapiens</i>)	NP_002188.1
Proteína citoplasmática reguladora de hierro 2 (<i>Homo sapiens</i>)	NP_004127.1
Proteína reguladora de hierro (<i>Anopheles gambiae</i>)	CAA04136.1
Proteína reguladora de hierro 1A (<i>Drosophila melanogaster</i>)	CAA11211.1
Proteína reguladora de hierro 1B (<i>Drosophila melanogaster</i>)	CAA11212.1
Proteína reguladora de hierro (<i>Plasmodium falciparum</i>)	CAB41452.1

D Plásmidos pSPT-Fer y pGEX-hIRP-1

Los plásmidos pSPT-Fer y pGEX-hIRP-1 (Kaldy y col, 1999), fueron amablemente donados por el Dr. Kuhn (Institut Suisse Recherches Experimentales sur le Cáncer, Switzerland) a nuestro grupo de investigación. Las características de cada plásmido son las siguientes: pSPT-Fer contiene 28 pb de la región 5'UTR de ferritina de humano (bases de la 31 a la 58) y el pGEX-hIRP-1 contiene 3498 pb del DNAc completo de la IRP-1 de placenta humana (Cuadro 2). El plásmido pSPT-Fer linearizado con *Bam*HI se purificó mediante QIAquick (Gel Extraction Kit) y se realizó la transcripción *in vitro* para el ensayo de retardo.

Cuadro 2. Características de los plásmidos que contienen el gen que codifica para la IRP-1 y el IRE de ferritina de humano

PLÁSMIDO	VECTOR	CARACTERÍSTICAS
pGEX-hIRP-1*	pGEX-2T (4900 pb)	3498 pb del cDNA completo de la IRP-1 de placenta humana
pSPTfer*	pSPT-18 (3104 pb)	28 pb de la región 5' no traducida de la ferritina (bases 31 a la 58)

* Plásmidos donados amablemente por el Dr.Kuhn (Institut Suisse de Recherches Experimentales Sur le Cáncer, Switzerland).

E Diseño de oligonucleótidos específicos y amplificación por PCR de las secuencias de interés

Una vez identificadas las estructuras tallo-burbuja en las regiones no traducidas de diferentes RNAm, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar por PCR dichas secuencias (Cuadro 3). Los oligonucleótidos contienen la secuencia de unión de la T7 RNA polimerasa para los ensayos de transcripción *in vitro*. El DNA utilizado para la transcripción *in vitro* fue el plásmido pSPT-fer que contiene al elemento tallo-burbuja (IRE) de ferritina del ser humano (IRE-fer) linealizado con *Bam*HI el cual es nuestro control positivo. Además, utilizamos los amplicones; Catepsina L11 y RPL13, correspondientes a las estructuras tallo-burbuja encontradas en las 5' ó 3'-UTR en los RNAm analizados de *G. duodenalis*. La reacción de cadena de la polimerasa se realizó como indica la casa comercial (Invitrogen), se añadieron 12 µL de Buffer 10X, 2.4 µL de DNTP's, 3.6 µL de MgCl₂, 2µL de los oligonucleótidos (1 µg/ µL), 0.5 µL de la enzima Taq polimerasa y 97.5 µL de H₂O inyectable; para un volumen final de reacción de 120 µL. La temperatura de alineamiento para Catepsina L11 es de 82.6 °C y de la RPL13 es de 67.1 °C. Las condiciones para la PCR fueron: temperatura inicial 95°C por 5 min, desnaturalización 95° por 1 min, se utilizó un gradiente de 67-87°C como temperatura de alineamiento, para la extensión 72°C por 2 min y para la extensión final 72°C por 5 min, durante 30 ciclos. Los amplicones se analizaron en un gel de agarosa al 3%, en amortiguador de corrida TAE 1X a 80 V por 50 min, teñido con 0.5 µL de Gel Red (BIOTIUM).

Cuadro 3. Secuencia de Oligonucleótidos específicos de IREs-like en RNAm's de *G. duodenalis*.

Oligonucleótidos	Secuencia (5' - 3')
Catepsina L11 sentido	<u>TAATACGACTCACTATAG</u> GGGTGTCGATGCTTTGTGCCACAA CAATCTTTTGGCT
Catepsina L11 antisentido	AGCCAAAAGATTGTTGTGGCACAAAGCATCGACA
RPL13 sentido	<u>TAATACGACTCACTATAG</u> GGTTATAATGGCAAGTTATGCTTCT TTTATAT
RPL13 antisentido	ATATAAAGAAGCATAACTTGCCATTATAA

Se muestra la secuencia del promotor T7 en negritas y subrayado.

F Transcripción *in vitro* de secuencias tallo-burbuja

El DNA utilizado para la transcripción *in vitro* fue el plásmido pSPT-fer que contiene al elemento tallo-burbuja (IRE) de ferritina de humano (IRE-fer) linearizado con *Bam*HI el cual es nuestro control positivo. Además, utilizamos los amplicones; Catepsina L11 y RPL13 correspondientes a las estructuras tallo-burbuja encontradas en las 5' ó 3' UTR en los RNAm analizados de *G. duodenalis*. La reacción de transcripción se realizó como indica la casa comercial (AMBION®), se tomaron 8 µL del DNA, se le adicionó 2 µL de amortiguador de transcripción a una concentración final de 10X más una mezcla de los nucleótidos ATP, CTP, GTP y UTP, además 2 µL de RNA polimerasa T7, la mezcla se incubó 3 h a 37 °C. Después, se agregaron 1 µL de DNAsa y la mezcla se incubó durante 20 min a 37 °C. Posteriormente, se le agregaron a la mezcla 15 µL de acetato de sodio 3M, 115 µL de H₂O inyectable más 300 µL de etanol al 100% para que precipite y se colocó a -70 °C durante toda la noche. Luego, la mezcla de reacción se centrifugó a 13,000 rpm por 20 min a 4 °C, el sobrenadante se decantó, se secó la pastilla y se resuspendió en 20 µL de agua libre de nucleasas (AMBION®). Los transcritos se analizaron en un gel de agarosa al 3%, en amortiguador de corrida TBE 1X a 80 V por 60 min, teñido con 0.5 µL de Gel Red (BIOTIUM).

G Inducción, expresión y purificación de la hIRP-1 recombinante

El cDNA total que codifica para la proteína reguladora de hierro en el humano (hIRP-1) se encuentra clonado en el vector de expresión pGEX-2T, denominado pGEX-hIRP. Para su crecimiento, se inocularon 50 mL de medio LB-ampicilina con la clona de *E. coli* que contiene la hIRP y se mantuvieron en agitación a 200 rpm a 37 °C durante toda la noche. De este cultivo se tomaron 10 mL y se inocularon en 150 mL de medio LB-ampicilina, se creció en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. La inducción se realizó con IPTG 1 mM a 26 °C toda la noche en agitación a 200 rpm. Posteriormente, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 6,000 rpm por 10 min a 4 °C, el sobrenadante se decantó y a la pastilla se le adicionó 15 mL de amortiguador de lisis (PBS 1X, pH 7.0, Tritón X-100 al 1%) (Apéndice), se sonicó por 40 s, 4 veces al 50% de amplitud en el sonicador MICROSON™ ultrasonic cell disruptor XL, posteriormente, el extracto se centrifugó a 5,000 rpm por 30 min a 4 °C y el sobrenadante se recuperó e interaccionó con Glutation-sepharosa previamente equilibrada con PBS 1X (Apéndice), posteriormente se pasó todo el sobrenadante a través de la columna previamente equilibrada (1 mL cada min), la cual se lavó 2 veces con PBS 1X. La proteína recombinante se eluyó con 5 mL de glutatión reducido 10 mM Tris-HCl 50 mM; se pasó 1 mL de

glutación cada min y cada mL se colocó en un tubo eppendorf, los cuales se rotularon y se almacenaron a 4 °C. La proteína eluída se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 6% teñido con azul de Coomassie R-250 al 0.05%. Las fracciones purificadas se almacenaron a 4 °C para su uso (Kaldy y col, 1999, con modificaciones).

H Ensayos de retardamiento en gel

Los ensayos de retardamiento en gel se realizaron mediante el kit “Electrophoretic Mobility Shift Assay” (EMSA) de la casa comercial Invitrogen. La proteína GST-hIRP-1, se incubó en buffer de enlace 5X y β -mercaptoetanol por 15 min a 4 °C. Después, la proteína se interactuó con 5 μ L del RNAm del IRE de ferritina de humano (IRE-Fer) y los RNAm de Catepsina L11 y RPL13 de *G. duodenalis* los cuales se incubaron durante 15 min a 4 °C. Posteriormente, la mezcla de interacción se analizó en un gel de poliacrilamida al 6% durante 45 min a 120 V. Por último, se tiñó el gel con 5 μ L de Gel Red en 50 mL de TBE 1X durante 20 min y se visualizó en el transluminador UV spectroline.

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A Efecto del hierro sobre el crecimiento de *G. duodenalis*

Se ha reportado que *G. duodenalis* utiliza el hierro para nutrirse, sin embargo no existen estudios relacionados con el efecto del hierro en el crecimiento y virulencia en dicho parásito. En los parásitos protozoarios evolutivamente cercanos a Giardia como *T. vaginalis* y *E. histolytica* se ha reportado que el hierro afecta tanto el crecimiento como la virulencia y la expresión diferencial de genes (León-Sicairos y col, 2015 *en revisión*; Torres-Romero y Arroyo., 2009; Solano-González y col, 2007; Lee y col, 2008; Park y col, 2001), por lo que hipotetizamos que el hierro tiene un efecto sobre el crecimiento de *G. duodenalis*. Para determinar dicho efecto, se realizaron cinéticas de crecimiento del parásito partiendo del medio de cultivo TYI-S-33 en condiciones normales de hierro (55 μ M); para obtener las condiciones de alto hierro, al medio de cultivo se le añadió citrato de amonio férrico (110 μ M) y para las condiciones de bajo hierro se adicionó resina Chelex para una concentración final de 7.7 μ M (Figura 4). Posteriormente, para la iniciación de la cinética de crecimiento 4.9 x 10⁶ trofozoitos crecidos en condiciones normales se inocularon en las diferentes condiciones de hierro (7.7 μ M, 55 μ M y 110 μ M) y se incubaron a 37 °C durante los tiempos t₁=0, t₂=24, t₃=48, t₄=72, t₅=96, t₆=120 y t₇=168 h realizándose el conteo y viabilidad celular (Figura 5). Después de 24 h (t₁) el número de parásitos fue de 5.1 x 10⁶ trofozoitos en bajo hierro, 5.5 x 10⁶ trofozoitos en medio normal y 6.4 x 10⁶ trofozoitos en alto hierro lo que sugiere que Giardia requiere del hierro para su adecuado crecimiento pues a mayor cantidad de hierro mayor número de parásitos. Conforme aumenta el tiempo de incubación (t₂=48 horas) aumenta el número de parásitos, sin embargo, después de 96 h (t₄) se observó marcada disminución en bajo hierro (4.2 x 10⁶ trofozoitos) lo que representa el 27% de disminución respecto al tiempo anterior, y un gran aumento en las condiciones de normal y alto hierro (12.4 x 10⁶ y 11.8 x 10⁶ trofozoitos, respectivamente). Posteriormente, a las 120 h (t₅) de incubación se observó un decrecimiento de Giardia en las tres condiciones de hierro; 2.9 x 10⁶ trofozoitos en bajo hierro, 12.1 x 10⁶ trofozoitos en medio normal y 8.8 x 10⁶ trofozoitos en alto hierro. Finalmente transcurridas 168 h (t₆) observamos 1.5 x 10⁶ trofozoitos en bajo hierro, 8.7 x 10⁶ trofozoitos en medio normal y 2.7 x 10⁶ trofozoitos en alto hierro. En las condiciones de bajo hierro en el cultivo se observó reducción en la duplicación y viabilidad del parásito lo que indica que el hierro es un elemento esencial para el crecimiento de los trofozoitos de *G. duodenalis*. Bajo las concentraciones de hierro analizadas se observa mejor crecimiento y viabilidad en las condiciones normales del cultivo, sin embargo, durante los

primeros tiempos estudiados se observó una mayor duplicación en las condiciones de alto hierro (110 μM) por lo que posiblemente al utilizar concentraciones mayores de hierro en el cultivo se podrían aumentar las duplicaciones tal y como sucede con *T. vaginalis* y *E. histolytica*.

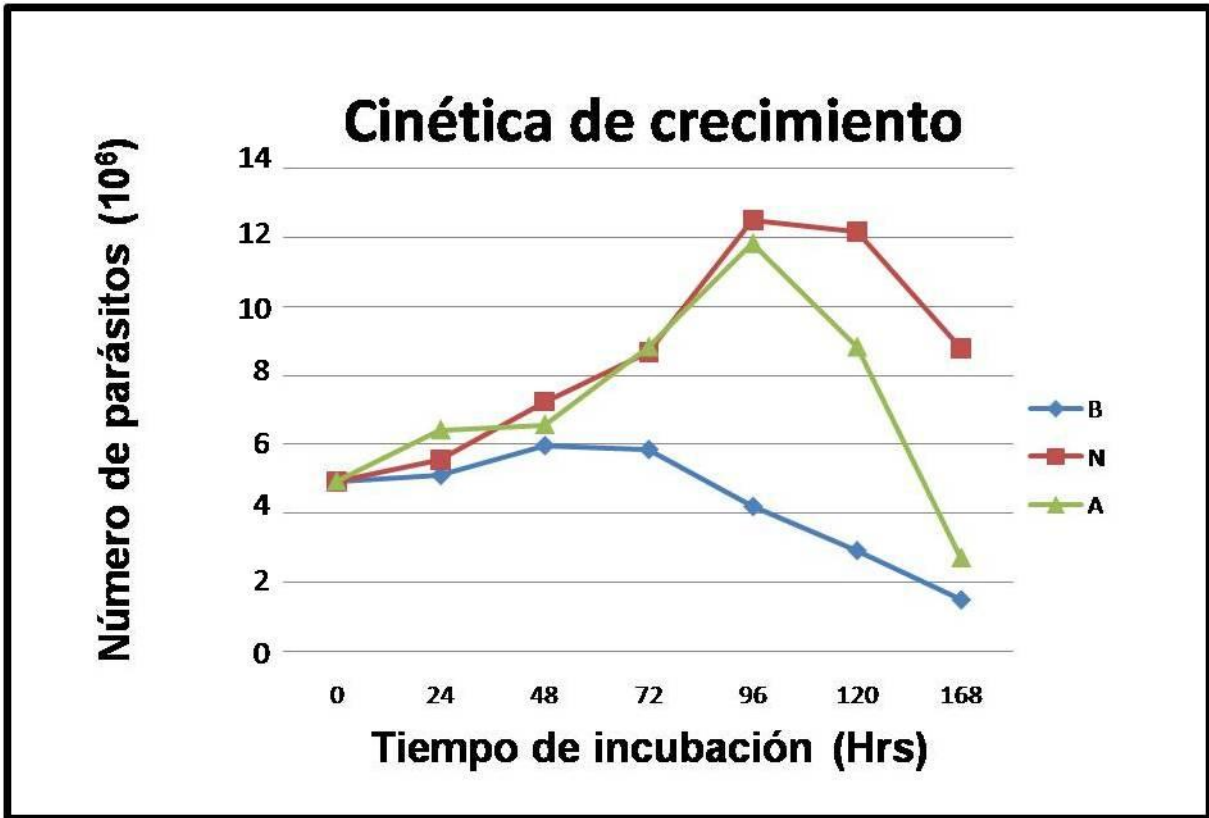


Fig 4. Efecto del hierro sobre el crecimiento de *G. duodenalis*. La cinética se inició mediante la inoculación de 4.9×10^6 trofozoitos en diferentes condiciones de hierro: $7.7 \mu\text{M}$ (\diamond en color azul; Bajo), $55 \mu\text{M}$ (\square en color rojo; Normal) y $110 \mu\text{M}$ (Δ en color verde; Alto), se incubaron a 37°C durante los tiempos $t_1=0$, $t_2=24$, $t_3=48$, $t_4=72$, $t_5=96$, $t_6=120$ y $t_7=168$ h.

B Estructuras tallo-burbuja (tipo IRE) en RNAm's que codifican proteínas que participan en el metabolismo del hierro así como en la virulencia de *G. duodenalis*

1. Estructuras tallo-burbuja en el RNAm de genes que codifican proteínas que participan en la virulencia del parásito

En protozoarios evolutivamente cercanos como *T. vaginalis* y *E. histolytica* nuestro grupo ha reportado evidencia del mecanismo IRE/IRP (Hernández-Peña y col, 2015 *en revisión*; León-Sicairos y col, 2015 *en revisión*; Calla-Choquey col, 2014; Torres-Romero y Arroyo, 2009; Solano-González y col, 2007) por lo tanto para buscar los elementos que participan en este mecanismo de regulación partimos de un análisis bioinformático sobre el genoma de Giardia. Primeramente se determinó la presencia de elementos en cis (estructuras tallo-burbuja tipo IRE) de algunos RNAm de ortólogos que participan en la virulencia. Para ello, se obtuvieron las secuencias y se delimitaron las regiones no traducidas de ambos extremos (5' y 3'-UTR) de acuerdo a la presencia de los elementos reportados para cada región (Tolba y col, 2013).

Para este grupo, analizamos veintitrés RNAm (Cuadro 4), en los cuales se encontraron veintisiete estructuras tallo-burbuja debido a que en cuatro RNAm se encontraron estructuras en ambos extremos. De las veintisiete estructuras tallo-burbuja, once presentaron el motivo GUU/UUG el cual es específico para estructuras tipo IRE de protozoarios (Torres-Romero y Arroyo, 2009); ocho estructuras presentaron el motivo en la burbuja las cuales están anotadas como: "Cathepsin B precursor" (GL50803_16160), "Cathepsin L precursor" (GL50803_3169), "Cathepsin L precursor" (GL50803_16380), "Cathepsin L-like protease" (GL50803_3099), "Cathepsin L-like protease" (GL50803_137680), "Cysteine protease" (GL50803_113656), "Dipeptidyl-peptidase I precursor" (GL50803_28651), "Hypothetical protein" (GL50803_6369), y tres estructuras presentaron este motivo en el tallo las cuales están anotadas como: "Cathepsin B precursor" (GL50803_14019), "Cathepsin B precursor" (GL50803_16160) y "Dipeptidyl-peptidase I precursor" (GL50803_14566). La estructura tallo-burbuja de la secuencia anotada como "Cathepsin L precursor" (GL50803_9548) presentó la secuencia GCCACA en la burbuja, también la estructura anotada en el genoma como proteína hipotética (GL50803_113303) presentó la secuencia CUCACA en el tallo; ambas similares a la secuencia GGCACA encontrada en la cisteín proteinasa 4 (*tvcp4*) en la región 5' traducida en *T. vaginalis* (Solano-González y col, 2007), la estructura tallo-burbuja de la "Cathepsin L precursor" (GL50803_3169) presentó la secuencia 5'-AGUGAA-3' similar a la secuencia consenso 5'-CAGUGN-3' de humano pero en el sentido contrario, (Hentze y col, 1988), 10

estructuras tallo-burbuja presentaron el motivo CUUU/C el cual pudiera ser específico para Giardia una variante del motivo GUU/UUG el cual es específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo, 2009); seis estructuras presentaron el motivo en la burbuja las cuales están anotadas como: “Cathepsin B precursor” (GL50803_14019), “Cathepsin B precursor” (GL50803_16779), “Cathepsin B precursor” (GL50803_10217), “Cathepsin B precursor” (GL50803_16468), “Cathepsin B precursor” (GL50803_17516), “Cathepsin B-like cysteine” (GL50803_114165) y cuatro estructuras presentaron este motivo en el tallo, anotadas como: “Cathepsin L precursor” (GL50803_17607), “Cathepsin L precursor” (GL50803_16779), “Cathepsin L precursor” (GL50803_14983) y “Encystation specific protease” (GL50803_22553), ver Figura 5 y 6.

Cuadro 4. Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas de virulencia en *G. duodenalis*

Nombre común	Gene ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_14019	5' CR	cttttcctc caat tt[t]aaaATGaagctctttctcctc gccg ctgcagctttctctgcgcccgc cctgacggtc
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_14019	3' UTR	ggcttcttcgatgagTAA gcaatgaatactct <u>TGTAAA</u> cggaa ga[t]ctcagac
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_16160	5' UTR	gtattctagcaggtattta[t]agtttctcaccagtt ATGgat gcattgattgagccaaac atgcttttag
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_16160	3' UTR	gagTGAatccg ctttt gtcctcaactgtgtctggtggtccggt taa <u>GCTAAA</u> aagttaca[g]cg
<i>Cathepsin L precursor</i>	GL50803_9548	5' CR	tttgacacaacttt[t]aaagatagcgtgctATGgt gtcgatgc ttt gtgccacaaca atct tttggc>taggagtttc
<i>Cathepsin L precursor</i>	GL50803_3169	5' CR	tacaaactg caat c[t]aagacatctc ac ATG ttagc gctatt gctctttattgt ctgctgtggt
<i>Cathepsin L precursor</i>	GL50803_3169	3' UTR	tgctgcaggaagTAGgtgcggatgacttcta actatt <u>AGTGAA</u> tagtagt g[a]atagtaat
<i>Cathepsin L precursor</i>	GL50803_16380	3' CR/UTR	gtt gagTAA attgcccgggttg <u>GTGAA</u> tg gctc tggccttgg [t]caa
<i>Cathepsin L precursor</i>	GL50803_17607	3' UTR	ttgggTGActatata tggt tacttaaggagc gctatagcccc <u>C</u> <u>TCAA</u> actg ccaac [c]tt
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_113656	5' UTR/CR	ccgcggcccaa[a]a aggaccgg ATG ttgctgcttacctt gt cttt cctctgcgcggcgt

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas de virulencia en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3' UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

Continuación

Nombre común	Gene ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_16779	5' CR	aagcttacggaatt [t] taaATGaagctctttctcctc gccgct gcagctttctctgcgcccgc cctgacgggtctccga
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_16779	3' CR/UTR	agtaat aggtgggttctttgagaacTAActggatccatttt at AGTAAA tca [t] ggc
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_10217	3' UTR	gac TAGcgctgtcttcatacatagctaccattgccctaattggg tagaAGTAAA cgttttt [c] tggtc
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_15564	5' CR	ctagcatggctttatatta [t] ttgctcatcttatggtcagacgg caccAT Gcgcggggaatcctctgggtggcgc gtcgggtctagag atagacgt
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_16468	3' UTR	gcagtgaagTAAacg TCCAAA aggctttttggga [a] aaagtcat
<i>Cathepsin B precursor</i>	GL50803_17516	5' CR	ggaacagagaaatcct [t] taaaAT Gaggcttctgatccttctg attgcatc cctagccgagccccttttg
<i>Cathepsin B-like cysteine proteinase 3</i>	GL50803_114165	5' CR	cggccacggaaa [t] aaaAT Gatggtaacttctaccatt cttgc attgctatatggcac
<i>Cathepsin L-like protease</i>	GL50803_3099	5' CR	gtaaataacgaaaataatat [t] taaaagaaccata ATGtatac tttggtgggtgttc actgtcgaatcctctgcataatcctatt
<i>Cathepsin L-like protease</i>	GL50803_137680	5' UTR/CR	aaacctgaaggacttt [t] ata aaagtagtgATGtggttgtcct at tttctgggtgatctttttgcttga
<i>Cathepsin L precursor</i>	GL50803_14983	3' CR/UTR	cgttaa caaaagaaaagcTAAAGTAAA ttctgtgga [c] gctg

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas de virulencia en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3' UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

Continuación

Nombre común	Gene ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Cysteine protease</i>	GL50803_113656	3' CR/UTR	cacaagggcggtgTAGGcgctagcg CCCGAA ctcctcgtc [g] ta
<i>Dipeptidyl-peptidase I precursor</i>	GL50803_14566	5' CR	agccggccagaaaaa [a] atcATGcttttca tcttggcgctcct gggactc ttattatca
<i>Dipeptidyl-peptidase I precursor</i>	GL50803_28651	3' UTR	atgcattaTA Gatgcactgagtggtt taactgagtg cttatc gcC <u>ATAAA</u> gactcac [c] tat
<i>Encystation-specific protease</i>	GL50803_22553	3' CR/UTR	ctaagca tgctttc aaatcca TGAAGTA AAatgattccaca [a] g tacaattaca
<i>Sentrin specific protease</i>	GL50803_16438	3' UTR	ct gcTAGGc ctatgggtctgggtgtcctaagttgtgt TTGAAA acc c [t] ac
<i>Hypothetical protein</i>	GL50803_6369	5' UTR/CR	cctctagagatga [t] gaaacgagagatgagac ctcatATGgact actggattgctc gtaactc tgggggag aagagtggggagaaaac
<i>Hypothetical protein</i>	GL50803_113303	3' UTR	atgacactcatTG AcacactctGATGAA ctagatggtaaatac tcc [t] aagcaaa

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas de virulencia en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3' UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

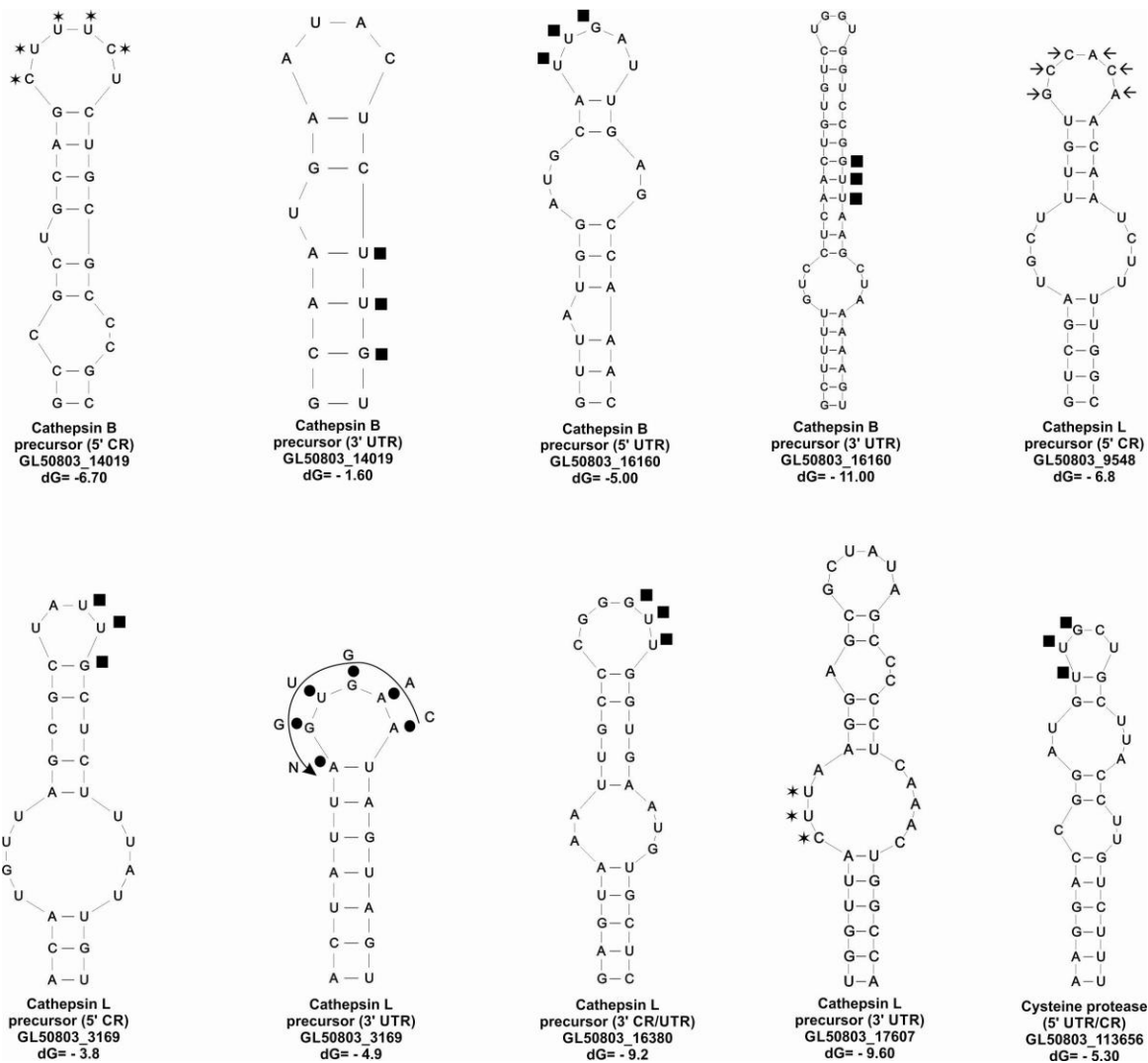


Fig 5. Estructuras tallo-burbuja en RNAm's que codifican posibles proteínas de virulencia. Con estrellas se indica el motivo CUUU/C específico para *Giardia*. Con cuadros se indica el motivo GUU/UUG específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo; 2009). Con flechas la secuencia GCCACA similar a la secuencia GGCACA encontrada en la *tvcp4* en *T. vaginalis* (Solano-Gonzalez y col, 2007). Con círculos la secuencia 5'-AGUGAA3' similar a la secuencia consenso 5'-CAGUGN-3' de humano pero en sentido inverso (Hentze y col, 1988).

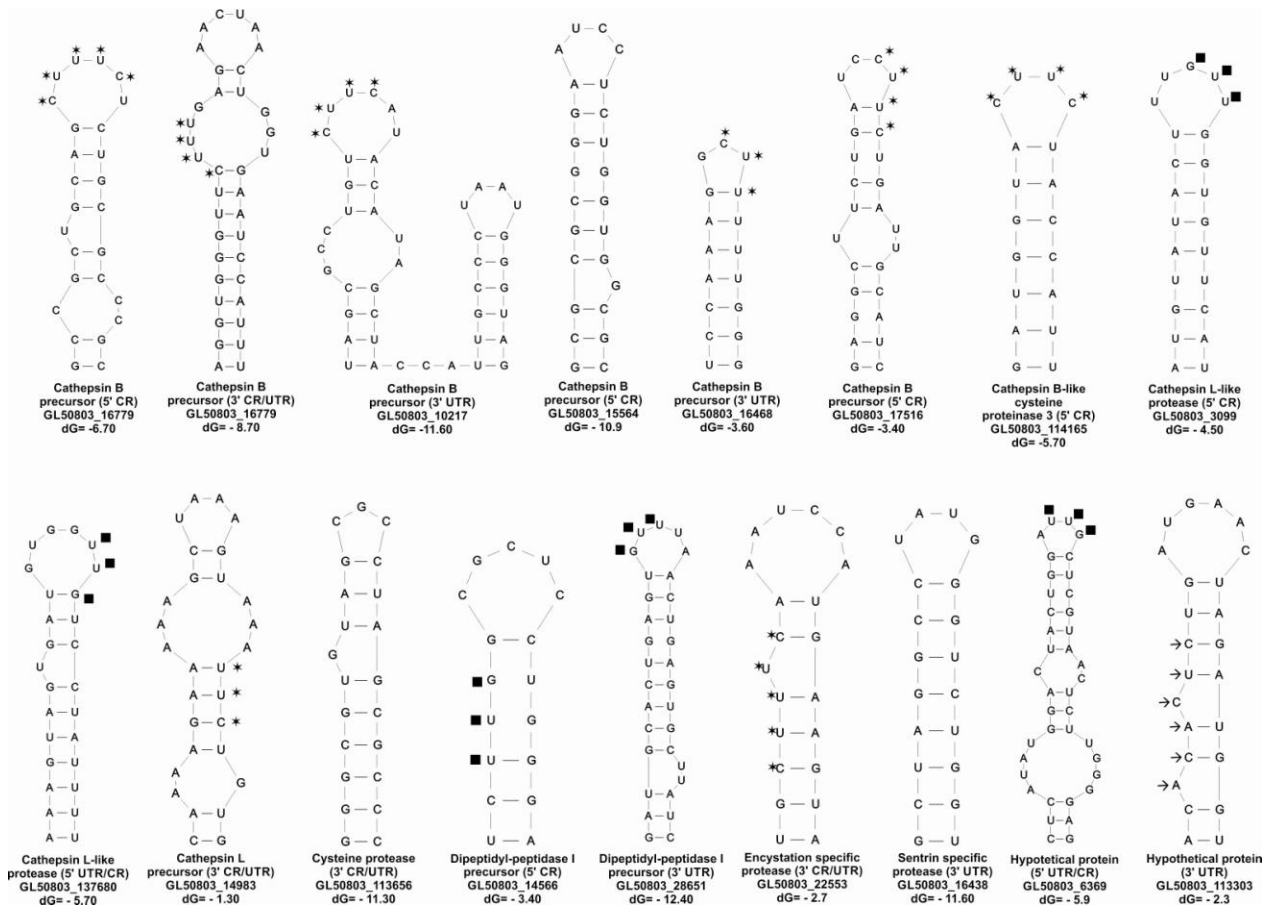


Fig 6. Estructuras tallo-burbuja en RNAm's que codifican posibles proteínas de virulencia. Con estrellas se indica el motivo CUUU/C específico para *Giardia*. Con cuadros se indica el motivo GUU/UUG específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo; 2009). Con flechas la secuencia GCCACA similar a la secuencia GGCACA encontrada en la *tcp4* en *T. vaginalis* (Solano-González y col, 2007). Con círculos la secuencia 5'-AGUGAA-3' similar a la secuencia consenso 5'-CAGUGN-3' de humano pero en sentido inverso (Hentze y col, 1988).

2. Estructuras tallo-burbuja en el RNAm de genes que codifican proteínas ribosomales del parásito

De igual manera se analizaron cincuenta RNAm que codifican para proteínas ribosomales (Cuadro 5), en los cuales se encontraron sesenta y seis estructuras tallo-burbuja ya que en dieciséis RNAm se encontraron estructuras en ambos extremos. De ellas, veintitrés presentaron el motivo GUU/UUG propuesto para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo, 2009), cuatro estructuras presentaron el motivo en la burbuja; anotadas como “Ribosomal protein L7a” (GL50803_17244), “Ribosomal protein L13” (GL50803_14622), “Ribosomal protein L13a” (GL50803_11247), “Ribosomal protein L37a” (GL50803_5517); diecinueve estructuras presentaron este motivo en el tallo; “Ribosomal protein L7Ae” (GL50803_2825), “Ribosomal protein L35” (GL50803_6133), “Ribosomal protein L35” (GL50803_6133), “Ribosomal protein L7Ae” (GL50803_11287), “Ribosomal protein L9” (GL50803_17056), “Ribosomal protein L10” (GL50803_10428), “Ribosomal protein L12” (GL50803_14938), “Ribosomal protein L15” (GL50803_8001), “Ribosomal protein L15” (GL50803_8001), “Ribosomal protein L24” (GL50803_14869), “Ribosomal protein L31B” (GL50803_16368), “Ribosomal protein L34” (GL50803_36069), “Ribosomal protein L37” (GL50803_14171), “Ribosomal protein SA” (GL50803_7766), “Ribosomal protein S6” (GL50803_14620), “Ribosomal protein S8” (GL50803_5845), “Ribosomal protein S15” (GL50803_15260), “Ribosomal protein S15A” (GL50803_15228), “Ribosomal protein P1B” (GL50803_17337). La estructura de la “Ribosomal protein L37a” (GL50803_5517) presentó la secuencia CGCACA en la burbuja, la “Ribosomal protein S21” (GL50803_7082) presentó la secuencia GCCACA en la burbuja, la “Ribosomal protein L21” (GL50803_15520) presentó la secuencia CGCACA en el tallo, la “Ribosomal protein L37” (GL50803_14171) presentó la secuencia GGCACA en el tallo; las cuatro secuencias similares a la secuencia GGCACA encontrada en la cisteín proteínasa 4 en la región 5' traducida en *T. vaginalis* (Solano-González y col, 2007), cinco estructuras presentaron una secuencia similar a la consenso CAGUGN de humano en la burbuja (Hentze y col, 1988) anotadas como: “Ribosomal protein S20” (GL50803_6022), “Ribosomal protein S24” (GL50803_10367), “Ribosomal protein S29a” (GL50803_39483), “Ribosomal protein L26” (GL50803_15046), y dos en el tallo anotadas como: “Ribosomal protein S13” (GL50803_16652) y “Ribosomal protein P1B” (GL50803_17337); ocho estructuras tallo-burbuja presentaron el motivo CUUU/C el cual pudiera ser específico para Giardia una variante del motivo GUU/UUG, específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo, 2009); de estas ocho estructuras seis presentaron el motivo en la burbuja, anotadas como: (“Ribosomal protein L3” (GL50803_16525), “Ribosomal protein L7a” (GL50803_17244), “Ribosomal protein L10a” (GL50803_1345), “Ribosomal protein

L17" (GL50803_98056), "Ribosomal protein L36-1" (GL50803_16114), "Ribosomal protein S16" (GL50803_4652) y dos estructuras presentaron este motivo en el tallo: anotadas como "Ribosomal protein S11" (GL50803_14827) y "Ribosomal protein S16" (GL50803_4652). Además cuatro estructuras presentaron el motivo AUU el cual pudiera ser específico para Giardia o una variante del motivo GUU/UUG, específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo, 2009); la estructura tallo burbuja encontrada en el RNAm de la "Ribosomal protein S9" (GL50803_4547) presentó el motivo AUU en la burbuja, mientras que los RNAm anotados como "Ribosomal protein L31B" (GL50803_16368), "Ribosomal protein S6" (GL50803_14620) y "Ribosomal protein S12" (GL50803_33862) presentaron el motivo AUU en el tallo, ver Figuras 7, 8, 9, y 10.

Cuadro 5. Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas ribosomales en *G. duodenalis*

Nombre común	Gene ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Ribosomal protein L3</i>	GL50803_16525	5' UTR/CR	ttccgggtctgaaaag[a]caaggccc gcgATGtcccaccgcaag ttctcgtgctgccgcaagggc aacctcggctacctccccg
<i>Ribosomal protein L7a</i>	GL50803_17244	5' UTR/CR	tgggttcaa[t]aaaacaggcctcgac ATGtccaaggtttctggc agcgacattaagagggcc ctcgccgtacccgagaaca
<i>Ribosomal protein L7a</i>	GL50803_17244	3' CR/UTR	gcgagga tgaggcccagcagaTGTAATgcctta cattt[c]ttt
<i>Ribosomal protein L7Ae</i>	GL50803_2825	5' UTR/CR	tggaaaatgtaataaat[t]aaaactcaattgaaa caaggATGcc agatgcacgcgctgttcccttg gcctcagaggcccagtccaa
<i>Ribosomal protein L7Ae</i>	GL50803_2825	3' CR/UTR	ttcctta cggagctaggacacTGA tccgg AGTAAA tggg[g]gtg
<i>Ribosomal protein L13</i>	GL50803_14622	5' UTR/CR	tggaaagctcgtg caat tgca[c]t tataATGgcaagttatgcttc ttttata ttgagattaattcatttttaatttgaatttc
<i>Ribosomal protein L13a</i>	GL50803_11247	5' UTR/CR	agaacttta[a]attggatttagcgcaaactctgtttgctcacggc gag ccATGt cgcgaaatcgttatcgactgcaaggggacatcctg
<i>Ribosomal protein L35</i>	GL50803_6133	5' CR	tctcgcacaccgaagag[t]caacttgcc ATGgc atcctg tttgc ccctaccagatagatg ttattcaatgtattttaaaatgaaatc
<i>Ribosomal protein L35</i>	GL50803_6133	3' CR/UTR	tgct gtaaagg tc TGAg caccctgggtgtt AGTAAA actc[t]ct
<i>Ribosomal protein L37a</i>	GL50803_5517	3' CR/UTR	atcgcgcgcct ccg ctg ggcc g tgaagacgcacagTAAAGTAAA cagagt ggaactgg[c]actg

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas ribosomales en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3' UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

Continuación

Nombre común	Gene ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Ribosomal protein L4</i>	GL50803_17547	3' CR/UTR	acgggtca tgcccaAGTAAAtcgctggcgcaaaa [c]gtttgc
<i>Ribosomal protein L7Ae</i>	GL50803_11287	3' UTR	ctggtaTGA cgggagtgcgtttacagtgcaagcatcactAGTAAAtgctcaccg gtac[a]tgctacacactactagtatt
<i>Ribosomal protein L9</i>	GL50803_17056	5' CR	taaatccgcttttcgatgctctttt[t]ttagaggtcgcgaaagcaATG ccctctgttccctccatgacgatcaagg tcccgcacgg
<i>Ribosomal protein L10</i>	GL50803_10428	3' CR/UTR	ctcaa cttgaagctcTGAtcgggtcccaag cacaAGTAAAtaatt[g]cca
<i>Ribosomal protein L10a</i>	GL50803_1345	3' UTR	catcttcTAA gatcttcTGAGA aggttccc[g]ggttttg
<i>Ribosomal protein L12</i>	GL50803_14938	5' CR	tttgatat[t]atgtcagagtggtagttttccaggcgacaATGcccc cagagctgatcctaacgcagagatagttctgt attt
<i>Ribosomal protein L12</i>	GL50803_14938	3' CR/UTR	gagcaagagac cagAGTAAAc aagg tgccctg cggtg[t]cacg
<i>Ribosomal protein L15</i>	GL50803_8001	5' CR	acttcataggatcattt[t]ttaccggcctgaatt cgATGggtgcctacaag tacg ttcaggagctctggcg caagaagcaat
<i>Ribosomal protein L15</i>	GL50803_8001	3' CR/UTR	ccctc cgccgctacagaTAGccttgctgctgcg AGTAAAcattc[c]cgt
<i>Ribosomal protein L17</i>	GL50803_98056	3' UTR	tccagTGAgctctgctc gggAGTAAAtg cgctgcttcttcccaac[t]tctaa
<i>Ribosomal protein L19</i>	GL50803_16431	5' UTR/CR	atTTTTctcggaact[t]tttcgacctcccgacATG gctaactctgaggctgcagaagcg cctggcgagacgctcctcaaat
<i>Ribosomal protein L21</i>	GL50803_15520	5' CR	tattttaaattcattt[t]caatgctgcccgaaaagcgagga
<i>Ribosomal protein L21</i>	GL50803_15520	3' UTR	cgactcgATG acgcacagccaggggtacaggtgt aagacgcgagttttcTAG gctccgacgaAGTAAAtggcctg cg[g]ggc

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas ribosomales en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

Continuación

Nombre común	Gene ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Ribosomal protein L23</i>	GL50803_10091	5' UTR/CR	aattacaactttaattttcgctttt [t] actcgtttccta atg acggatcgaggag ATGgcgtcgaagcgtggcaggtcc ggagg
<i>Ribosomal protein L23</i>	GL50803_10091	3' CR/UTR	acg acggctgagtgcgctccacTAGgcAGTAAA cgaa [t] tcg
<i>Ribosomal protein L23A</i>	GL50803_7870	5' CR	tttcgccgtctaa [t] atctcgtgccggcgagac ATGtccga gaaggcgcaggg cactgaaggccaaaaggcgatct
<i>Ribosomal protein L24</i>	GL50803_14869	5' UTR/CR	agtgtttctctaccatttaataactttaa [t] aattcagga acaATGcctcgcatagagcattgctc attctgctccaagccg
<i>Ribosomal protein L26</i>	GL50803_15046	5' UTR/CR	ggccattttt [t] gaatcaccggggaagcct ggaATGaag ctcaactccgcgctcaccgcgtcccgtcgaagtgccg caag
<i>Ribosomal protein L27a</i>	GL50803_16310	5' UTR/CR	accaaaaagtatattaataatttaatttcat tttccccacgg ct [a] aaa agggcctcgcagATGccgacc agaatcaggaagt
<i>Ribosomal protein L31B</i>	GL50803_16368	5' UTR/CR	gaatctgaattgtccctgcaaa [a] aacgggtcctcc gaagc gtgATGggtattgtata tgagcatacga tccgcctc aacaag
<i>Ribosomal protein L31B</i>	GL50803_16368	3' CR/UTR	cgaa gacggcagcgAGTAA Actt gtgcacgctc gcat [t] ta
<i>Ribosomal protein L34</i>	GL50803_36069	5' UTR/CR	ttttaaattac [t] aaagagctgcccgc cgagATGgccgact gtcgcgtcacttg ccgcttccactccacatacaggactcgt
<i>Ribosomal protein L34</i>	GL50803_36069	3' CR/UTR	ccggcaagggg catgcgaAGTAA tcga tcagcatt [t] acg
<i>Ribosomal protein L35a</i>	GL50803_5947	3' CR/UTR	aaccccaa cgcgacggtaacctacgAGTAA atag tcagggcg gct [t] gtg
<i>Ribosomal protein L36-1</i>	GL50803_16114	5' CR	tttattttc caat ccatttttaattcattt caatt cctgatt t [a] gaaggagcgggtgtggt ATGccaggcaaagtattcaacc tgaagaagggcggcg cagtagttcgcattgtccgcaag

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas ribosomales en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

Continuación

Nombre común	Gene ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Ribosomal protein L37</i>	GL50803_14171	5' CR	cctccatgccggacatagcatttttaaattggaattagtcgct <i>gt[t]aaaaacgggaactcg</i> ATGtccaagggcacagcgtcgt tcggtaagcgccacacgcgc attcacggcagctgccgc
<i>Ribosomal protein L37</i>	GL50803_14171	3' CR/UTR	gaagt accttgccaAGTAA ttt gcacgaggt cgg[t]ccga
<i>Ribosomal protein L37a</i>	GL50803_5517	5' CR	tctggaaatttaataaaaat[t]aaattgaattcttgcaagcg aaaagcggctcaggcgagctATGg ccaagaggactaaaaagg ttggtctcaccggga agtacggcactcgctatgggagg
<i>Ribosomal protein L44</i>	GL50803_9810	5' UTR/CR	aaaaataaatgcaaattgaattagctttgcatgctact[t] aacagcagcggccgaa ggacATGgtgacatatccggcagagc gcaggaccttctgcaagcgcgagggaaagcacaccggt gtacTAAggcggctcttgтта agctgaaagTGTAACgcttt gctc [g]g
<i>Ribosomal protein S2</i>	GL50803_8118	5' CR	taattttgatttgactttgtagcccaaac[t]aacgtccat ggcgtag gcATGcaggctgaaagtgctcccaggc cagaacgac
<i>Ribosomal protein S4</i>	GL50803_11359	5' CR	tcacgaatgtattttaaatccaaattaggatggatttctggt t[t]agcagcgaATG gcccggtggagtccgcaagc accttaag
<i>Ribosomal protein S5</i>	GL50803_12981	3' UTR	accgcTAAacgccc aggAGTAA accgcccctc[t]gagagat
<i>Ribosomal protein S6</i>	GL50803_14620	5' UTR/CR	tggtgagaaagcatttttaatttcatttctagtttca[t]aaa atggcccggggtgaATGccaaagggtcatt ctgcaagggtca
<i>Ribosomal protein S6</i>	GL50803_14620	3' CR/UTR	ctaag gaggacggttgAGTAA cagacgtctttctac[g]cgg
<i>Ribosomal protein S8</i>	GL50803_5845	3' CR/UTR	accagaag gaagttggcacctaAGTAA catccagt[g]cttc

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas ribosomales en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

Continuación

Nombre común	Gene ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Ribosomal protein S9</i>	GL50803_4547	5' UTR/CR	tattttaaatt caat ttggctttcgccaat[t]ctcccctgacgatt ttccATGccccgcattagccgccataggaact ctgctcaaa
<i>Ribosomal protein S10B</i>	GL50803_10919	3' CR/UTR	agccccgatgaag caaAGTAAA atctgagccata[g]cttcc
<i>Ribosomal protein S11</i>	GL50803_14827	5' UTR/CR	cttgagagagccgagactctgcgcaaggctgc[t]ta cgagATGgctgagaaccagcagcagc gagcgtatcacaagcaatccc
<i>Ribosomal protein S11</i>	GL50803_14827	3' CR/UTR	gagcctgtcag cgaggccgccaagaagcgttctcgc ccctt TAGgcagcactAGTAAA taag[g]gt
<i>Ribosomal protein S12</i>	GL50803_33862	3' CR	gtcgacagcttcc ttactaagctggacgagcAGTAA Acgaca[t]acttagt
<i>Ribosomal protein S13</i>	GL50803_16652	5' UTR/CR	tgcatag caat tt[t]agcgggcacgtgacaaag ccATGggccgcatgcactcgaagggt aagggtata tcccgc tctgccata
<i>Ribosomal protein S13</i>	GL50803_16652	3' CR/UTR	tcc ttgcgacgtacgcgTGAGTAAAcaccgc ctac[g]gggc
<i>Ribosomal protein S14</i>	GL50803_7878	5' CR	gattttgaattgactttagaaggacaaa[t]ttgaggtgggc
<i>Ribosomal protein S15</i>	GL50803_15260	3' CR/UTR	tgaATG tctcgcaaagtaacctacgcg ccggagaa tcttccatccc g ctg cg tTAGtcccgc ccacc AGTAAA acattcc[t]cg
<i>Ribosomal protein S15A</i>	GL50803_15228	5' UTR/CR	cgcacatcgcgtgccggcgtgctgggaagcaga[t]ccag tagg c ATGgttcgcatcaacgttctccgtgacgc actcaagtcc
<i>Ribosomal protein S16</i>	GL50803_4652	5' CR	tttaattccacttccggt ccca [t]aaaaagcggctccccgA
<i>Ribosomal protein S16</i>	GL50803_4652	3' CR/UTR	TGgcgaagggcaa cagaagagacttactg gaaaggaacgacagtc gtaccgtTAAGcgggcttctcgtcctaAGTAAAcata ctgc
			at[c]ca

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas ribosomales en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

Continuación

Nombre común	Gene ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Ribosomal protein S20</i>	GL50803_6022	5' CR	acaaaaatttaacagaattaaaatgaattct[t]taagtacg aaaacgcggccaccgaggctATGgcagagag gcgtgtcgactg gaggcgt gaatcttgcagatcacaaggatggaaaggat
<i>Ribosomal protein S21</i>	GL50803_7082	5' CR	taaattgatttttgtcctacaa[a]ttggacccgaaacgact gag ccATGcaatcggatgacatcgg gatgaagaacagcagcg
<i>Ribosomal protein S21</i>	GL50803_7082	3' CR/UTR	aac gccttTAGgttgccgcatacaccggcca <u>AGTAA</u> cgctc t[g]ata
<i>Ribosomal protein S23</i>	GL50803_14699	3' UTR	gcgtTA Agcacgggcg <u>TGTAA</u> ctgccactggct gt [g] cat
<i>Ribosomal protein S24</i>	GL50803_10367	5' CR	ttttaaactctgaatttcgttgtc[a]ttaaagcggggctagc gATGc ccgagatcacagttaagg tgaggaaggtcctcaataa
<i>Ribosomal protein S29a</i>	GL50803_39483	5' UTR/CR	cttgcgaggaaggcgcgccacggcacgccccg [g] gccc cag gaATGcgcagtgactggacaccggcgtagcggctg accgca
<i>Ribosomal protein P1B</i>	GL50803_17337	5' CR	cagatatccaagacaaa[t]aaggagcgtcaccgagctcgt tcgtATGcagag gtcaagaaaccgcgtgtgttttggc cgctat
<i>Ribosomal protein P1B</i>	GL50803_17337	3' UTR	cTGAgtctgcatgcacaaggacgaggc tttac <u>TGTAA</u> aggag tgaac [a]c

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas ribosomales en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas. En la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

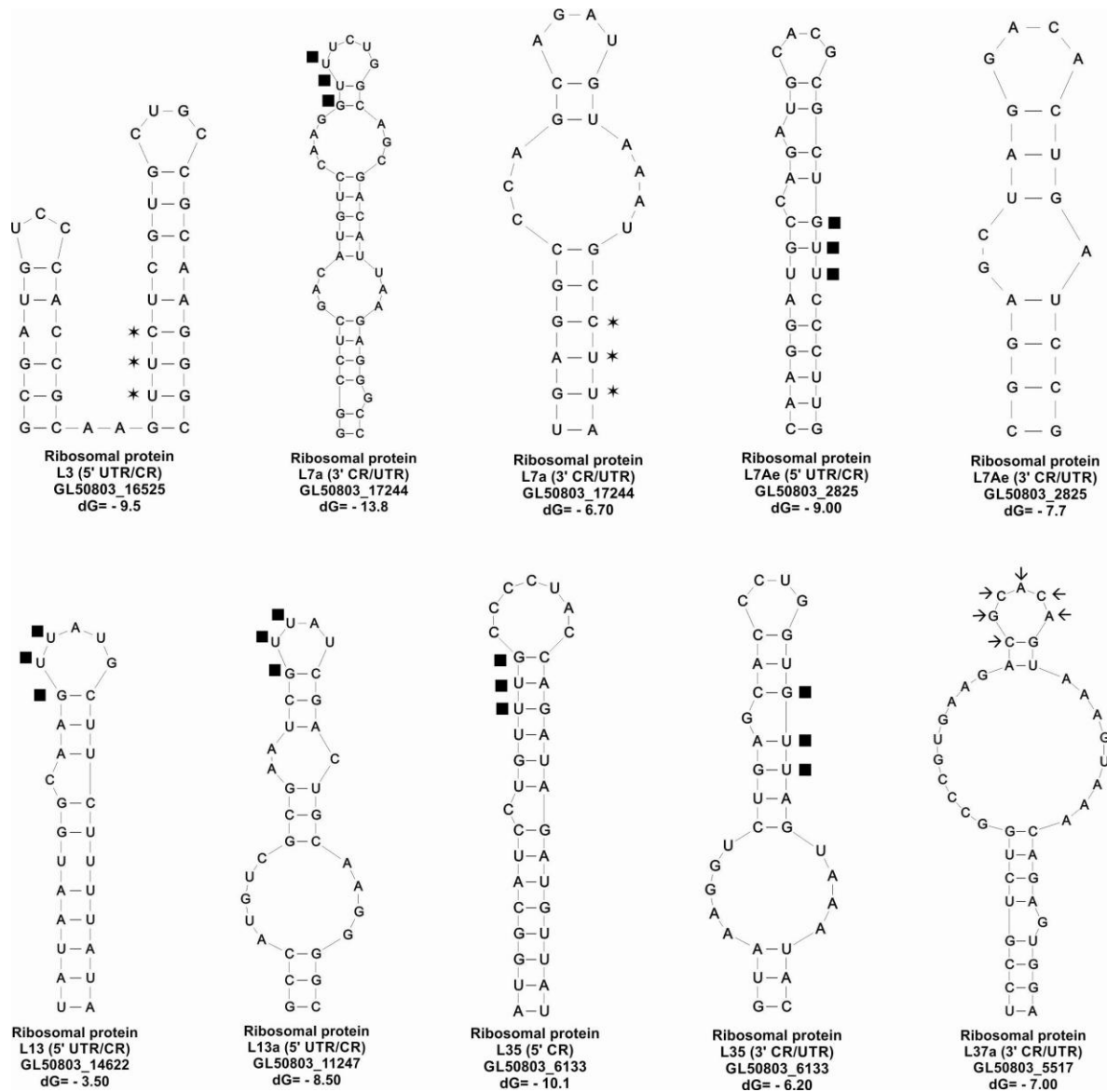


Fig 7. Estructuras tallo-burbuja en RNAm's que codifican posibles proteínas ribosomales. Con estrellas se indica el motivo CUUU/C específico para *Giardia*. Con cuadros se indica el motivo GUU/UUG específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo; 2009). Con flechas la secuencia GCCACA similar a la secuencia GGCACA encontrada en la *tvcp4* en *T. vaginalis* (Solano-González y col, 2007).

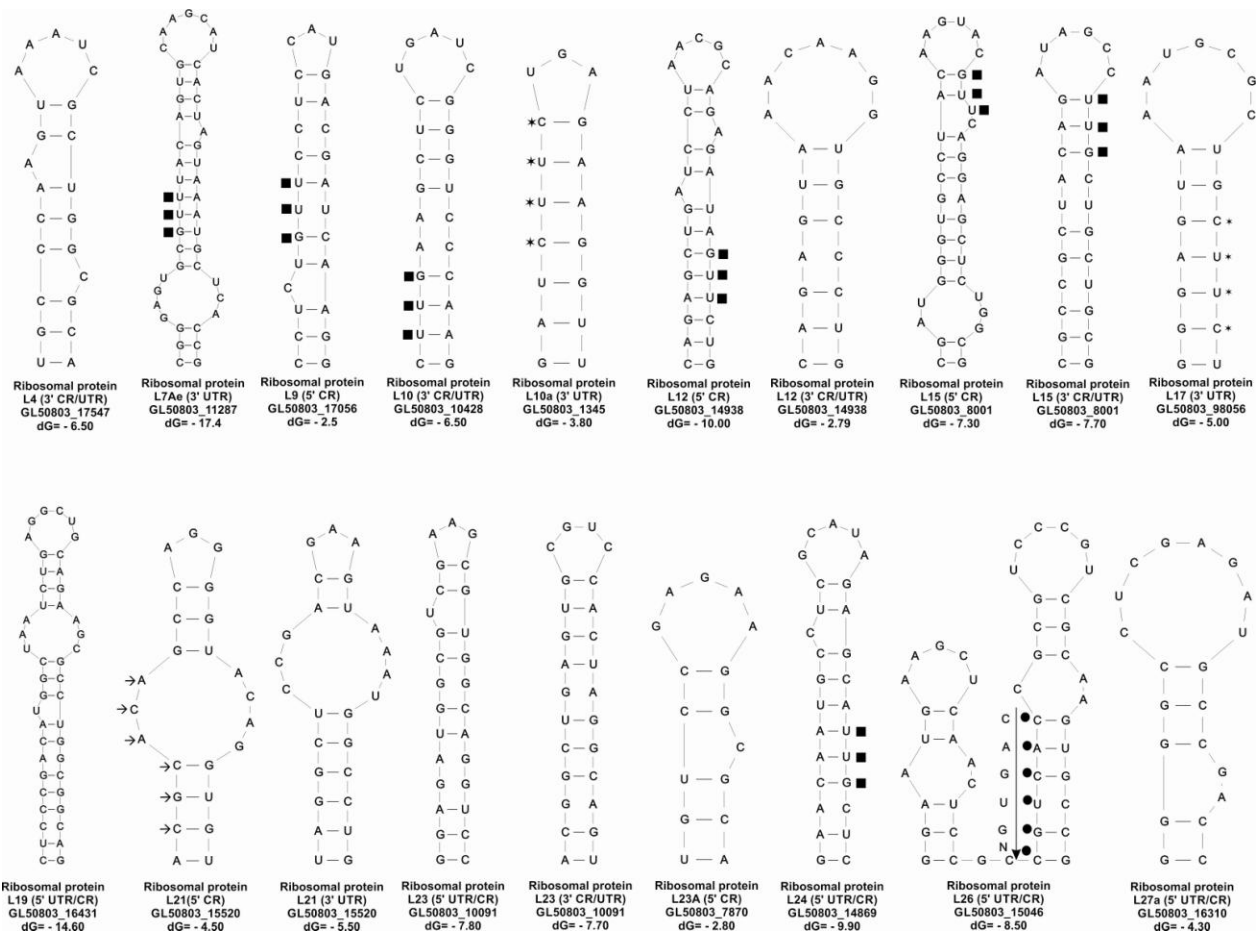


Fig 8. Estructuras tallo-burbuja en RNAm's que codifican posibles proteínas ribosomales. Con estrellas se indica el motivo CUUU/C específico para *Giardia*. Con cuadros se indica el motivo GUU/UUG específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo; 2009). Con flechas la secuencia GCCACA similar a la secuencia GGCACA encontrada en la *tvcp4* en *T. vaginalis* (Solano-González y col, 2007). Con círculos la secuencia similar a la secuencia consenso 5'-CAGUGN-3' de humano (Hentze y col, 1988).

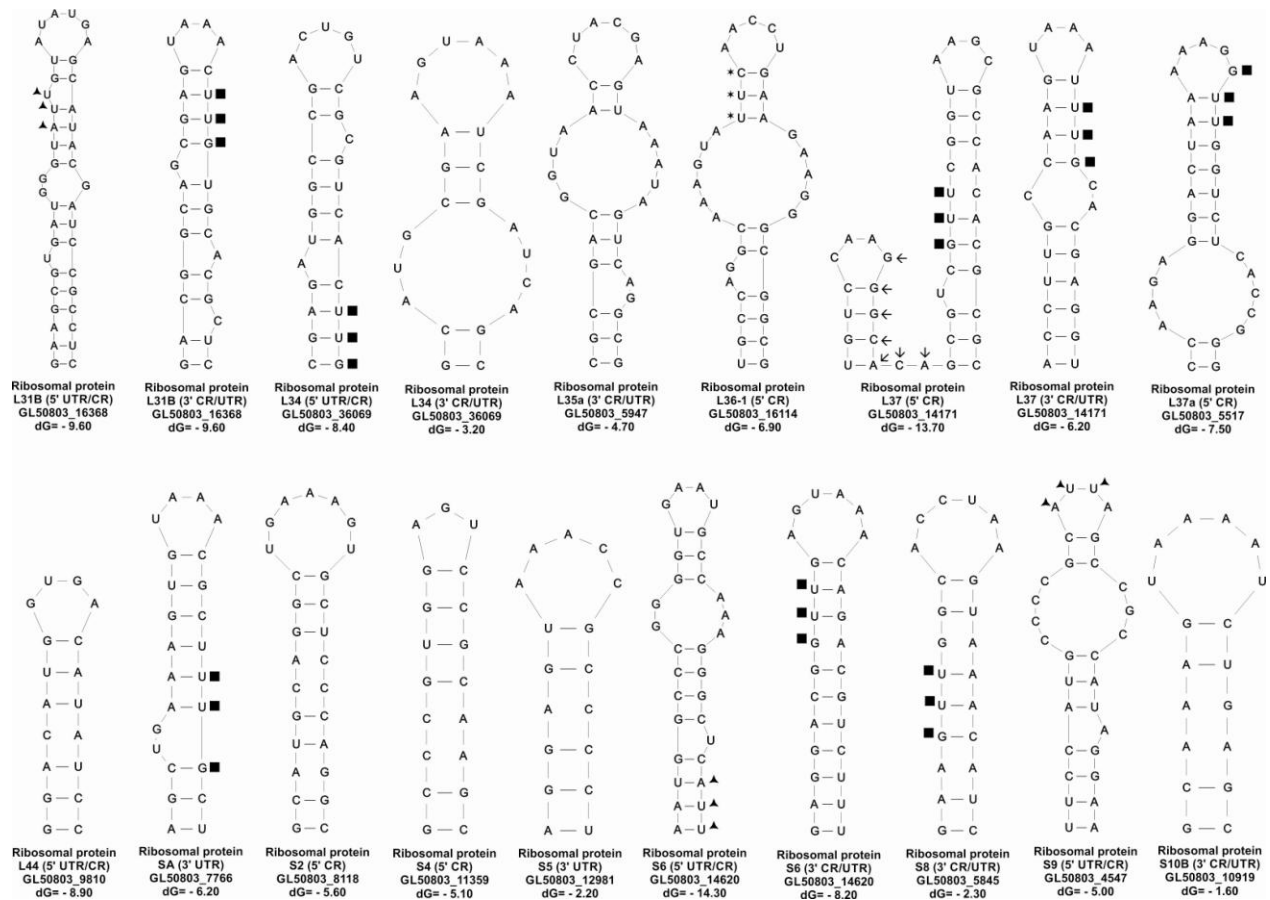


Fig 9. Estructuras tallo-burbuja en RNAm's que codifican posibles proteínas ribosomales. Con estrellas se indica el motivo CUUU/C específico para Giardia. Con triángulos se indica el motivo AUU (posible variante del motivo GUU). Con cuadros se indica el motivo GUU/UUG específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo; 2009). Con flechas la secuencia GCCACA similar a la secuencia GGCACA encontrada en la *tvcp4* en *T. vaginalis* (Solano-González y col, 2007). Con círculos la secuencia consenso 5'-CAGUGN-3' de humano (Hentze y col, 1988).

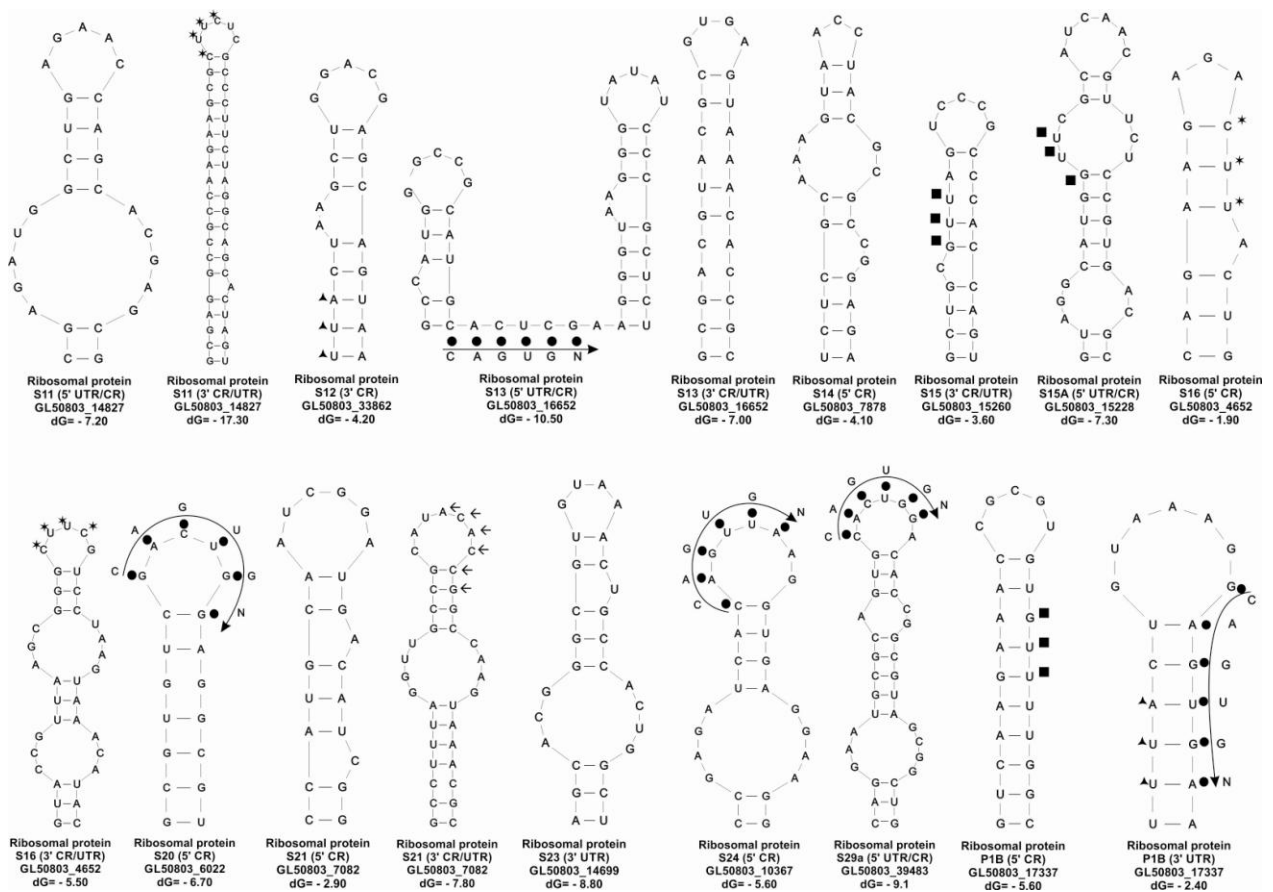


Fig 10. Estructuras tallo-burbuja en RNAm's que codifican posibles proteínas ribosomales. Con estrellas se indica el motivo CUUU/C específico para Giardia. Con triángulos se indica el motivo AUU (posible variante del motivo GUU). Con cuadros se indica el motivo GUU/UUG específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo; 2009). Con flechas la secuencia GCCACA similar a la secuencia GGCACA encontrada en la *tvcp4* en *T. vaginalis* (Solano-González y col, 2007). Con círculos la secuencia similar a la secuencia consenso 5'-CAGUGN-3' de humano (Hentze y col, 1988).

3. Estructuras tallo-burbuja en el RNAm de genes que codifican proteínas del citoesqueleto del parásito

Como se mencionó anteriormente en *E. histolytica* se reportaron estructuras tallo-burbuja en RNAm que codifican para proteínas del citoesqueleto (Hernández-Peña y col, 2015 *en revisión*) que son reguladas por hierro (Park y col, 2001), esperando un comportamiento similar debido a la cercanía evolutiva de ambos parásitos se buscaron estructuras tallo-burbuja en este grupo de RNAm en Giardia. Se analizaron cinco RNAm que codifican para proteínas del citoesqueleto (Cuadro 6), de los cuales se encontraron cinco estructuras tallo-burbuja. La estructura anotada en el genoma como “Actin related protein” (GL50803_8726) presentó el motivo GUU/UUG en la burbuja el cual es específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo; 2009), “Actin related protein” (GL50803_40817) presentó la secuencia 5'-UGUGAA-3' en la burbuja similar a la secuencia consenso 5'-CAGUGN3' de humano, pero en sentido inverso (Hentze *et al*, 1988), “Actin related protein” (GL50803_16172) presentó el motivo CUUU/C en la burbuja el cual pudiera ser específico para Giardia o una variante del motivo GUU/UUG el cual es específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo, 2009). Además la estructura anotada como “Hypothetical protein” (GL50803_17591) presentó el motivo AUU en la burbuja el cual pudiera ser específico para Giardia o una variante del motivo GUU/UUG el cual es específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo), ver Figura 11.

Cuadro 6. Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas del citoesqueleto en *G. duodenalis*

Nombre Común	Gene ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Actin related protein</i>	GL50803_40817	3' CR/UTR	ttgcaaacc gtaagtgta <u>TGTGA</u> Acacctat caa [c] gcttttct
<i>Actin related protein</i>	GL50803_8726	3' CR/UTR	ttgccttt tgaggt <u>TTGAAA</u> aggcctcgtgt [c] tatggtatatact
<i>Actin related protein</i>	GL50803_16172	3' CR/UTR	a tgaaagtgataatg TGAcactct <u>TACAAA</u> agactcttaga [g] c
<i>Actin related protein</i>	GL50803_11039	3' CR/UTR	ggcaacaa agTAAgtacataag <u>AGTAAA</u> taactatcta [t] ctaa
<i>Hypothetical protein</i>	GL50803_17591	3' UTR	tggactggaacacaac TGA <u>TTAAA</u> aggattaga aata [a] ccgtgg

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas del citoesqueleto en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 3'UTR: Codón de paro: Mayúsculas. Señal poliA: Mayúsculas y subrayadas. Término de la transcripción: Corchetes. Secuencias IRE-like: Letras remarcadas.

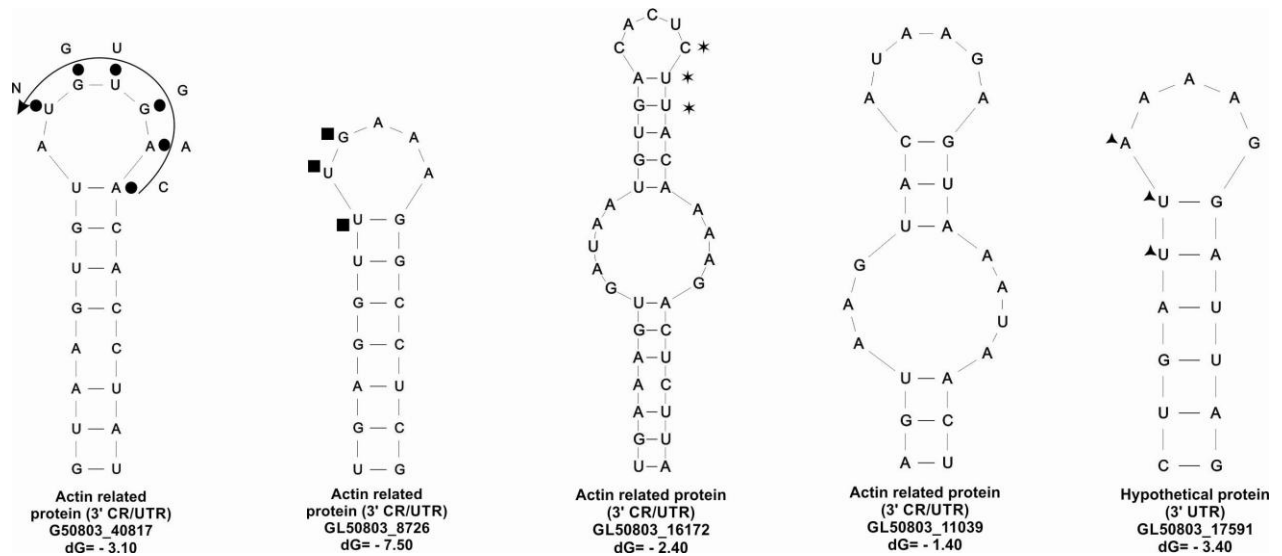


Fig 11. Estructuras tallo-burbuja en RNAm's que codifican posibles proteínas del citoesqueleto. Con estrellas se indica el motivo CUUU/C específico para Giardia. Con triángulos se indica el motivo AUU (posible variante del motivo GUU). Con cuadros se indica el motivo GUU/UUG específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo; 2009). Con círculos la secuencia similar a la secuencia consenso 5'-CAGUGN-3' de humano (Hentze y col, 1988).

4. Estructuras tallo-burbuja en el RNAm de genes que codifican proteínas del metabolismo del parásito

De acuerdo a un estudio en *Giardia* donde se investigó la expresión de la Glucosamina-6-fosfato isomerasa una enzima requerida para la biosíntesis de N-acetilgalactosamina (Knodler y col, 1999), se aislaron dos genes: Gln6PI-A con una región 5' UTR de 5 nt y Gln6PI-B con una región 5'UTR de 146 nt. En este trabajo se analizaron esas regiones y se delimitaron de acuerdo a lo reportado por Tolba et al, 2013. Una vez delimitadas estas regiones, se analizó la predicción de estructuras secundarias (Cuadro 7). La estructura tallo-burbuja encontrada en la secuencia anotada como "Glucosamine 6 phosphate deaminase" (GL50803_10829) presentó el motivo GUU/UUG en la burbuja el cual es específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo; 2009) y la estructura anotada como "Glucosamine 6 phosphate deaminase" (GL50803_8245) presentó el motivo GUU/UUG en el tallo el cual es específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo; 2009) (Figura 12).

Tomando en conjunto los resultados de los grupos analizados, se muestra que las estructuras encontradas son diferentes a las reportadas consenso de humano, sin embargo, la mayoría de las estructuras muestran el motivo GUU reportado por nuestro grupo de trabajo como específico de protozoarios parásitos; además, interesantemente se muestra que algunas de las estructuras presentan una variante del motivo GUU lo cual pudiera corresponder a, probablemente, un motivo específico para *Giardia*. Estos resultados sugieren la presencia de IREs-like primitivos en un parásito que divergió tempranamente en la evolución. Posiblemente, estos elementos representan los primordios del sistema IRE/IRP que con el tiempo se delimitaron a una secuencia más conservada y se fueron especializando hasta presentarse solamente en RNAm que codifican proteínas que participan en la adquisición y metabolismo del hierro como lo observamos hoy en eucariontes superiores.

Cuadro 7. Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas del metabolismo en *G. duodenalis*

Nombre común	Gene ID	Región	Secuencia Delimitada
<i>Glucosamine-6-phosphate deaminase</i>	GL50803_10829	5' UTR/CR	aaat t t t t c t g g t a a a [t] a a a a g a t t g a t t t a a g g c a a a A T G a c t g t g t g t g t t g c t c a g g c g g a g c g t g g t g c g t c a g a g c t g g a g t c t a
<i>Glucosamine-6-phosphate deaminase</i>	GL50803_8245	5' CR	c c t c g c c a a a a [t] a a a a A T G c c g t c c a t c c a c g t c t c c a a a t g c g c t g a t c c a g c c a t a a a g c t t g c c c a c c g t a t c g c g g a a g t t g t c

Delimitación de las regiones no traducidas de ciertas secuencias que codifican para proteínas del metabolismo en *G. duodenalis*. Se indican las siguientes señales en la región 5' UTR: Elemento CAAT: Sombreado. Región rica en T/A: Cursivas. Codón de inicio: Mayúsculas. Inicio de transcripción: Corchetes. Secuencia de IRE-like: Letras remarcadas.

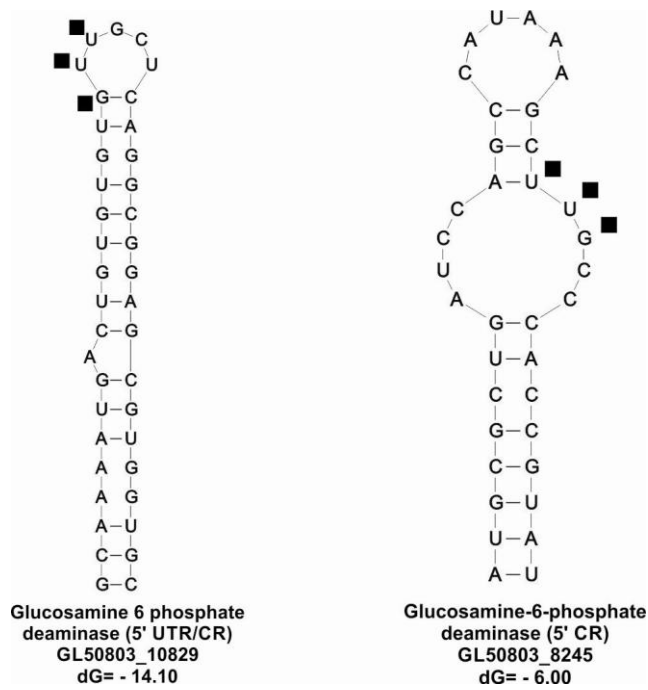


Fig 12. Estructuras tallo-burbuja en RNAm's que codifican posibles proteínas del metabolismo. Con cuadros se indica el motivo GUU/UUG específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo; 2009).

C Búsqueda de la proteína tipo IRP en el proteoma de *G. duodenalis*

Dado que el hierro afecta el crecimiento del parásito y el análisis *in silico* muestra la presencia de estructuras tallo burbuja en algunos RNAm analizados, nuestra hipótesis es que debe de existir un mecanismo de regulación postranscripcional de tipo IRE/IRP. Para que este mecanismo sea funcional necesita de los elementos en cis así como de los elementos en trans, en este caso la proteína reguladora de hierro. Por lo anterior, se realizó la búsqueda de los ortólogos de proteínas tipo IRP mediante análisis *in silico* en el proteoma de *G. duodenalis* utilizando como sondas las secuencias de IRPs obtenidas del GenBank que codifican para proteínas tipo IRP de humano y de otros organismos. Al utilizarla proteína citoplasmática reguladora de hierro 1 de humano como sonda cuyo número de acceso es NP_002188.1 obtuvimos identidad con las secuencias GL50803_14790 y GL50803_7555 del 32% y 20% respectivamente (Figura 13), ambas están anotadas como proteínas hipotéticas; por lo que se realizaron alineamientos múltiples en el programa bioinformático Biology Workbench. Se muestra primeramente un alineamiento entre la proteína reguladora de hierro 1 de humano y la secuencia GL50803_14790 de *G. duodenalis* (Figura 14), posteriormente el alineamiento entre la proteína reguladora de hierro 1 de humano y la secuencia GL50803_7575 de *G. duodenalis* (Figura 15), para visualizar la presencia de sitios conservados por separado. Finalmente se realizó un alineamiento múltiple entre la IRP-1 de humano con ambos genes de Giardia (Figura 16).

```

>GL50803_14790 | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
  product=hypothetical protein |
  location=GLCHR01:466729-467991(-) | length=420 |
  sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
  Length = 420

Score = 32.0 bits (71), Expect = 1.4, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 24/74 (32%), Positives = 33/74 (44%), Gaps = 2/74 (2%)

>GL50803_7555 | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
  product=hypothetical protein |
  location=GLCHR05:3540060-3542720(+) | length=886 |
  sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
  Length = 886

Score = 28.1 bits (61), Expect = 8.5, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 12/59 (20%), Positives = 28/59 (47%)

```

Fig 13. Descripción de las secuencias obtenidas del proteoma de *G. duodenalis*, utilizando como sonda la secuencia de la proteína reguladora de hierro 1 de humano.

```

GL50803_14790_hypothetical_p      -----MAIAHDDTRRSASFQ-----
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      MRDAVKKLGGDPEKINPVCADLVIDHSIQVDFNRRADSLQKNQDLEFER
                                     :* * :*: *:*

GL50803_14790_hypothetical_p      -----PRRRSALTTSLANMRESGYDP-----
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      NRERFEFLKWSQAFHNMRIIPPGSGIIHQVNL EYLARVVFDDQGYYPYD
                                     *          :* : : *

GL50803_14790_hypothetical_p      -----TEPGSIATIGLYPLRTGTSESQTNLLT-----
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      SLVGTDSHTTMIDGLGITLWGVGGIEAEAVMLGQPISMLVPQVIGYRLMG
                                     :.. * :*: . * *::: *

GL50803_14790_hypothetical_p      -----DSRMKYSDI-----
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      KPHPLVTSTDIVLTITKHLRQGVGVGKFEVFFGPGVAQLSIADRATIANM
                                     . * . :*:

GL50803_14790_hypothetical_p      CDSLKSSGTELSDQAARYS-----P
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      CPEYGATAAFFPVDEVISITYLVQVGRDEEKLKVIKKYLQAVGMFRDFNDP
* . :*: : . . . :

GL50803_14790_hypothetical_p      SQN-----KQLTLEASTGEPKSSDKAAKGTFLTSL ETVTAP----
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      SQDPDFTQVVELDLKTVVPCCSGPKRPQDKVAVSDMKKDFESCLGAKQGF
** : . * : ..* : : ** * . : : : * : ..

GL50803_14790_hypothetical_p      -----SLTEAVLTRPDLVTTSPDDPILTG-EVLIPP
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      KGFQVAPEHHNDHKTFIYDNTEFTLAHGSVVIAAITSCTNTSNPSVMLGA
. ** * : : * : : : . . . : * : : .

GL50803_14790_hypothetical_p      RYAKKTDFSPPTMMP-----
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      GLLAKKAVDAGLNVMPYIKTSLSPGSGVVYYLQESGVMPYLSQLGFDVV
* . . . : : **

GL50803_14790_hypothetical_p      -----RGPIRKMVIDRNRKSLLDRLGLLASHEGLT-----EEDRR
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      GYGCMTICIGNSGPLPEPVVEAITQGDLVAVGVLSGNRNFEGRVHPNTRAN
** : : * : . * : * : * : : : : : : .

GL50803_14790_hypothetical_p      LIAGP-----DIERCLMSPRASEFITAYAKRVCNPLEHI
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      YLASPPLVIAYAIAGTIRIDFEKPLGVNAKQQVFLKDIWPTRDEIQAV
: * * . * : : : : : : : : . : : : :

GL50803_14790_hypothetical_p      NDDIPSS-----KRLTTTREGHRGISSTSN-----HGSHLYQDVCGLY
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      ERQYVIPGMFKEVYQKIETVNESWNALATPSDKLFFWNSKSTYIKSPPFF
: : . : : : * : * . : : : : * : : : . * : : :

GL50803_14790_hypothetical_p      S-----TYPHHAVPKQSI RPPANLMKALWNQ
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      ENLTLDLQPPKSI VDAYVLLNLGDSVTTDHISPAGNIARNSPAARYLTNR
. . . * * * . : : * * :

GL50803_14790_hypothetical_p      PLTP-----RTRDREYIRMATLQPPETHYKHLKHERSPSGLTFEEM
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      GLTPREFNSYGSRRGNDAVMARGTFANIRLLNRF LNKQAPQTIHLPSGEI
*** * : : : * : . : * * : . . * . * :

GL50803_14790_hypothetical_p      LKYVPQNE-----IEYNIFNVYRWRPT-----
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      LDVFDAAERYQQAGLPLIVLAGKEYGAGSSRDWAAKGPFLLGIKAVLAES
* . . * * * * * . * * .

GL50803_14790_hypothetical_p      -----WHDLKGWGDPE-----HPLPSIADLSIENIASIEPQATRHTVDI
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      YERIHRSNLVGMGVIPLEYLPGENADALGLTGQERYTIIIPENLKPQMKV
: * * * . : : . * . : * * : : : :

GL50803_14790_hypothetical_p      NTMKTSAE-----
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      QVKLDTGKTFQAVMRFDTDVELTYFLNGGILNYMIRKMAK
: . : :

```

Fig 14. Alineamiento en ClustalW entre la proteína IRP1 de humano y la secuencia IRP-like GL50803_14790 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

GL50803_7555_hypothetical_pr Iron_Regulatory_Protein_1_[H] MSNSNLDSYLRSARHAPVLHCPFSIYS--ELQHLKDSDDLPSFLLRPLSY MRDAVKKLGDPPEKINPVCADLVIDHSIQVDFNRRADSLQKNQDLEFER * :: . . : ** . : * ::. : :..* . :.

GL50803_7555_hypothetical_pr Iron_Regulatory_Protein_1_[H] SLSRFNLFRSAGSISFSAALAPAAP----HEHYAYPCLASLVQFLGYRPE NRERFEFLKWSQAFHNMRIIPPGSGIIHQVNLLEYLARVVFDDGYYYPD . .*:::.. . . : *.. . : : * . . : * * * :

GL50803_7555_hypothetical_pr Iron_Regulatory_Protein_1_[H] DCNASVELEKPLQNHVCTYIASPELACALSLLGTQHTHPPDLESDDTS SLVGTDSHTTMIDGLGILGWGVGGIEAEAVMLGQPISMVLPQVIGYRLMG . . : . . : : . : : .. * .. : . . * : . .

GL50803_7555_hypothetical_pr Iron_Regulatory_Protein_1_[H] DSEELSD-DQQSPNRSRPRTHVELHLQHLRRSIPRPKSTKHANLYLLRAS KPHPLVTSTDIVLTITKHLRQGVVGVKFEVFFGPGVAQLSIADRATIANNM ... * : . . : : * : : : : . * . . * : :

GL50803_7555_hypothetical_pr Iron_Regulatory_Protein_1_[H] SRPTVCPNIIILVEDSGGAGLAALFRSICHRVSDVYSNLPVHSIFSTVYST CPEYGATAAFFPDEVSITYLVQTGRDEEKLKVIKKYLQAVGMFRDNDP : : * : : . . * . . *

GL50803_7555_hypothetical_pr Iron_Regulatory_Protein_1_[H] SIGEKQCLTMAHRGLMQCCNDGATSDLATERVLFTVQESKRIMRLFNRK SQDPDFQVVELDLKTVVPCCSGPKRPQDKVAVSDMKKDFESCLGAKQGF * . . . : : * *.. . * : : : : :

GL50803_7555_hypothetical_pr Iron_Regulatory_Protein_1_[H] ERQKDGWTWKRPRKLVSPSEITQALLRAKAAAQTSNKDEDEKETYQFSS KGFQVAPEHNDHKTFIYDNTEFTLAHGSVVIAAITSCNTSNPSVMLGA : : . . : : * : : . . * * . * * . . . : : : : :

GL50803_7555_hypothetical_pr Iron_Regulatory_Protein_1_[H] SLSPSSSESLTAQHKKITSYFYSYLSGYPTLAWPPVTVIDFSPIQYNIS GLLAKKAVDAGLNVMPYIKTSLSPGSGVVTYLQESGVMPYLSQLGDFDVV .* ... : : : * * : : * : : :

GL50803_7555_hypothetical_pr Iron_Regulatory_Protein_1_[H] TFDMCSEISFSLGTVHKEAGTKAAKRPILVGYSRHRFSYRRQLFRAQLFY GYGCMTICIGNSGPLPEPVVEAITQGDLVAVGVLSGNRNFEGRVH----- : . : * * . . . : : : * * . . . : : .

GL50803_7555_hypothetical_pr Iron_Regulatory_Protein_1_[H] HMLSNSSSYKLESDKYYYNSLNDCMDLHVEQAVVEKRKGQFRPLSVQEVLL --PNTRANYLASPPLVIAYAIAGTIRIDFEKEPLG-----VNAKQQQVFL . . : * . . : : . : : ..* : : * * *

GL50803_7555_hypothetical_pr Iron_Regulatory_Protein_1_[H] CGITGESRSLDEVVQKISEPADIIPPKKVPETKRTQKKNAKSSSKHSILD KDIWPTRDEIQAVERQYVIPGMFKEVYQKIETVNESWNLATPSDKLFFW .* . : : * : : * . : : : * * . . : : . * : : :

GL50803_7555_hypothetical_pr Iron_Regulatory_Protein_1_[H] QMVKVSQKPEAIDCEVGEPLRKQLPSSTVLDADSFIKLFNKTSDSNISS NSKSTYIKSPFFENLTLDLQ---PPKSIVDAYVLLNLGDSVTTDHIISP : . . *.. : : . : *..: * * : : * : . . : * * .

GL50803_7555_hypothetical_pr Iron_Regulatory_Protein_1_[H] MQHLGRDAPVPTFINGRGRAQHEYSLINEYSADDREDISFISVPLCEIAP AGNIARNSPAARYLTNRGLTPREFNSYGSRRGND-----AVMAR : : * : * . . : : * : : * . . . : * . : *

GL50803_7555_hypothetical_pr Iron_Regulatory_Protein_1_[H] FNCSHLFMLKDVASDIKYLKALACEALVLACYDTAS-WQASKHTLSLRPD GTFANIRLLNRF LNKPQTIHLPSGEILDVFDAAERYQQAGLPLIVLAG . : : : * : . . * . . : * * * : * : * : * : . .

GL50803_7555_hypothetical_pr Iron_Regulatory_Protein_1_[H] IRQLSNLIHFWDAAASMPVLAKRKQGAAPDHTYADVIEICSSLCGGFLI KEYGAGSSRDWAAKGPFLGIK-----AVLAESYERIHRSNLV . : . : * . . : * * * : * * . . : * * :

GL50803_7555_hypothetical_pr Iron_Regulatory_Protein_1_[H] LSGSSHLSLHQASTGQASCTIEISHIVNSERIQSAVRYVLLSQGSRKRY GMGVIPLLEYLPGEN-----ADALGLTGQERYTIIIPENLKPM * * : : : . * * : : . : :

```

GL50803_7555_hypothetical_pr      RVD F V P E T C P A L P V T E K Y I S Y L E R A D H Q D T I Q Y N I S L N M D Q K G I W G D I L L
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      K V Q V K L D T G ----- K T F Q A V M R F D T D V E L T ----- Y F
:* . . : *                . * . : : : . : : :                :

GL50803_7555_hypothetical_pr      A S G E I M T R R M V D M V H M A L P M V D Y G A P S S V L Q G L N V L K K W S Y L L L
Iron_Regulatory_Protein_1_[H      L N G G I L N Y M I R K M A K -----
. * * . . : . * . :

```

Fig 15. Alineamiento en ClustalW entre la proteína IRP1 de humano y la secuencia IRP-like GL50803_7575 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

Por otra parte, al realizar el análisis *in silico* utilizando a la IRP-2 de humano como sonda no se encontró homología, a pesar de tener un 62% de identidad con la IRP-1 de humano. Por lo que se utilizaron como sondas las secuencias de IRP de organismos menos evolucionados, por ejemplo *Anopheles gambiae*. Al sondear el genoma con la secuencia de la proteína reguladora de hierro de *A. gambiae* cuyo número de acceso es CAA04136.1 mostró un porcentaje de homología en la secuencia GL50803_14790 del 30% de identidad, el cual está anotado como proteína hipotética (Figura 17) y corresponde a una de las proteínas hipotéticas mencionadas en los análisis con la IRP-1 de humano. Por lo que se realizó un alineamiento entre la proteína reguladora de hierro de *A. gambiae* y la secuencia GL50803_14790 de *G. duodenalis* (correspondiente a la proteína hipotética mencionada) (Figura 18). De este análisis, observamos mayor similitud (30%) que con la proteína citoplasmática reguladora de hierro 1 de humano que concuerda con lo esperado en la escala evolutiva.

```
>GL50803_14790 | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |  
  product=hypothetical protein |  
  location=GLCHR01:466729-467991(-) | length=420 |  
  sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding  
  Length = 420
```

```
Score = 30.4 bits (67), Expect = 0.40, Method: Compositional matrix adjust.  
Identities = 24/79 (30%), Positives = 34/79 (43%), Gaps = 4/79 (5%)
```

Fig 17. Descripción de la secuencia obtenida del proteoma de *G. duodenalis*, utilizando como sonda la secuencia de la proteína reguladora de hierro de *A. gambiae*.

```

Iron_regulatory_protein_[Ano
GL50803_14790_hypothetical_p  ----PTRAEIQTVEQKHVIPAMFRDVYEKVELGSDSWQGLNAPTGLKLYPW
MAIAHDDTRRSASFQPRRSALTTSLANMRESGYDPTPEPGSIATIGLYPL
      :. .: * : .* : : * * * : . .* ***

Iron_regulatory_protein_[Ano
GL50803_14790_hypothetical_p  DTQSTYIKRPPFFDGMTRELPKIGNIVNAR-----ALLN
RTGTSESQTNLLLTDSRMKYSDICDSLKSSGTELSDAQARYSPSQNKQLT
* : : : : . : ..* : : : * .

Iron_regulatory_protein_[Ano
GL50803_14790_hypothetical_p  LGDS-----VTTDHISPAGSIARNSPA
LSEASTGEPKSSDKAAKGFLLTSLTETVTAPSLTEAVLTRPDLVTTSPDD
* : : : * : : . . : : . *

Iron_regulatory_protein_[Ano
GL50803_14790_hypothetical_p  RFLSDRGLTPRDFNSYGSRRGNDDIMARGTFANIRLVN-----
PILTGEVLIPPRYAKKTDFSPPTMMPRGPIRKMVIDRNRKSLDRGLL
.* : * * : . . : * * * : : : .

Iron_regulatory_protein_[Ano
GL50803_14790_hypothetical_p  -----KLVPRP-----GPRTLHIPSGEEMDVFDCAQRYAGEG
ASHEGLTEEDRRLIAGPDIERCLMSPRASEFITYAYKRVCNPLEHINDDI
      :* : * . * * : : : * : : : .

Iron_regulatory_protein_[Ano
GL50803_14790_hypothetical_p  TPLIALVGKDYGSGSSRDWAAKGPYLLGIKAVIAESYERIHRSN---LVG
PSSKRLTTTREGHRGISSTSNHGSHLYQDVCGLYSTYPHHAVPKQSI RPP
.. * . * . . : : * * . : . * : : .

Iron_regulatory_protein_[Ano
GL50803_14790_hypothetical_p  MGIVPLQYLAGQNAESLGLTGQELFSIAIPESCKPHERIPVSTDCGKQFE
ANLMKALWNQPLTPRTRDREYIRMATLQPPETHYKHLKHERSPSGLTFE
. : : : . . . : . . : : * * * * : . * *

Iron_regulatory_protein_[Ano
GL50803_14790_hypothetical_p  VIVRFDTEVDLEYFRN-----GG
EMLKYVPQNEIEYNIFNVYRWRPTWHDLKGWGDPHPLPSIADLSIENIAS
: : : : . : : * * . .

Iron_regulatory_protein_[Ano
GL50803_14790_hypothetical_p  ILNYMIRK MID-----
IEPQATRHTVDINTMK TSAE
* * : *

```

Fig 18. Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de *A. gambiae* y la secuencia IRP-like GL50803_14790 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

Por lo anterior se realizaron comparaciones con otros organismos como *Drosophila melanogaster*. Con la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster*, cuyo número de acceso es CAA11211.1, obtuvimos 33% de identidad con la secuencia GL50803_103818, 30% de identidad con GL50803_14790; ambas están anotadas como proteínas hipotéticas; 35% de identidad con la secuencia GL50803_11099, 30% de identidad con GL50803_16220 y 26 % de identidad con el gen GL50803_8682 (Figura 19) las cuales están anotadas como proteína 21.1, se desconoce la función sobre la familia de las proteínas 21.1, aunque comparten homología con algunos quinasas (Manning y col, 2011) y un análisis reportado por Emery y col, (2014) indica que la familia de las proteínas 21.1 se expresan en gran cantidad. Para visualizar mejor los alineamientos entre estas secuencias, se realizaron diversos alineamientos por separado entre la IRP de *D. melanogaster* y cada una de las probables IRP de Giardia. El alineamiento entre la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster* y la secuencia GL50803_103818 de *G. duodenalis* (Figura 20) muestra gran cantidad de aminoácidos idénticos en la parte amino y central de ambas secuencias ya que difieren en la longitud. El alineamiento entre la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster* y la secuencia GL50803_14790 de *G. duodenalis* (Figura 21) mostró mejor alineamiento ya que presenta aminoácidos idénticos a lo largo de ambas secuencias y comparten la longitud. Además se alinearon la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster* y las secuencias GL50803_103818 y GL50803_14790 de Giardia ya que ambas están anotadas en el genoma como proteínas hipotéticas (Figura 22) y de acuerdo a lo esperado, se muestran menos aminoácidos idénticos pues difieren en longitud. De igual manera, se alineó la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster* y la secuencia GL50803_11099 de *G. duodenalis*, anotada como proteína 21.1 (Figura 23). Después se realizó un alineamiento entre la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster* y la secuencia GL50803_16220 de Giardia (Figura 24). Posteriormente alineamos la secuencia de la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster* y la secuencia GL50803_86821 de *G. duodenalis* (Figura 25). Luego realizamos un alineamiento múltiple en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster* y las secuencias GL50803_11099, GL50803_16220 y GL50803_86821 de *G. duodenalis* (Figura 26) las cuales están anotadas en el proteoma como proteína 21.1. Nuestros resultados sugieren que la posible IRP en Giardia es la GL50803_11099 (proteína 21.1) en estos análisis.

Finalmente se realizó un alineamiento múltiple entre la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster* y las secuencias GL50803_103818, GL50803_14790, GL50803_11099,

GL50803_16220 y GL50803_86821 de *G. duodenalis* (Figura 27), es decir, con todas las secuencias anotadas como proteína 21.1 y las dos hipotéticas mencionadas. Este último alineamiento múltiple no muestra los aminoácidos idénticos pues las secuencias difieren en longitud. Sin embargo, los resultados en conjunto sugieren que la posible IRP de Giardia pudiera ser una de las anotadas como hipotéticas (GL50803_14790) o una de las proteína 21.1 (GL50803_11099). Para demostrar la funcionalidad de estas probables IRP faltan aún diferentes estudios tanto bioinformáticos como experimentales, los cuales están en proceso.

```

>GL50803_103818|organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB|
  product=hypothetical protein |
  location=GLCHR05:1937792-1945615(-)|length=2607|
  sequence_SO=chromosome|SO=protein_coding
  Length = 2607
  Score = 31.6 bits (70), Expect = 0.91, Method: Compositional matrix adjust.
  Identities = 24/71 (33%), Positives = 34/71 (47%), Gaps = 11/71 (15%)

>GL50803_14790|organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB|
  product=hypothetical protein |
  location=GLCHR01:466729-467991(-)|length=420|
  sequence_SO=chromosome|SO=protein_coding
  Length = 420
  Score = 29.3 bits (64), Expect = 3.6, Method: Compositional matrix adjust.
  Identities = 24/79 (30%), Positives = 34/79 (43%), Gaps = 4/79 (5%)

>GL50803_11099|organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB|
  product=Protein 21.1 |
  location=GLCHR05:2007327-2009987(-)|length=886|
  sequence_SO=chromosome|SO=protein_coding
  Length = 886
  Score = 30.0 bits (66), Expect = 2.1, Method: Compositional matrix adjust.
  Identities = 24/67 (35%), Positives = 33/67 (49%), Gaps = 5/67 (7%)

>GL50803_16220|organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB|
  product=Protein 21.1 |
  location=GLCHR01:219156-221096(-) |length=646|
  sequence_SO=chromosome|SO=protein_coding
  Length = 646
  Score = 28.5 bits (62), Expect = 6.8, Method: Compositional matrix adjust.
  Identities = 20/66 (30%), Positives = 31/66 (46%), Gaps = 2/66 (3%)

>GL50803_86821|organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB|
  product=Protein 21.1 |
  location=GLCHR04:926427-927515(-) |length=362|
  sequence_SO=chromosome|SO=protein_coding
  Length = 362
  Score = 28.5 bits (62), Expect = 6.4, Method: Compositional matrix adjust.
  Identities = 18/69 (26%), Positives = 30/69 (43%), Gaps = 2/69 (2%)

```

Fig 19. Descripción de las secuencias obtenidas del proteoma de *G. duodenalis*, utilizando como sonda la secuencia de la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster*.

GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_1
 TAGSSDDNLRSSLYLDNGEPYLVSSQQHALDSSLDLRPQGSRTKQRDS
 -----LVDQDPQYTESVTLDLSTVVTSVSGPKRPXDRVS
 * : :* ..* * : : * . .* : * *

GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_1
 SSSRISPAVNPSLEAQCSETDDKSNHTVELEGLEPIMEENRGASASVSSC
 VSS-----
 **

GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_1
 TNDMSLASLLVADSQWIYFSSDSIPCLMAQLGPVAPLKPEZYKDFFTRYH
 -----MCEDFKSLISPVGFKGFAIPPSALAASGEFQ
 :..* .**:: * . * * : :

GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_1
 CDAIRNDQKDVQKPKPASSAAKDKGSAIQVDPAITPEDLAELNLELALS
 WDDGKS---YKIGHGSVVIAAITSTNTSNPSVMLGAGLAKNAVQKGLS
 * :. :* . : * .. : : . : . ** : : * *

GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_1
 LILFELYGDPEPSAFILNSLLGFLNSDYEDLIDEESYSKQKHPVTQLRLSG
 ILPYIKTSLSPGSGVVT-----
 : : : . * : : :

GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_1
 LKKHVKSISVAVYYAQTAGKGSHTYLNYSQNKNASLISRLREAIASAC
 -----YYLRESGVIPYLEQLGFDIVGYGCMTCIGNSGPLDENV
 ** : :* : : * : : . . . : : .

GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_1
 VEGLRKDSVGSVGGKDSKQREQMPTTVVEASAFSKSQYGRINSTPQRL
 VNTIEKNGLVCCG-----VLSGNRNFEGRIHPNTRANYLAS
 * : : * : : . * * : * . : . . .

GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_1
 SKTVFADFIAKAKQTSFSIHPNYSLRNYSTFYLTNDKSSISSPLQRI
 PLLVIAIYAIAGRVDIDFEIEPLGVDSNGKEVFLR-----
 . * : * * : : : * * * * * * . . : *

GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_1
 DFYRMWASLFVQPESDLGTGDYADHFVMLSETEENISRIEIVSQKDSGDG
 DIWPTREIEIQEVEHKHVIPAMFQEVYSKIQLGSRDWTLEVSQSK-----
 * : : : : : . . . : : : : : . . . : * * * *

GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_1
 LGPLTTAIPMTAKLNILFGDKSVGIKQYTLTYILSDCSVFDTSALQEP
 LYPWS-EISTYIKLPPFFEGMTRALPKLKGIEKAR--CLLLGDSVTTDH
 * * : * . * * : * . : : * : * : : . * . :

GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_1
 VPIPAHLTPEETERPANESSGNPSRTQSRSGARGSVKTVDANPVASSLVE
 ISPAGSIARKSPAARYLSERGLTPRDFNSYSGRRGDVMA-----
 : . . . : : : . . * * * . * * . : * *

GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_1
 SSSSQNPAPQEPERALMCRIALEEDLLYTKRPDLARFALIAEFCGALTPS
 -----RGTGANIRLVNKLASKTGPS
 * : * : * : : . . * *

GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_1
 RSTACCNTDHIIEFAMYSKSNVQCNQIVLVDLTFAENNESKIQVTAHEK
 -----TLHVP
 * *

GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_1
 LSSPNDSIDTLPNFISNIIYEIIIGFLTEYGAAKSQSRHSTTSEKYSTRQD
 SGEEMDVFDAERYASEGTPLLVVVGKDYGSGSSRDWAAG-----
 .. * : * : : * : : : . : * * : * * . :

GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_1
 CNVKHSSAPFLFGDEVERSEISMAYRVPNIASVVLARVPDDLFSDSAY
 -----PFLLG
 * * * : *

GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_1
 SNETHVLLIELPIFNTFIVRFLVSKSTLFLLSNGDAVFIEGSLHLFRSD
 -----IKAVIAESYERIHRSN
 ..* * * : : * *

GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_1	TAFLSILQVRSSPSTCLVPTQGGSSAIPVYSSPLVLYASQGFPFWNVFFE LVGMGIIPLQFLP-----GQSADTLKLS-----GREVYNIIVLP . :.*: : : * * .** : : * * .*: : :
GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_2	QRKKWLVTRKIPERINFNPKSRPHLGQHNIERESMALKDTLTLARQMCNL EGE-----LKPGQR-----IQVDADGNVFETTLRFDEVDIT : : : : * * : : : : . : : ** : : :
GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_3	AQKEYSEFPAVYPCYLDIFGTESVWRMHHEAFVTGTDSVVVPLRGVTRFL YYKNGGILNYMIRKMLD----- * : . : : : **
GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_4	LGSPVHAPDCRGHSISPYPPSLSLLDWTGNTIFCRLGCTFEPKITKFVT -----
GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_5	LTESVQQPERSLSKEKGASRKETSSTGTQSSKKTKEPPRVATDNTNSAE -----
GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_6	QQSQDVASDALAKPPCTIVEKKLDCFNSVRPFLPPVIPPVKVQADVVELE -----
GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_7	RVLQEREDKAMQRILKREQALNDVLEKQSVESAPRKDAKEKSPKSNKDT -----
GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_8	NKPETTLKEEPLNDAPLEVHREIVDILSEVNPICKTYSALQLFFKHFSDI -----
GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_9	SRQKMEQEAAMAVAQSSAKGDLKNQVEPAFVSIKVVSSVYLSRQEHPT -----
GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_10	AEGLLDDCMQDPNGIPLPCCPIISPRYFIYPISPDLRNALSYSVEDECMG -----
GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_11	YLRNCEPWVCLHDADISYLRYIGMLHQLIDSSNYTAISSRSSQAYFKIST -----
GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_12	TSKLSCLPRYLFSLPLSSIVCQILNTRMSALAFNTLPMTSALEDSPCDAS -----
GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_13	TLSTTSRGKAGAKGVITRGGTHATVAQGIVLPPKLGKSAWETGASDPSP -----
GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_14	LHVPFGERFSLFDPNSPYLLHPGDKYAANVVEFIELHSFLTGDLLCYQ -----
GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_15	HLEQTKLNWKL SAAQRDIVIQSYQKMETTGIALGKALTSVIAILKKEKRQ -----
GL50803_103818_hypothetical_Iron_regulatory_protein-1A_16	REREAMRELEQQEELARQMALFAEQHVRSNEEEKNEVSYDYSDVKPTKSA -----

GL50803_103818_hypothetical_ Iron_regulatory_protein-1A_[]	RPRKHMNTKKPVDMALPKIANISPPPLDWKRQFNDEDLDVEYAALSVDEL -----
GL50803_103818_hypothetical_ Iron_regulatory_protein-1A_[]	RRKSYVEKYPLLKYVPADIDPREKAMSSKMLAHQTIIQSTSGSSVLGSSK -----
GL50803_103818_hypothetical_ Iron_regulatory_protein-1A_[]	NNPTILRAIPTKINIRQKTFNVLLKNLSEILSVSLTYDCNINLNLSEPTG -----
GL50803_103818_hypothetical_ Iron_regulatory_protein-1A_[]	PLTLSPQTSIDLHFEVKLHRPTEIVVKGETLAGNSDSIVVSCVKGIMPTS -----
GL50803_103818_hypothetical_ Iron_regulatory_protein-1A_[]	TSSHGLR -----

Fig 20. Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster* y la secuencia IRP-like GL50803_103818 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.


```

Iron_regulatory_protein-1A_[
GL50803_14790_hypothetical_p
-----
MSGSGANPFAQFQESFTQDGNVYKYFDLPSIDSKYESLPFSIRVLLESVA
-----

Iron_regulatory_protein-1A_[
GL50803_14790_hypothetical_p
RNCNDFHVLEKDVQSIGLWTPSLKQETSDVEVSFKPARVILQDFTGVPV
----MAIAHDDTRRSASFQPRRRSALTTSLANMRESGYDPTEP-GSIAT
      : : .* : : * : : : : : : * *
      : : .* : : * : : : : : : * *

Iron_regulatory_protein-1A_[
GL50803_14790_hypothetical_p
VDFAMRDAVRELGGNPEKINPICADLVIDHSVQVNFVRSDDALTKNES
IGLYPLRTGTSESQTN-----LLLTDSRMKYSDICDSLKSSGTELSDQA
:: : * . * * : : * : : * : : * : : :
:: : * . * * : : * : : * : : * : : :

Iron_regulatory_protein-1A_[
GL50803_14790_hypothetical_p
LEFQRNKERFTFLKKGARAFDNMLIVPPGSGIVHQVNEYLARVVFESDS
ARYSPSQNKQLTLEASTGEP-----KSSDK
.. : : : * . : : . * *

Iron_regulatory_protein-1A_[
GL50803_14790_hypothetical_p
SADGSKILYPDSVVGTDSTHTMINGLGVLGWGVGGIEAEAVMLGQISML
AAKGTFLTSLLETVT-----
:* : : : *

Iron_regulatory_protein-1A_[
GL50803_14790_hypothetical_p
LPEVIGYRLEGLKGLPLATSTDLVLTITKHLRQLGVVGFVEFYGPGVAEL
-----APSLTEA
      . * : : *

Iron_regulatory_protein-1A_[
GL50803_14790_hypothetical_p
SIADRATISNMCPEYGATVGYFPIIDENTLSYMRQTNRSEKKIDIRKYLK
VLTRPDLVTTVSPDDPILTGEVLIPP-----RYAKKTDFSPPTM
: : : : * : . * * * * : :

Iron_regulatory_protein-1A_[
GL50803_14790_hypothetical_p
ATRQLRDYSLVDQDPQYTESVTLDLSTVVTSVSGPKRPXDRVSVMCED
MPRGPIRKMVIDRN---RTKSLLDRLGLASHEGLTEEDRRLIAG---PD
.* : : : : : : * : : * : : * : : *

Iron_regulatory_protein-1A_[
GL50803_14790_hypothetical_p
FKSCLISPVGFKGFAIPPSALAASGEFQWDDGKSYKIGHGSVVIAAITSC
IERCLMSPR-----
: : * * : *

Iron_regulatory_protein-1A_[
GL50803_14790_hypothetical_p
TNTSNPSVMLGAGLLAKNAVQKGLSILPYIKTSLSPGSGVVTYYLRESGV
-----ASEFITIYAYKRCVPLEHINDDIPSSKRLTT-----
* . : . * : : . * : * : : : : : *

Iron_regulatory_protein-1A_[
GL50803_14790_hypothetical_p
IPYLEQLGFDIVGYGCMTCIGNSGPLDENNVNTIEKNGLVCCGVLSGNRN
-----TREGHRG-----ISSTSN
      * * : * : * : *

Iron_regulatory_protein-1A_[
GL50803_14790_hypothetical_p
FEGRIHPNTRANYLASPLLVIAYAIAGRVDIDFIEIPLGVDNSNGKEVFLR
HGSHLVQDVCGLYSTYPHHAVP-----KQ
. : : : : . * : * : : : : : :

Iron_regulatory_protein-1A_[
GL50803_14790_hypothetical_p
DIWPTRSEIQEVEHKHVIPAMFQEVYSKIQLGSRDWQTLVSDSKLYPWS
SIRPPANLKMALWNQPLTPRTRDREYIRMAT----LQPPETHYKHLKHE
.* * . : : : : : * : . * : : * * . : * *

Iron_regulatory_protein-1A_[
GL50803_14790_hypothetical_p
EISTYIKLPPFFEGMTRALPKLKGIEKARCLLLLGDSVTTDHIISPAGSIA
RSPSGLTFEEMLK-----
. . : : : : :

Iron_regulatory_protein-1A_[
GL50803_14790_hypothetical_p
RKSPAARYLSERGLTPRDFNSYGSRRGNDAVMARGTFANIRLVNKLASKT
-----YVPQNEIEYNI FNVYRWRPTWHDLKGWGDPHPLPSIADLSIEN
* : : . : . * * * * . : . * : : : * : :

Iron_regulatory_protein-1A_[
GL50803_14790_hypothetical_p
GPSTLHVPSGEEIMVFDAAERYASEGTPLLVVGKDYGSGSSRDWAAKGP
IASIEPQATRHTVDINTMKTSAE-----
.* : . : * :

```

Iron_regulatory_protein-1A_[GL50803_14790_hypothetical_p	FLLGIAKAVIAESYERIHRSNLVGMGIIPLQFLPGQSADTLKLSGREVYNI -----
Iron_regulatory_protein-1A_[GL50803_14790_hypothetical_p	VLPEGELKPGQRIQVDADGNVVFETTLRFDTEVDITYYKNGGILNYMIRKM -----
Iron_regulatory_protein-1A_[GL50803_14790_hypothetical_p	LD --

Fig 21. Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster* y la secuencia IRP-like GL50803_14790 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	MRIVPLLIRRVGPCTEALAADLSSPVFKDLVYLDFTADCASKQTMLLSSL ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	QDVVSAKRTAALSLGVEHTTFVLIDGIEQSDLRALDLCVGGQVTLTSGSS ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	TSDASYSCTFPELDINLRHFYCPSEQEVAAKPIEKSKGKSDSKNEAPKVET ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	KDFHEYLINETAIEFPILLSVAQELLREWMHRRLYMAHLRASRVHNVSGH ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	SVWLDVMPPIVTLGCPSLHLLYDTAVLGPRMMRLYRTRMSYFSPADQNH ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	LSVLLGAMVDAVVLCSPPKKADTQLAQPASVADNIPLSEGDISLNLVLT ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	RGPRESNLAGNREESAHEHDCQSTPVLSWNHAGEESSALTDESVTLSDR ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	TITGPLLFPILRSVIHSESTCFAPFEDSNLFRQRFEGLPSSFTGITGLLRL ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	YSSSKGNREAGHNDGHALNCDTNEPLQNTYEALSPQMNKATAYTSLYDTY ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	TITLNRVSEEVKTYKKRALDAQIATLDIQKLIIEEYFPERNYAILENFRS ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	LSPRTVMLRRSDFQELIRLFLKESQPPLSIQEAETLVRKTLVLHLNELLV ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	ANGSPGLPPNNILDITAALPETVVHKNLQHSAAVIKLGTKTSEAQNRLAY ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	YTALVPKPIIPVMNYAYFEPLTNSLCLSQKLIENEDGVVLRLENTNEL ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	VLKQSLLRNIQQYLLRHLQELCRLLDIPYDPISVLSTVVPSYVEWRNALE ----- -----

GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	QFSPVSAPSELADPALVYSICYCYADSPASFNEFLHGKDGHNEQSASTGQ ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	PSYRISPHRVRKPNPISQFIDFIIETVTEACVATYRQVAEFANSKVNQCQT ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	AGSSDDNLRSSLYLDNGEPYLVSSQQHALDSSLSRPPQGSRTKQRDSS ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	SSRISPAVNPSLEAQCSETDDKSNHTVELEGLEPIMEENRGASASVSSCT ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	NDMSLASLLVADSQWIYFSSDSIPCLMAQLGPVAPLKPEYSYKDFFFTRYHC ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	DAIRNDQKDVDPQKGPASSAAKDKGSAIQVDPAITPEDLAELNLELALS ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	ILFELYGDEPSAFILNSLLGFLNSDYEDLIDEESYSKQKHPVTQLRLSGL ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	KKHKVISVSAVYYAQTAGKGSHTYLNYSQNKNASLISRLREAISASCV ----- -----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	EGLRKDSVGSVGGKDKSKQREMPPTVVVEASAFSKSQYGRINSTPQRLS ----- -----MSGSGANPFAQFQESFTQDGNVYKYFDLPSIDSKYESLP
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	KTVFADFIKAKAQTFSFIHPNYSLRNYSTFYLTPNDKSSISSSPLQRRID ----- FSIRVLLESAVRN-----CDNFHVLEKDVQSILGWTPSLKQETS
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	FYRMWASLFVQPESDLGTGDYADHFVMLSETEENISRIEVVSQKDSGDGL ----- VEVSFKPARVILQDFTGVPVVDFAAMRDVRELGGNPEKINPICPADLV
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	GPLTTAIPMTAKLNILFGDKSVGIKQYT-LTYILSDCSRVFVDTSAEQEP ----- IDHSVQVNFVRSSDALTKNESLEFQRNKERFTFLKNGARAFDNMLIVPPG
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	VPIPAHLTPEETERPANESSGNPSRTQSRSGARGSVKTVDPANPVASSLVE ----- SGIVHQVNLEYLARVVFESDSSADGSKILYPDSVVGTDSHHTMINGLVL
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	SSSSQNPAQPQEPERALMCRIALEEDLLYTKRPDLARFALIAEFCGALTPS ----- GWGVGGIEAEAVMLGQSISSMLLPEVIGYRLEGKLGPLATSTDLVLTITKH

GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	RSTACCNTDHIIEFAMYS DGSCNVQCNGIVLVDLTFAENNESKIQVTAHEK ----- LRQLGVVGKVFVEFYG-----PGVAELSIADRATISNMCPPEYGATV
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	LSSPNDSIDTLPNFISNIIYEIIGFLTEYGAAKSQSRHSTTSEKYSTRQD ----- GYFPIDENTLSYMRQTNRSEKKIDIRKYLKATRQLRDYSLVDQDPQYTE
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	CNVKHSSAPFLFGDEVERSEISMAYARLVNPIASVVLARVPDDLFSDSAY ----- S-----VTLDLSTVVTSVSGPKRXPDRVSVSSM
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	SNETHVLLIELPIFNTFIVRFLVSKSTLFLLSNGDAVFIEGSYLHLFRSD ----- CEDFKSCLISPVGFKGFAIP-----PSALAASGEFQWDDGKSYKIGHGS
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	TAFLSILQVRSSPSTCLVPTQGGSSAIPVYSSPLVLYASQGFPPWNVFFE ----- VVIAAITSCTNTSNPSVMLGAG-----
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	QRKKWL VTRKIPERINFNPKSRPHLGQHNIERESMALKDTLTLARQMCNL ---MAIAHDDTRRSASFQPRRRSALTT-----L ----LLAKNAVQKGLSILPYIKTSLSPGS-----GVVTTYLRESGVI : . . . : * : . * :
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	AQKEYSEFPVAVPCYLDIFGFTESVWRMHHEAFVTGDSVVVPLRGVTRFL ANMRESGYDPTEPGSIATIG-----LYPLR----- PYLEQLGFDIVGYGCMTCIG----- . . . : . : *
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	LGSPEVHAPDCRGHSISPPPSLSLLDWTGNTIFCRLGCTFEPKITKFVT -----TGTSESOTNLLTDSR-----MKYSD -----NSGPLDENVVNTIEKNG-----LVCCG : . . : :
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	LTESVQQPERSLSKEKGASRKETSSTGTQSSKTSKEPPRVATDNTSAE ICDSLK-----SSGTELSDQAARYSPSQNKQLTSEA VLSGNRN-----FEGRIHPNTRANYLASPLLVIAYAIAG : . . : . . . : :
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	QQSQDVASDALAKPPCTIVEKKLDCFNSVRPFLPPVIPPVQADVVVELE STGEPKSSDKAAG-----TFLTSLETVTAPSLTEAVLTRPD RVDIDFEIEPLGVDSNGKEVFLRDIWPTREIQEVEHKHVIPAMFQEVYS . . : . : : . . .
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	RVLQEREDKAMQRI LKREQALNDVLEKQSVESAPRKDAKEKSPKKS NKDT LVTTSVPD---DPILTGEVLIPPRYAKTDFSPPTMMPRGPIRKMVIDR KIQLGSRDWQTLVSDSKLYPWSEISTYIKLPPPFEGMTRALPKLKGIEK : * : : . . . : :
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	NKPETTLKEEPLNDAPLEVHREIVDILSEVNPIKTYALQLFFKHFSDI NRTKSLDRGLLASHEG----- ARCLLLLGDSVTTDHISP----- : * : . .
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	SRQKMEQEAAMAVASAKGDKLKNQVEPAFVSIKPVSSVYLSRQEHPT -----LTEEDRRLI -----AGSIARKSP :
GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	AEGLLDDCMQDPNGIPLPCCPIISPRYFIYIPSPDLRNALSYSVEDECMG AGPDIERCLMSPR-----ASEFITY-----A AARYLSERGLTPRDFN-----S * : . * .


```

GL50803_103818_hypothetical_      YLRNCEPWVCLHDADISYLRYIGMLHQLIDSSNYTAISSRSSQAYFKIST
GL50803_14790_hypothetical_p      YKRCVNPLEHINDDIPSSKRLT-----TTREGHRISS
Iron_regulatory_protein-1A_[      YGSRRGNDAVMARGTFANIRLVN-----KLASKTGPSTLHV
*           :           : *           : . . :

GL50803_103818_hypothetical_      TSKLSCLPRYLFSPLSSIVCQILNTRMSALAFNTLPM TSALEDSPCDAS
GL50803_14790_hypothetical_p      TSN-----HGSHLYQDVCGLYSTYP-----
Iron_regulatory_protein-1A_[      PSG-----EEMDVFDAAER-----
.*           : .:

GL50803_103818_hypothetical_      TLSTTSRGKAGAGVITRGGTHATVAQGI VLPKPKGKSAWETGASDPSP
GL50803_14790_hypothetical_p      -----HHAVPKQSIRPPANLMKALWN-----
Iron_regulatory_protein-1A_[      -----YASEGTPLVLVVGKDYGSG-----
           : :           :           :

GL50803_103818_hypothetical_      LHVPFGERFLSLFDPNSPYLLHPGDKYAANVVEFIELHSLFKGDL LCCYQ
GL50803_14790_hypothetical_p      -----QPLTP-----
Iron_regulatory_protein-1A_[      -----

GL50803_103818_hypothetical_      HLEQTKLNWKL SAAQRDIVIQSYQKMETTGIALGKALTSVIAILKKEKRQ
GL50803_14790_hypothetical_p      -----RT
Iron_regulatory_protein-1A_[      -----SS

GL50803_103818_hypothetical_      RREAMRELEQQEELARQMALFAEQHVRSNEEEKNEVSYDYSVDKPTKSA
GL50803_14790_hypothetical_p      RDREYIRMATLQ-----PPETH
Iron_regulatory_protein-1A_[      RDWAAKGPFLLG-----IKAVIA
* ;

GL50803_103818_hypothetical_      RPRKHMNTKKPVDMALPKIANISPPPLDWKRQFNDEDLDVEYAALSVDL
GL50803_14790_hypothetical_p      YKHL YKHERSPSGLTFEEMLK YVP-----QNEIEYNI FNVYRW
Iron_regulatory_protein-1A_[      ESYERIHRSNLVGMGI IPLQLP-----GQSADTLKLSGREV
           : . . : : :           : : . .

GL50803_103818_hypothetical_      RRKSYVEKYPLLKYVPADIDPREKAMSSKMLAHQTI IQSTSGSSVLGSSK
GL50803_14790_hypothetical_p      R-----PTWHD LKGWGDP-----HPLPSIADLSI
Iron_regulatory_protein-1A_[      YN-----IVLPEGELKP-----GQRIQVDADG
           . *           .

GL50803_103818_hypothetical_      NNPTILRAIPTKINIRQKTFNVLLKNLSEDI LSVSLTYDCNII NLSEPTG
GL50803_14790_hypothetical_p      ENIASIEPQATRHTVDINTMKTSAE-----
Iron_regulatory_protein-1A_[      NVFETTLRFDT EVDITYYKNGGILNYMIRKMLD-----
           :           * . : . :

GL50803_103818_hypothetical_      PLTLSPQTSIDLHFEVKLHRPTEIVVKGETLAGNSDSIVVSCVKGIMPTS
GL50803_14790_hypothetical_p      -----
Iron_regulatory_protein-1A_[      -----

GL50803_103818_hypothetical_      TSSHSGLR
GL50803_14790_hypothetical_p      -----
Iron_regulatory_protein-1A_[      -----

```

Fig 22. Alineamiento Múltiple en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster* y las secuencias IRP-like GL50803_103818, GL50803_14790 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.


```

GL50803_11099_Protein_21.1_  LHGFVPMNNLAAYVLLAPRLSNIRDQNGRTALMVAEELDQLDIVRVLLPY
Iron_regulatory_protein-1A_  RD-----WAAKGPFLGKAVIAESYER-----IHRSNLVGMGIPLQLFLP
.          . :*. . : .. : : :* :.* : :

GL50803_11099_Protein_21.1_  EAGAQTSKGHTALMMAAQLGYLRIVQELSPLFAHILDQRGRSAIYYATDG
Iron_regulatory_protein-1A_  GQSADTLK----LSGREVYNIVLPEGELKPGQRIQVDADGN---VFETTL
. :* * * . : **,* : : * * . : *

GL50803_11099_Protein_21.1_  SVYKDVNLSERIEVIQGHVHSNNL-
Iron_regulatory_protein-1A_  RFDTEVDITYYKNGGILNYMIRKMLD
. .:*::: * .:: : *

```

Fig 23. Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster* y la secuencia IRP-like GL50803_11099 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.


```

GL50803_16220_Protein_21.1_  DLPTDREPVATFFAPSLPPETGVSTETYVKLSKENSELTQQVKQLKREVSS
Iron_regulatory_protein-1A_  PFLLLGIKAVIAESYERIHRSNLVGMGIIPLQFLPGQSADTLKLSGREVYN
      : . :.* :      : :.: :      : *. .: : : * *** .

GL50803_16220_Protein_21.1_  LKSKLGLTQDPSRVTEDGVGRAQLSPLILLQIENIKLKKQLNDKVKLLSN
Iron_regulatory_protein-1A_  IVLPEGELKPGQRIQVDADGNVFETTLRFDTEVDITYYKNGGILNYMIRK
      : * : .*: *. *.. :.* :      :*. *. . : : :

GL50803_16220_Protein_21.1_  QENHI
Iron_regulatory_protein-1A_  MLD--
      :

```

Fig 24. Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster* y la secuencia IRP-like GL50803_16220 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.


```

GL50803_86821_Protein_21.1_[]  LQRSWGATVSMFYRGLSKT-----
Iron_regulatory_protein-1A_[]  FLLGIAKAVIAESYERIHRSNLVGMGIIPLQFLPGQSADTLKLSGREVYNI
                                : . * .:: * . : ::

GL50803_86821_Protein_21.1_[]  --RRALLRVFSRRAETAATAISSVSNTLSV-----
Iron_regulatory_protein-1A_[]  VLPEGELKPGQRIQVDADGNVFETTLRFDTDEVDTITYYKNGGILNYMIRKM
                                .. *: .* .:: .....: : *

GL50803_86821_Protein_21.1_[]  --
Iron_regulatory_protein-1A_[]  LD

```

Fig 25. Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster* y la secuencia IRP-like GL50803_86821 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.


```

GL50803_86821_Protein_21.1_[] --MDTSHGFLKARFKNEMTDDLEAWLTACQLGD-----LQFVRDNIACKK
GL50803_16220_Protein_21.1_[] -----MQAEWFEAVSARN-----LDYIAQNLEQCC
GL50803_11099_Protein_21.1_[] -MSDQWFSAKLRADNTYVMAHLEEYFLAVDEGTNSSLTIAVLYANKEAIA
Iron_regulatory_protein-1A_[] MSGSGANPFAQFQESFTQDGNVYKYFDLPSIDSKYESLPFSIRVLLLESVA
                                :: . :
                                :

GL50803_86821_Protein_21.1_[] AKVNSLS-----ESGLMLAAYFNQLDIVKALLYFEY
GL50803_16220_Protein_21.1_[] TLHNEQG-----LTGLMIAAKNGDIDIVKKLVPYEA
GL50803_11099_Protein_21.1_[] AICNLYANTLRTACDEKRRTAILTSLTQGMKACLRNDEADIFALLCPHLL
Iron_regulatory_protein-1A_[] RNCDNFHVLEKDVQS-----ILGWTPSLKQETS DVEVSFKPARV
                                : * . * : :
                                :

GL50803_86821_Protein_21.1_[] TLGNSDGYTALMYAACANNLK-----VCELLIERECC
GL50803_16220_Protein_21.1_[] GQQDPDGIPAAIYAYNAKHIE-----IMEEILQAEAS
GL50803_11099_Protein_21.1_[] SAQIVSKVDMMERAI EASAYS-----IVELLRLDEEL
Iron_regulatory_protein-1A_[] ILQDFTGVPVAVDFAAMRDAVRELGGNPEKINPICPADLVIDHSVQVNFV
                                : : : :
                                :

GL50803_86821_Protein_21.1_[] --YVLRDGTALMLAVQCGLQIVFEFLCPYDMFMKDNNETALFHAIRAG
GL50803_16220_Protein_21.1_[] --YRFTDSDILMYLIRHGCNDVLLSIVHHFSPSHIDYNGYSHLDHAVMCR
GL50803_11099_Protein_21.1_[] GSEHVEKVLQSVHSPTSAQYNRIVEMLAHRKQSARAIQPESLADQSEQVQ
Iron_regulatory_protein-1A_[] RSSDALTKNESLEFQRNKERFTFLKWGARAFDNMLIVPPGSGIVHQVNLE
                                : .: : :
                                :

GL50803_86821_Protein_21.1_[] R-----LVVVKLIE-----KSQSVVAD
GL50803_16220_Protein_21.1_[] N-----TYAIELLVNSFEYDESAISRALALAE
GL50803_11099_Protein_21.1_[] TGSASALDKKTGES-----IATATSGMGTHLTTEEWARATKSMLE
Iron_regulatory_protein-1A_[] YLARVVFESDSSADGSKILYPDSVVGTDSHHTMINGLGVLGWGVGGIEAE
                                . : :
                                :

GL50803_86821_Protein_21.1_[] DVRAAAA YAQKQNNQ-----
GL50803_16220_Protein_21.1_[] VDKKAPAKNLSSEGER-----
GL50803_11099_Protein_21.1_[] AVKALQAELLKEQSQRKYQDISSILSNEKQSYETMDTKLRSLTEQLKT
Iron_regulatory_protein-1A_[] AVMLGQSISMLLPEVIGYRLEGKLGPLATSTDLVLTITKHLRQLGVVGGF
                                : .
                                :

GL50803_86821_Protein_21.1_[] -----TIHLFLKGIENAVPETRPV
GL50803_16220_Protein_21.1_[] -----PIVILICELFNINPRSIAS
GL50803_11099_Protein_21.1_[] QEKQLCEKEEEIARLTTELTAATQASGMVHPISLTLTSNAVETPNMSEE
Iron_regulatory_protein-1A_[] VEFYGPVGAELSIADRATISNMCEYGATVGYFPIDENTLSYMRQTNRSE
                                : :
                                :

GL50803_86821_Protein_21.1_[] PSIT-----
GL50803_16220_Protein_21.1_[] PEIDDLQYYARGNASTLTDPCVDIGSAITGISALSERNVAFSDALGLFL
GL50803_11099_Protein_21.1_[] AQIKDNLAAASADAESICKQMLSEYSILKSNLLTLGLESSII SQNFAKVSV
Iron_regulatory_protein-1A_[] KKIDIIIRKYLKATRQLRDYSLVDQDPQYTESVTLDLSTVVTSVSGPKRPX
                                . *
                                :

GL50803_86821_Protein_21.1_[] -----PRHPKIMRPAAS
GL50803_16220_Protein_21.1_[] PDEYGAARGSV-----ANLPPTGPVQGNPGSPGHPQSPR-LLS
GL50803_11099_Protein_21.1_[] LTEIASTEIQTLRRSCLDAIAEAEAIRDRLSVQNERDALNTELQQLKQS
Iron_regulatory_protein-1A_[] -DRVSVSSMCEDFKSC LISPVGFKGFAIPPSALAASGEFQWDDGKSYKIG
                                . .
                                :

GL50803_86821_Protein_21.1_[] APVVKRTKIEEYFAKKAGVLGQLTQGLQVP-----
GL50803_16220_Protein_21.1_[] QPEYPDANISSFNRFPPPTNPTNRVSLQIPGTYGPISTGIYEKTLNRP
GL50803_11099_Protein_21.1_[] ITLLRQTAAESDTKQTDPTHQDQVQEPSIECCTSDLIPLAAHNDVETRMI
Iron_regulatory_protein-1A_[] HGSVVI AAITCNTNTSNPSVMLGAGLLAKNAVQKGLSILPYIKTSLSPGS
                                : .
                                :

GL50803_86821_Protein_21.1_[] -----
GL50803_16220_Protein_21.1_[] LSSGLKAMQSDTENSVIDTANILDITLLKKEYSKAIMECERLRK-----
GL50803_11099_Protein_21.1_[] DTMTIYSYLEEEEGKAAADDDACSLTKLIEQLADHGVQVECVGPGVHLR
Iron_regulatory_protein-1A_[] GVVTYYLRESGVIPYLEQLGFDIVGYGCMTICIGNSGPLDENVVNT-----

```



```

GL50803_86821_Protein_21.1_[]  -----QSIVKRAASKSATRTVSKKPEGCTTNCTEEVQHAP-----
GL50803_16220_Protein_21.1_[] --EVQHQRLARLHAVNATVQAVPTRREAIVQTCNEAPDAPASQEDGVYQQ
GL50803_11099_Protein_21.1_[] VVDPTRLSILLQEALQQPGASVLYPSEFSVANFHQLERQAEPSNARTEEI
Iron_regulatory_protein-1A_[] ---IEKNGLVCCGVLSGNRNFEGRIHPNTRANYLASPLLVIAYAIAGRVD
                                :   .   .
                                .

GL50803_86821_Protein_21.1_[]  -----QVSLEHNSKDITTNTSP-----
GL50803_16220_Protein_21.1_[] DLAAAKVTPSTTREELVAIV--LALRKEVEVKNKLLTLGSQPGKASQSTI
GL50803_11099_Protein_21.1_[] QALQPQPQPQSQSQPGAELEGSLAEAQTLIARLTEELLEKDKAIAELNQC
Iron_regulatory_protein-1A_[] IDFEIEPLGVDSNGKEVFLRDIWPTRSEIQEVEHKHVIPAMFQEVYSKIQ
                                :
                                .

GL50803_86821_Protein_21.1_[]  -----SSSGEAQGWLQRSWGATVSMFYRGLSKTRRALLRVFSRRA
GL50803_16220_Protein_21.1_[] DCMATALRRRQTEASKAQRQAMQAKNEQLAQLHIALQKREQQIRSIQIAAQ
GL50803_11099_Protein_21.1_[] LAQIPLADCDVISDHRKEGVGNMERVACILYQRALCERDKVLRDIEESKE
Iron_regulatory_protein-1A_[] LGSRDWQTLEVSDSKLYPWSEISTYIKLPPFEGMTRALPKLGIEKAR-
                                ..                .: . : :
                                .

GL50803_86821_Protein_21.1_[]  AET----AATAISSSVSNTLSV-----
GL50803_16220_Protein_21.1_[] AYN---KTHQSHIDVPTDLPTDREPVATTFAPSLPETGSVTETYVKLSK
GL50803_11099_Protein_21.1_[] SADNPYIVSFVTQRKLNSIIPCEETLLRELFSKACLRHDILHEDADGIWL
Iron_regulatory_protein-1A_[] -----CLLLLGDSVTDHISPAGSIARKSPAARYLSERGLTPRDFNSYGS
                                .

GL50803_86821_Protein_21.1_[]  -----
GL50803_16220_Protein_21.1_[] ENSELTQVQV-----QLKREVSSLKSKLGLTQDPSRVTEDGVGRAQLSP
GL50803_11099_Protein_21.1_[] EVLEVTIQARNYHLSEYLRSKLVRVSNVLHDQCNRGATLHGFVPMNLAA
Iron_regulatory_protein-1A_[] RRGNDAVMARGTFANIRLVNKLASKTGPSTLHVPSGEMDVFDAAERYS

GL50803_86821_Protein_21.1_[]  -----
GL50803_16220_Protein_21.1_[] LILLQIENIKLKQLNDKVKLLSNQENHI-----
GL50803_11099_Protein_21.1_[] VYLLAPLRSNIRDQNGRTAMVAELDQLDIVRVLLPYEAGAQTS-----
Iron_regulatory_protein-1A_[] EGTPLVLVVGKDYGSSRDWAAKGPFLLGIKAVIAESYERIHRSNLVGM

GL50803_86821_Protein_21.1_[]  -----
GL50803_16220_Protein_21.1_[] -----
GL50803_11099_Protein_21.1_[] -----KGHTALMMAAQLGYLRIVQELSPLEAHILDQRGRSAIYYAT
Iron_regulatory_protein-1A_[] GIIPLQFLPGQSADTLKLSGREVYNIVLPEGELKPGQRIQVDADGNVFET

GL50803_86821_Protein_21.1_[]  -----
GL50803_16220_Protein_21.1_[] -----
GL50803_11099_Protein_21.1_[] DGSVYKDVNLSERIEVIQGHVHSNNL-
Iron_regulatory_protein-1A_[] TLRFDEVDITYYKNGGILNYMIRKMLD

```

Fig 26. Alineamiento Múltiple en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster* y las secuencias IRP-like GL50803_11099, GL50803_16220, GL50803_86821 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

GL50803_86821_Protein_21.1_	-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	-----
GL50803_11099_Protein_21.1_	-----
GL50803_103818_hypothetical_	MRIVPLLIRRVGPCTEALAADLSSPVFKDLVYLDFTADCASKQTMLLSSL
GL50803_14790_hypothetical_p	-----
Iron_regulatory_protein-1A_	-----
GL50803_86821_Protein_21.1_	-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	-----
GL50803_11099_Protein_21.1_	-----
GL50803_103818_hypothetical_	QDVVSARKRTAALS LGVEHTTFVLIDGIEQSDLRALDLCVGGQVTLTSGSS
GL50803_14790_hypothetical_p	-----
Iron_regulatory_protein-1A_	-----
GL50803_86821_Protein_21.1_	-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	-----
GL50803_11099_Protein_21.1_	-----
GL50803_103818_hypothetical_	TSDASYSCTFPELDINLRHFYCPSEQEVAAPKPIEKSKGKSDSKNEAPKVET
GL50803_14790_hypothetical_p	-----
Iron_regulatory_protein-1A_	-----
GL50803_86821_Protein_21.1_	-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	-----
GL50803_11099_Protein_21.1_	-----
GL50803_103818_hypothetical_	KDFHEYLINETAIEFPLLLSVAQELLREWMHRRLYMAHLRASRVHNVSGH
GL50803_14790_hypothetical_p	-----
Iron_regulatory_protein-1A_	-----
GL50803_86821_Protein_21.1_	-----MDTSHGFLKARFKNE
GL50803_16220_Protein_21.1_	-----
GL50803_11099_Protein_21.1_	-----MSDQWFSALKRADNTY
GL50803_103818_hypothetical_	SVWLDVMPPIVTLGCPSLHLLYDTAVLGPRMRLYRTRMSYFSPADQNH
GL50803_14790_hypothetical_p	-----MAIAHDDTRR
Iron_regulatory_protein-1A_	-----MSGSGANPFAQFQESFTQDGNVYKYF
GL50803_86821_Protein_21.1_	MTDDLEAWLTACQLGD----LQFVRDNIACKKAKVNSLS-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	---MQAEWF ^E AVSARN----LDYIAQ ^N LEQCCTLHNEQG-----
GL50803_11099_Protein_21.1_	VMAHLEEYFLAVDEGTNSSLTIAVLYANKEAIAAICNL ^N YANTLRT----A
GL50803_103818_hypothetical_	LSVLLGAMVD ^A VVLCSPDPKKADTQLA ^Q PASVADNIPLSEGDISLNLVLT
GL50803_14790_hypothetical_p	SASFQ ^R RRRSALTTSLANMRESGYDPT ^E PGSIATIGLYP-----
Iron_regulatory_protein-1A_	DLPSIDSKY ^E SLPFSIRVLL ^E SAVRNC ^D NFHVLEKDVQ ^S SILG-----
	:
GL50803_86821_Protein_21.1_	-----ESGLMLAAYFNQLDIVKALLYFEYTLGNSDGYTALMY
GL50803_16220_Protein_21.1_	-----LTGLMIAAKNGDIDIVKLLVPYEAGQQDPDGPAAIY
GL50803_11099_Protein_21.1_	CDEKKRTAILTSLTQGMKACLRND ^E ADIFALLCPHLLSAQIVSKVDMMER
GL50803_103818_hypothetical_	RGPRESNLAGNREESA ^E AHEDCQSTPVELSWNHAGESSAL ^T DESVTLSDR
GL50803_14790_hypothetical_p	-----LRTGTSESQTNLLLTDSRMKYS ^D ICDSLKSSGT ^E LS ^D Q
Iron_regulatory_protein-1A_	-----WTPSLKQETS ^D VEVSFKPARVILQDFTGVP ^A VVDF ^F AAM
GL50803_86821_Protein_21.1_	AACANNLKVCELLIERECC--YVLRDG--TTALMLAVQC ^G HLQIVEFLCP
GL50803_16220_Protein_21.1_	AYNAKHIEIMEEILQAEAS--YRFTDD--SDILMYLIRHGCNDVLLSIVH
GL50803_11099_Protein_21.1_	AIEASAYSIVELLRDEELGSEHVEKV--LQSVHSPTS ^A QYNRIVEMLAH
GL50803_103818_hypothetical_	TITGPLLFP ^L RSVIHSESTCFAPFEDSNLFRQRFEGLPSSFTGITGLLRL
GL50803_14790_hypothetical_p	AARYSPSQNKQLT ^L SEASTGEPKSSDK-----AAKGTFLTSLETVTA
Iron_regulatory_protein-1A_	RDAVRELGGNPEKINPICPADLVIDHSVQVNFVRS ^S DALTKNESLEFQ ^R N
	:

GL50803_86821_Protein_21.1_	YDMFMKDNNNETALFHAIAGR-----LVVVKKLI-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	HFPSHIDYNGYSHLDHAVMCRN-----TYAIELLVNSFEYD
GL50803_11099_Protein_21.1_	RKQSARAIQPESLADQSEVQVTGSASALDKKTGESIATATSGMGTHLTLE
GL50803_103818_hypothetical_	YSSSKGNREAGHNDGHALNCDTN---EPLQNTYEALSPQMNKATAYTSLY
GL50803_14790_hypothetical_p	PSL TEAVL TRPDLVTTSPDD-----PILTGEVLIPPRY
Iron_regulatory_protein-1A_	KERFTFLKWGARAFDNMLIVPPG-----SGIVHQVNLEYLARVVFES
GL50803_86821_Protein_21.1_	-----KSQSVVADDVRAAAAYAQKQNQQ-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	ESAISRALALAEVDDKAPAKNLSGGER-----
GL50803_11099_Protein_21.1_	EWMARATKSMLEAVKALQAELLKEQSQRKYQDISSILSNEKQSYETM
GL50803_103818_hypothetical_	DTYITITLNRVSEEVKTYKKRALDAQIATLDIQKLEIEYFP--ERNYAIL
GL50803_14790_hypothetical_p	AKKTFDFSPPTFMMRGPGRKMKVIDRNR-----
Iron_regulatory_protein-1A_	DSSADGSKILYPDSVVGTDSTHTMINGLG-----
GL50803_86821_Protein_21.1_	-----TIHFLF
GL50803_16220_Protein_21.1_	-----PIVLIL
GL50803_11099_Protein_21.1_	DTKLRSLTEQLKTQEKQLCEKEEIIARLTTELTAATQASGQMVHPISLTL
GL50803_103818_hypothetical_	ENFRSLSPRTVMLRRSDFQELIRLFLKESQPQLSIQEAETLVRKTLVHL
GL50803_14790_hypothetical_p	-----TKSLLD
Iron_regulatory_protein-1A_	-----VLGWG
GL50803_86821_Protein_21.1_	KGIENAVPETRPVPSIT-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	CELFNINPRSIASPEIDDLQYYARGNASTLTPDCVDIGSAITGISALSER
GL50803_11099_Protein_21.1_	TSNAVETPNMSEEAQIKDNLAASADAESICKQMLSEYSILKSNLLTLGLE
GL50803_103818_hypothetical_	NELLVANGSPGPLPPNNILDITAAALPETVVHKNLQHSVAVIKLGTKTSEAQ
GL50803_14790_hypothetical_p	RGLLASHEGLTEEDR-----
Iron_regulatory_protein-1A_	GGIEAEAVMLGQSSISMLLPEVIGYRLEGKLGPLATSTDLVLTITKHLRQL
GL50803_86821_Protein_21.1_	-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	NSVAFSDALGLFLPDEYGPAARGSV-----ANLPPTGPVQGNPG
GL50803_11099_Protein_21.1_	SSIIISQNFQKVSVLTEIASTEIQTLRRSCLDAIAEAEAIRDRLSVQNER
GL50803_103818_hypothetical_	NRLAYYTALVPKPIIPVMNYAYFEPLTNSLCLSQKLEPNEDGVVLRLE
GL50803_14790_hypothetical_p	-----R
Iron_regulatory_protein-1A_	GVVGKVFVYGPVVAELSIADRATISNMCEYGATVGYFPIDENTLSYMR
GL50803_86821_Protein_21.1_	-PRHPKIMRPAAS-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	SPGHPQSPR-LLS-----
GL50803_11099_Protein_21.1_	DALNTEQLQQLKQS-----
GL50803_103818_hypothetical_	NTNELVLKQSLRNLIQYLLRHLQELCRLLDIPYDPISVLSTVVPSYVEW
GL50803_14790_hypothetical_p	LIAGPDIERCLMS-----
Iron_regulatory_protein-1A_	QTRNSEKKIDIIR-----
GL50803_86821_Protein_21.1_	-----APVVKRTKIEEY
GL50803_16220_Protein_21.1_	-----QPEYDANISSF
GL50803_11099_Protein_21.1_	-----ITLLRQTAAESD
GL50803_103818_hypothetical_	RNALEQFSPVSAPSELADPALVYSICYADSPASFNEFLHGKDGHNQES
GL50803_14790_hypothetical_p	-----PRASEFITYAY
Iron_regulatory_protein-1A_	-----KYLKATRQLRDY
GL50803_86821_Protein_21.1_	FAKKAGVLGQLTQGLQVP-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	NRKFPPTNPTRVSLQIPGTYGPISTGIYEKTLNRPPLSISGLKAMQSD
GL50803_11099_Protein_21.1_	TKQDPTHQPDVQEPSIECCTSDLIPLAAHNDVETRMIDTMTIYSYLEEE
GL50803_103818_hypothetical_	ASTGQPSYRISPHRVRKPNPISQFIDFIIETVTEACVATYRQVAEFANSK
GL50803_14790_hypothetical_p	KRVCNPLEHINDDIPSS-----
Iron_regulatory_protein-1A_	SLVDQDPQYTESVTLDLSTVVTSVSGPKRXPDRVSVSSMCEDFKSCLISP

GL50803_86821_Protein_21.1_ GL50803_16220_Protein_21.1_ GL50803_11099_Protein_21.1_ GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	-----QSIVKR TENSVIDTANILDITLLKKEYSKAIMECERLRK-----EVQHQLRLARL EGKAAAADDACSLTKLIEQLADHGVQVECVGPGVHLRVVDPTRLSILLQ VNCQTAGSSDDNLARSSLYLDNGEPYLVSSQQHALDSSLSRDPQGSRTK -----KRLTTTR VGFKGFAIPPSALAASGEFQWDDGKSYKIGHGSSVIAAITSCTNTSNPSV
GL50803_86821_Protein_21.1_ GL50803_16220_Protein_21.1_ GL50803_11099_Protein_21.1_ GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	AASKSATRTVSKKPEGCTTCTEEVQHAP----- HAVNATVQAVPTRREAIIVQTCNEAPDAPASQEDGV----- EALQQPGASVLYPSEFSVANFHQLERQAEPNART----- QRDSSSSRISPAVNPVLEAQCSEDDKSNHTVELEGLEPIMEENRGAS EGHRGISSTSNHGSHLYQDVCGLYSTYPHVAHPKQ----- MLGAGLLAKNAVQKGLSILPYIKTSLSPGSGVVTYL-----
GL50803_86821_Protein_21.1_ GL50803_16220_Protein_21.1_ GL50803_11099_Protein_21.1_ GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	----- ----- ----- VSSCTNDMSLASLLVADSQWIYFSSDSIPCLMAQLGPVAPLKPESYKDF ----- -----
GL50803_86821_Protein_21.1_ GL50803_16220_Protein_21.1_ GL50803_11099_Protein_21.1_ GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	-----QVSLE -----YQQDLAAAKVTPSTTRELVAIV--LALRKEVE -----EEIQALQPQPQPSQSQSGAELEGLSLAEAQTLI TRYHCDAIRNDQKQKGPASSAAKDKGSAIQVDPAITPEDLAELNLE -----SIRPP -----ESGVIPYLEQLGFDIVGYGCMTCIGNSGP
GL50803_86821_Protein_21.1_ GL50803_16220_Protein_21.1_ GL50803_11099_Protein_21.1_ GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	HNSKDITNTSP-----SSSGEAQGWLQRSWGTATVSM VKNKLLTLGSPGKASQSTIDCMATALRRQTEASKAQRQAMQAKNEQLAQ ARLTEELLEKDKAIAELNQCLAQIPLADCVDISDRKEGVGNMERVACIL LALSILFELYGDEPSAFILNSLLGFLNSDYEDLIDEEESYSKQKHPVTQL ANLMKALWNQP-----LTPTRTRDREYIRMATLQPPET LDENVVNTIEKNGLVCCGVLSGNNRFEGRIHPNTRANYLASPLLVIAIAYI
GL50803_86821_Protein_21.1_ GL50803_16220_Protein_21.1_ GL50803_11099_Protein_21.1_ GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	FYRGLSKTRRALLRVFSRRAET-----ATAISSSVSNTLSV----- LHIALQKREQQIRSIQIAAQAYN-----KTHQSHIDVPTDLPTDREPV YQRALCERDKVLRDIEESKESADNP--YIVSFVTQRKLNLSIIPCEETLL RLSGLKKHKVKSISVAVYYAQTAGKGSHTYLNYSQKNASLISRLREAI HYKHLKHERSPSGLTFEMLK-----YVPQNEIEYNI FNVYRWR AGRVDIDFIEIPLGVDSNGKEVFLRDIWPTRSEIQEVEHKHVIPAMQEV
GL50803_86821_Protein_21.1_ GL50803_16220_Protein_21.1_ GL50803_11099_Protein_21.1_ GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	----- ATTFAPSLPETGVSTETYVK-----LSKENSEL TQQVK----- RELFSKACL RHDLHEDADG-----IWL EVLEV TIQARNYHLS SASCVEGLRKDSSVSGVKGKDSKQREQMPTTVVVEASAFSKSQYGRINST ----- YSKIQLGSRDWQTLEVS DSKLYPWEISTYIKLPPFFEGMTRALPKL KGI
GL50803_86821_Protein_21.1_ GL50803_16220_Protein_21.1_ GL50803_11099_Protein_21.1_ GL50803_103818_hypothetical_ GL50803_14790_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-1A_	----- QLKREVSSLKSKLGLTQDPSR--VTEDGVGRAQLSPLILLQIENIKLKK- YLRSKLVRVSNVLDHCNRGA--TLHGFVPMNNLAAYVLLAPRLSNIRD- PQRLSKTVFADFIKAKAQTSF--SIHPNYSLRNYSTFYLTPNDKSSISS PTWHDLKGWDPHPLPSIADL--SIENIASIEPQATRHTVDINTMKTSAE EKARCLLLLGDVSTTDHISPAGSIARKSPAARYLSERGLTPRFNSYGS-

GL50803_86821_Protein_21.1_	-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	-----QLNDKVKLLSNQENHI-----
GL50803_11099_Protein_21.1_	-----QNGRTALMVAEELDQLDIVRVLLP
GL50803_103818_hypothetical_	PLQRRIDFYRMWASLFVQPESDLGTGDYADHFVMLSETEENISRIEVVSG
GL50803_14790_hypothetical_p	-----
Iron_regulatory_protein-1A_	-----RRGNDAVMARGTFANIRLVNKLAS
GL50803_86821_Protein_21.1_	-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	-----
GL50803_11099_Protein_21.1_	YEAGAQTSGKHTALMMAAQLGYLRIVQELSPLAEHILDQRGRSAIYYATD
GL50803_103818_hypothetical_	KDSGDGLGPLTTAIPMTAKLNILFGDKSVGIKQYTLTYILSDCSVFVDT
GL50803_14790_hypothetical_p	-----
Iron_regulatory_protein-1A_	KTGPSTLHVPSGEEMDVFDAAERYASEGTPLVLVVGKDYGSGSSRDWAAK
GL50803_86821_Protein_21.1_	-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	-----
GL50803_11099_Protein_21.1_	GSVYKDVNLSERIEVIQGHVHSNNL-----
GL50803_103818_hypothetical_	SALQEPVPIPAHLTPEETERPANESSGNPSRTQSRSGARGSVKTV DANPV
GL50803_14790_hypothetical_p	-----
Iron_regulatory_protein-1A_	GPFLLGKAVIAESYERIHRSNLVGMGIPLQLPQGASDTLKLSGREVY
GL50803_86821_Protein_21.1_	-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	-----
GL50803_11099_Protein_21.1_	-----
GL50803_103818_hypothetical_	ASSLVESSSSQNPAQP EPERALMCRIALEEDLLYTKRPDLARFALIAEFC
GL50803_14790_hypothetical_p	-----
Iron_regulatory_protein-1A_	NIVLPEGELKPGQRIQVDADGNVFETTLLRFDTEVDITYYKNGGILNYMIR
GL50803_86821_Protein_21.1_	-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	-----
GL50803_11099_Protein_21.1_	-----
GL50803_103818_hypothetical_	GALTPSRSTACNTDHI EFAMYS DGSCNVQCNGI VLVDLTFAENNESKIQ
GL50803_14790_hypothetical_p	-----
Iron_regulatory_protein-1A_	KMLD-----
GL50803_86821_Protein_21.1_	-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	-----
GL50803_11099_Protein_21.1_	-----
GL50803_103818_hypothetical_	VTAHEKLS SPNDSIDTL PNFISNIIYEIIGFLTEYGAAKSQSRHSTTSEK
GL50803_14790_hypothetical_p	-----
Iron_regulatory_protein-1A_	-----
GL50803_86821_Protein_21.1_	-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	-----
GL50803_11099_Protein_21.1_	-----
GL50803_103818_hypothetical_	YSTRQDCNVKHSSAPFLFGDEVERSEISM EYARLVPNIASVVLARVPDDL
GL50803_14790_hypothetical_p	-----
Iron_regulatory_protein-1A_	-----
GL50803_86821_Protein_21.1_	-----
GL50803_16220_Protein_21.1_	-----
GL50803_11099_Protein_21.1_	-----
GL50803_103818_hypothetical_	FSDSAYSNETHVLLIELPIFN T FIVRFLVSKSTLFLLSNGDAVFIEGSYL
GL50803_14790_hypothetical_p	-----
Iron_regulatory_protein-1A_	-----

GL50803_86821_Protein_21.1_ [-----
GL50803_16220_Protein_21.1_ [-----
GL50803_11099_Protein_21.1_ [-----
GL50803_103818_hypothetical_ [-----
GL50803_14790_hypothetical_p [-----
Iron_regulatory_protein-1A_ [-----
HLFRSDTAFLSILQVRSSPSTCLVPTQGGSSAIPVYSSPLVLYASQGFPP

GL50803_86821_Protein_21.1_ [-----
GL50803_16220_Protein_21.1_ [-----
GL50803_11099_Protein_21.1_ [-----
GL50803_103818_hypothetical_ [-----
GL50803_14790_hypothetical_p [-----
Iron_regulatory_protein-1A_ [-----
WNVFFEQRKKWLVTRKIPERINFNPKSRPHLGQHNIERESMALKDTLTLA

GL50803_86821_Protein_21.1_ [-----
GL50803_16220_Protein_21.1_ [-----
GL50803_11099_Protein_21.1_ [-----
GL50803_103818_hypothetical_ [-----
GL50803_14790_hypothetical_p [-----
Iron_regulatory_protein-1A_ [-----
RQMCNLAQKEYSEFPAVYPCYLDIFGTESVWRMHAEFVTGTDSDVVVPLR

GL50803_86821_Protein_21.1_ [-----
GL50803_16220_Protein_21.1_ [-----
GL50803_11099_Protein_21.1_ [-----
GL50803_103818_hypothetical_ [-----
GL50803_14790_hypothetical_p [-----
Iron_regulatory_protein-1A_ [-----
GVTRFLLGSPEVHAPDCRGHSISPYPPSLSLLDWTGNITFCRLGCTFEPK

GL50803_86821_Protein_21.1_ [-----
GL50803_16220_Protein_21.1_ [-----
GL50803_11099_Protein_21.1_ [-----
GL50803_103818_hypothetical_ [-----
GL50803_14790_hypothetical_p [-----
Iron_regulatory_protein-1A_ [-----
ITKFVTLTESVQQPERSLSKEKGASRKETSSTGTQSSKKTTSKEPPRVATD

GL50803_86821_Protein_21.1_ [-----
GL50803_16220_Protein_21.1_ [-----
GL50803_11099_Protein_21.1_ [-----
GL50803_103818_hypothetical_ [-----
GL50803_14790_hypothetical_p [-----
Iron_regulatory_protein-1A_ [-----
TNTSAEQSQDVASDALAKPPCTIVEKKLDCFNSVRPFLPPVIPPVKVQAD

GL50803_86821_Protein_21.1_ [-----
GL50803_16220_Protein_21.1_ [-----
GL50803_11099_Protein_21.1_ [-----
GL50803_103818_hypothetical_ [-----
GL50803_14790_hypothetical_p [-----
Iron_regulatory_protein-1A_ [-----
VVVELERVLQEREDKAMQRILKREQALNDVLEKQSVESAPRKDAKEKSPK

GL50803_86821_Protein_21.1_ [-----
GL50803_16220_Protein_21.1_ [-----
GL50803_11099_Protein_21.1_ [-----
GL50803_103818_hypothetical_ [-----
GL50803_14790_hypothetical_p [-----
Iron_regulatory_protein-1A_ [-----
KSNKDTNKPETTLKEEPLNDAPLEVHREIVDILSEVNPPIKTYSALQLFF

GL50803_86821_Protein_21.1_[-
GL50803_16220_Protein_21.1_[-
GL50803_11099_Protein_21.1_[-
GL50803_103818_hypothetical_[-
GL50803_14790_hypothetical_p
Iron_regulatory_protein-1A_[-

KHFSDISRQKMEQEAMAVAQSSAKGKDLKNQVEPAFVSIPKVSSVYLSR

GL50803_86821_Protein_21.1_[-
GL50803_16220_Protein_21.1_[-
GL50803_11099_Protein_21.1_[-
GL50803_103818_hypothetical_[-
GL50803_14790_hypothetical_p
Iron_regulatory_protein-1A_[-

QEHPQTAEGLLDDCMQDPNGIPLCCPIISPRYFIYPISPDLRNALSYSV

GL50803_86821_Protein_21.1_[-
GL50803_16220_Protein_21.1_[-
GL50803_11099_Protein_21.1_[-
GL50803_103818_hypothetical_[-
GL50803_14790_hypothetical_p
Iron_regulatory_protein-1A_[-

EDECMGYLRNCEPWVCLHDADISYLRVIGMLHQLIDSSNYTAISSRSSQA

GL50803_86821_Protein_21.1_[-
GL50803_16220_Protein_21.1_[-
GL50803_11099_Protein_21.1_[-
GL50803_103818_hypothetical_[-
GL50803_14790_hypothetical_p
Iron_regulatory_protein-1A_[-

YFKISTTSKLSCLPRYLFSLPLSSIVCQILNTMRSALAFNLPM TSALED

GL50803_86821_Protein_21.1_[-
GL50803_16220_Protein_21.1_[-
GL50803_11099_Protein_21.1_[-
GL50803_103818_hypothetical_[-
GL50803_14790_hypothetical_p
Iron_regulatory_protein-1A_[-

SPCDASTLSTTSRGKAGAKGVITRGGTHATVAQGIVLPPKLGKSAWETG

GL50803_86821_Protein_21.1_[-
GL50803_16220_Protein_21.1_[-
GL50803_11099_Protein_21.1_[-
GL50803_103818_hypothetical_[-
GL50803_14790_hypothetical_p
Iron_regulatory_protein-1A_[-

ASDPSPLHVPFGERFLSLFDPNSPYLLHPGDKYAANVVEFIELHSFLTGG

GL50803_86821_Protein_21.1_[-
GL50803_16220_Protein_21.1_[-
GL50803_11099_Protein_21.1_[-
GL50803_103818_hypothetical_[-
GL50803_14790_hypothetical_p
Iron_regulatory_protein-1A_[-

DLLCYQHLEQTKLNWKL SAAQRDIVIQSYQKMETTGIALGKALTSVIAIL

GL50803_86821_Protein_21.1_[-
GL50803_16220_Protein_21.1_[-
GL50803_11099_Protein_21.1_[-
GL50803_103818_hypothetical_[-
GL50803_14790_hypothetical_p
Iron_regulatory_protein-1A_[-

KKEKRQREREAMRELEQQEELARQMALFAEQHVR SNEEEKNEVSYDYSVD


```

GL50803_86821_Protein_21.1_[] -----
GL50803_16220_Protein_21.1_[] -----
GL50803_11099_Protein_21.1_[] -----
GL50803_103818_hypothetical_[] KPTKSARPRKHMNTKKPVDMALPKIANISPPPLDWKRQFNDEDLDVEYAA
GL50803_14790_hypothetical_p[] -----
Iron_regulatory_protein-1A_[] -----

GL50803_86821_Protein_21.1_[] -----
GL50803_16220_Protein_21.1_[] -----
GL50803_11099_Protein_21.1_[] -----
GL50803_103818_hypothetical_[] LSVDELRRKSYVEKYPLLKYVPADIDPREKAMSSKMLAHQTIIQSTSGSS
GL50803_14790_hypothetical_p[] -----
Iron_regulatory_protein-1A_[] -----

GL50803_86821_Protein_21.1_[] -----
GL50803_16220_Protein_21.1_[] -----
GL50803_11099_Protein_21.1_[] -----
GL50803_103818_hypothetical_[] VLGSSKNNPTILRAIPTKINIRQKTFNVLLKNLSEDLISVSLTYDCNILN
GL50803_14790_hypothetical_p[] -----
Iron_regulatory_protein-1A_[] -----

GL50803_86821_Protein_21.1_[] -----
GL50803_16220_Protein_21.1_[] -----
GL50803_11099_Protein_21.1_[] -----
GL50803_103818_hypothetical_[] LSEPTGPLTLSPQTSIDLHFEVKLHRPTEIVVKGETLAGNSDSIVVSCVG
GL50803_14790_hypothetical_p[] -----
Iron_regulatory_protein-1A_[] -----

GL50803_86821_Protein_21.1_[] -----
GL50803_16220_Protein_21.1_[] -----
GL50803_11099_Protein_21.1_[] -----
GL50803_103818_hypothetical_[] KIMPTSTSSHGLR
GL50803_14790_hypothetical_p[] -----
Iron_regulatory_protein-1A_[] -----

```

Fig 27. Alineamiento Múltiple en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1A de *D. melanogaster* y las secuencias IRP-like GL50803_103818, GL50803_14790, GL50803_11099, GL50803_16220, GL50803_86821 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

De igual modo, con la proteína reguladora de hierro 1B de *D. melanogaster* cuyo número de acceso es CAA11212.1 obtuvimos el 27% de identidad con la secuencia GL50803_93551 anotado como una metaloproteasa de la familia de la insulinasa; este grupo de proteasas contienen Zn como grupo prostético y juegan papeles importantes en muchos procesos biológicos de la regulación de proteínas para la señalización celular (Rascón y col, 2013), además se obtuvo el 32% de identidad con la secuencia GL50803_11389 anotado como una proteína 21.1 (Figura 28). Primero se realizó un alineamiento entre la proteína reguladora de hierro 1B de *D. melanogaster* y la secuencia del gen GL50803_93551 de *G. duodenalis* (Figura 29). Posteriormente alineamos la proteína reguladora de hierro 1B de *D. melanogaster* con la secuencia GL50803_11389 de *G. duodenalis* (Figura 30). Ambos alineamientos muestran la mayoría de los aminoácidos idénticos o fuertemente conservados. Finalmente se realizó un alineamiento múltiple en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1B de *D. melanogaster* y las secuencias GL50803_93551, GL50803_11389 de *G. duodenalis* (Figura 31) en el cual se mantienen alineados la mayoría de los aminoácidos.

```

>GL50803_93551 | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
  product=Metalloprotease, insulinase family |
  location=GLCHR04:2303667-2307068(-) | length=1133 |
  sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
  Length = 1133

Score = 32.0 bits (71), Expect = 0.58, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 44/162 (27%), Positives = 64/162 (39%), Gaps = 21/162 (12%)

>GL50803_11389 | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
  product=Protein 21.1 |
  location=GLCHR02:130653-133343(+) | length=896 |
  sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
  Length = 896

Score = 30.0 bits (66), Expect = 2.3, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 19/59 (32%), Positives = 29/59 (49%), Gaps = 7/59 (11%)

```

Fig 28. Descripción de las secuencias obtenidas del proteoma de *G. duodenalis*, utilizando como sonda la secuencia de la proteína reguladora de hierro 1B de *D. melanogaster*.

GL50803_93551_Metalloproteas Iron_regulatory_protein-1B_
 MPPPIGVSISGFTVVRTVEQIPEIDCSLIELEHKLTGFRAIKLTPLQASY
 -----MSGANPFAQFEKT-----FSQAGTTYKYFDLASIDSKY
 : ** . . . * : : : * : : . * : : : . *

GL50803_93551_Metalloproteas Iron_regulatory_protein-1B_
 PEFASISIGFCTPPTSDTGLPHILSRSVLCGSDRYPLPDPFGQLLQGLSKT
 DQLPYSI-----RVLLESAVRNCDFHILEKDVQSILG----
 : : . * : : * . * : . * . : : : * : *

GL50803_93551_Metalloproteas Iron_regulatory_protein-1B_
 YLNAGTYDTFTLYPFASRCEKDYLNIMAIYLDVAVFCALLHDKRVFHQEA

GL50803_93551_Metalloproteas Iron_regulatory_protein-1B_
 WSMHLMNSTSELELRGAINELTVAFS-EPIHIAVHALKQALFDGGLSMY
 WSPALKQGSNDVEVSFKPARVILQDFTGVPVAVDFAAAMRDAVLDLG----
 ** * . . . : * : . : * : * : . . * : : * *

GL50803_93551_Metalloproteas Iron_regulatory_protein-1B_
 TSIGHPDHIVTLEPDDLVEYHSTHYTMANGRIAYHSTLPLEKELSLIYDR
 ---GDPEKINPICPADLVIDHSVQVDFAR-----APDALAKNQSLFER
 * . * : * : * * * * : : * . : . * * : * * : *

GL50803_93551_Metalloproteas Iron_regulatory_protein-1B_
 YLQPLESMSSEELAPYIVKKAPILAGALPINACIEPLRLSYPIAKESQVG
 NKE-----
 ;

GL50803_93551_Metalloproteas Iron_regulatory_protein-1B_
 FRQGYLVRMWRTFNINEVTRTERLALDITLSGILFGATSSPVLHLQKLG
 -RFTFLKWKAKAFNN-----MLIVPPGSGIVHQVNLEY
 * : * : : * : : : : : : : : : : : : : : : * : *

GL50803_93551_Metalloproteas Iron_regulatory_protein-1B_
 ISELSVETDDTNCQGYTYICLHGCEYDEDESTRLRRELDRVFLLENENS
 LARVVFENDATDGS---KILYPDSVVGTDSSHMMINGLG---VLGWGVGG
 : : : . * * : . * . . * * : : . * : * . . .

GL50803_93551_Metalloproteas Iron_regulatory_protein-1B_
 TRTEQDPLSDYMFYLSPTRISSEMDRLEFELREHQTNYGKVLTSLFGSW
 IEAEAVMLGQSI SMLLPEVIG---YKLEGLSPLVTTTDLVLTITKHLRQ
 . * * : : * * * . : * * : * * . : : : :

GL50803_93551_Metalloproteas Iron_regulatory_protein-1B_
 FYNVTPEEELLFEG-AFLELREKIAEGTISVYMRELLRYYIDNKAWKDA
 LGVVGKVFYFGPVAELSIADRATISNMCPEYGATVGYFPIDENTLGYM
 : * * : * * * : : : : : : : : : : : : : : : : :

GL50803_93551_Metalloproteas Iron_regulatory_protein-1B_
 ILTPTPLAEDIAEAKQRELQDKKSMSEKEINGLVAQTLAVLNRSNEVD
 KQTNRSEKKIDIRQYLKATQQLRNYADAADPKFTQISITLDLSTVVTSV
 * . * * . : * : . . : : . . *

GL50803_93551_Metalloproteas Iron_regulatory_protein-1B_
 EKVLREFPQVSEADLVSEDDYLQLRIFSRSLSKHNSPGVHLNDVPINVY
 SGPKRPHDRVSVSDMPEDFKSCLSSPVGFKGFAIAPEAQSAFGEFQWDDG
 . * . : * * * : . . * . : : : : . . : : . :

GL50803_93551_Metalloproteas Iron_regulatory_protein-1B_
 NTGSLNGIVHFSMFIDVSELVTFEEAPLISFLAGAMLGNVSTENYESPE
 KTYKLHGGSVVIAAITSCNTS----NPSVMLGAGLLAKKAVEKGLSILP
 : * . * * * : : : . : : * : : * * : : . . .

GL50803_93551_Metalloproteas Iron_regulatory_protein-1B_
 QLQLAISNVLGKFRVSMERYSTVHTLNASETYPRAYIRIDASFLSKTD
 YIKTSLSPGSG---VVTYYLKESGVIPLYLEKLGFDIVGYGCMTCIGNSG
 : : : * * : * . : : * . :

GL50803_93551_Metalloproteas Iron_regulatory_protein-1B_
 QALHLILSEIWQKSMVGLGNLELVFKILHSHKEQMESHFLQKMGYYIAYT
 PLEENVVTQSKKTGLVCARVLSGNRNFEGRIHPNTRANYLASPLLVIAY-
 . : : : : : : * * . : : : : : : * . * *

GL50803_93551_Metalloproteas Iron_regulatory_protein-1B_
 RAMALSGSIGAIYDEYVNGINYLEYKKTLLLEPPADSEISSANGLDFDEE
 ---AIAGRVDIDFEKEPLGVDANGKNVFLQDIWPTREIQ-----EVENK
 * : * . . : : * : : * : * * . : : :

GL50803_93551_Metalloproteas Iron_regulatory_protein-1B_
 CIKHNVTLTDDDLKIAIVMSRKLKNMYARLLQRHTSIAVCIGLNVPPEL
 HVIPAMFQEVYSKIELGSQDWQLQVSEGLFWSADSTYIK-----RP
 : : : . . . : : : : * : * : : :

```

GL50803_93551_Metalloproteas      PFMNKRIITSNTQAVVDKIINGLLIVQKLQAIHDKYSTHTYDINKWNMK
Iron_regulatory_protein-1B_[      PPFEG-----MTRDLPKLSIQKARCLLFLGDXVTTDHIS----P
**::                               : : : * :** :.:. . * .*.

GL50803_93551_Metalloproteas      PDIFPITEHAAHFLTTPVKLHKKDLCPPEKDSQRFLKMEQDIQHRMLSVA
Iron_regulatory_protein-1B_[      AGSIAXTSPAARFLSE-----RNITPRDFNSYGSRRGNDAIMSRGTFAN
.. :. * .**:**:                ::: * : :* : : : * * .

GL50803_93551_Metalloproteas      APVNVNYVARSGRPLPLTELTGAELLLLHIITYDYLAKKIRIENGACGCF
Iron_regulatory_protein-1B_[      IRLVNKLVEKTG-PPTVHIPSQEELDIFDAAERYREEGTPLVLVVGKDYG
: : * : * * * .. * * . : : * : : : . :

GL50803_93551_Metalloproteas      ILSRSRWSYLTTYLDPQLVETKKVFDEIKEYIDRLTLTAEELFFKIGAV
Iron_regulatory_protein-1B_[      SGSSRDWAAKG----PFLLGKAVIAESYERIHRSNMVGMGIIPX-----
* * : * * : * * : * * * * * * * .. : :

GL50803_93551_Metalloproteas      GKRQMDLAPLVRFTQAVDYWLEGNVNDYRRVAVGQIRRMTINDLKSAAVS
Iron_regulatory_protein-1B_[      -----QFLPGQSAETLNL TGREVNIALPESGLKPGQKIQVEADGTV
: : . * * * . * : . . : : : : : .

GL50803_93551_Metalloproteas      FEAVISGQTVVFGKADDVRQAAEEGIILGCQYKI-
Iron_regulatory_protein-1B_[      FETILR-----FDTEVDITYYKNGGILNYMIRKMLS
**::: *.. * : : ** : . :

```

Fig 29. Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1B de *D. melanogaster* y la secuencia IRP-like GL50803_93551 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

GL50803_11389_Protein_21.1_
 Iron_regulatory_protein-1B_
 MAAGLNGEERGDALIRAAKANNLRVMA^TFPEDACKTDHTGRTALSWAT
 -MSGANPFAQFEKTF^SQAGTTYKY-FDLASIDSKYDQLPYSIRVLL^SAV
 . * * : : : : * : : : : : * : : : : * . * . * .

GL50803_11389_Protein_21.1_
 Iron_regulatory_protein-1B_
 ERGYVNVIRYL^IHKEARIVDRKGV^TTALMIAVKRQNI^SCVMSLYAYESG^FQ
 RN--CDNFHILEKDVQ^SILGWSPALKQGSNDVEVSFKPARVILQDFT^GVP
 .. : : * : . * : : : * .

GL50803_11389_Protein_21.1_
 Iron_regulatory_protein-1B_
 DNHGWSALHWAVFYGCANIVQYLAPLEAGLITNNGTTALMCAAQKGYANI
 AVVDF^AAMRD^AVDL^DGGDPEKINPICADLV^IDHSVQVDFARAPDALAKN
 . : * : : * : . : : . * : * : : . . . * . * . * .

GL50803_11389_Protein_21.1_
 Iron_regulatory_protein-1B_
 IPYLLAAGREL^RMVDN^LKK^SALIYAVEAG-----HEDIVQ^LLAEKEAGI
 QSL^EFERNK^ERFTFLK^WGAKA^FN^NMLIVPPGSGIV^HQV^NL^EYLARVVFEN
 . : : * . : . * : : . * : : * .

GL50803_11389_Protein_21.1_
 Iron_regulatory_protein-1B_
 TDMLGRSALMYAVINKRPACV^SILAPYEAGIVSSEGMTALMYAVQ^QHEWH
 DATD^GSKILY^PD^SVVGTDSHTT^MINGLGV^LGWGVG^GIEAEAVMLQ^SSISM
 * . * : : : : . . * : * : *

GL50803_11389_Protein_21.1_
 Iron_regulatory_protein-1B_
 IAMILAKQKAELGKQAAKEVTALMLMDAKDPPSEVVLALGDRLIPYEAK
 LLPEVIGYKLEGLK^SPLVTT^DLDL^VLITIKHLRQLGVV^GKFVEFYGP^GVAE
 : : * * . . * * * : : * * : : * * :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 Iron_regulatory_protein-1B_
 L^SD^SAGNTALMRAAMRGDIK^MVERLV^THEAGM^QSLAGKTAMMLASHAGHD
 L^SIADRATISNMCPEYGATVGYFPIDENTLGYMKQ^TNRSEKKID^IIRQYL
 * * : * . . * : : * . : : : : :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 Iron_regulatory_protein-1B_
 EIVRLLS^PIEKGLVDAMGR^TALMYATRANNDNVIRYLIP^FESRMTDFY^GK
 KATQQLRNYADAAQDPKFTQ^SITLDLSTVVT^SVSGPKRPHDRVSVSD^MPE
 : . : * . . * . : : : . * * * : . . :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 Iron_regulatory_protein-1B_
 TALMCAA^KNNYMPILKFLASKECKIKD^HKGR^TALMRAAASGHIESV^AFLA
 DFKSCLSSPVGFKGFAI^APEAQS^AFG^EFQWDDGKTYKLH^HGSV^VIAAITS
 * : . : : : . . : : : . * : . * : :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 Iron_regulatory_protein-1B_
 RYESQLQSEGLTALMFAAVNGHSTVARVLAKTEAGMRDSTGR^TALL^S-
 --CTNTSNPSVMLGAGLLAKKAVEKGLSILPYIK^TSLSPGSGVVTY^YLKE
 : : . * : . : * : . . * : : : : * : : * .

GL50803_11389_Protein_21.1_
 Iron_regulatory_protein-1B_
 --LVNNHENVARALLVFEHQLADDQKRTALMYSAQTAFDSVTRSLIALDN
 SGV^IPY^LEK^LGF^DIVGYGCMTCIGNSGPLEENVVTQSKKTGLVCARVLSG
 : : * : : : : : : : . * .

GL50803_11389_Protein_21.1_
 Iron_regulatory_protein-1B_
 LAKRQDDVGR^TALMYAVTSSQRN^AIRALLPKENCMVDKNGRTALMYAARA
 NRNFEGRIHPNTRANYLASPLLVIA^AY^AAGRV^DID^FEKEPLGVDANGKNV
 : : : : : : * : * : : : * : . . .

GL50803_11389_Protein_21.1_
 Iron_regulatory_protein-1B_
 CLSPGPVGLIESEAGIHDNDGLTALMYCCLSKNYSLADLLSTVECMRDK
 FLQDIW^P--TRSEIQEVENKHVIPAMFQEVYKIELGSQDWQTLQVSE^GK
 * . * . * * : * : . * : : : * . . * . * .

GL50803_11389_Protein_21.1_
 Iron_regulatory_protein-1B_
 RG--Q^TALMYAAKEGCKELV^NKLLPHEADM^RDHSGK^TSLIYAVENGHSHL
 LFSWSADSTYIKRPPFFEGMTRDLPK^LQSIQKARCLLFLGDXVTTD^HISP
 : : * : : * : : * : : : : * * . * .

GL50803_11389_Protein_21.1_
 Iron_regulatory_protein-1B_
 VSSLA^SENRLSDKHLQTPYDYAMRLR^CTKSVQSLV^SILTDTSTLVLSASV
 AGS^IAX--TSPAARFLSERNITPRDFNSYGSRRGNDAIMSRG--TFANIRL
 . * * . : : * * : : * : : . . :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 Iron_regulatory_protein-1B_
 CLQFIRNLSPIVSYMLWKSNTLYA^IHAHTLLD^TMSFLFDDLDISLLRS
 VNKLV^EKTP^PTVHIPSQEELDIFDAAERYE^EGTPLVLVVGKDYGSG^S
 : : : : * : : : : : : : : : * . * . * .

GL50803_11389_Protein_21.1_
 Iron_regulatory_protein-1B_
 EEEQRCGESLMHL-CTINDSFMAS^SSSFWLRGEARRRYMHRTRTMEISDA
 RDWAAKGF^PLLG^VKAVIAESYERIHRSNMVGMGIIPXQFLPQ^SAS^ETLLN
 : : * * : : * * : * : : : : * :

```

GL50803_11389_Protein_21.1_[]  SHDSVCAVCLDN----HPNVVFLPCRHMVVCSACLTSMERHCPYCRKYVC
Iron_regulatory_protein-1B_[]  TGREVYNIALPESGLKPGQKIQVEADGTVFETILRFDTEVDITYYKNGGI
                                :  .*  :.*  :      : : : .  * . :      . * . .*  : :

GL50803_11389_Protein_21.1_[]  RHFTINEEDILC
Iron_regulatory_protein-1B_[]  LNYMIR--KMLS
                                : : * .  . : * .

```

Fig 30. Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1B de *D. melanogaster* y la secuencia IRP-like GL50803_11389 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

GL50803_11389_Protein_21.1_
 GL50803_93551_Metalloproteas
 Iron_regulatory_protein-1B_
 -----MAAGLN**GE**ER**GD**TALIRAAKANN-----LRAVMATF
 MPPPIGSVISGFTVVR**TE**Q**IP**E**ID**CS**L**IELEHKL**TG**FRAIK**L**T**PL**Q**AS**
 -----MSGAN**P**FA**Q**F**E**K**T**F**S**Q**A**G**T**TYKYFD---LAS**IDS**SKY
 : . : : : . . * : : : :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 GL50803_93551_Metalloproteas
 Iron_regulatory_protein-1B_
 PEDACKT-----
 PEFSASIGFCTPPTSD**T**GLPHILSR**S**VL**CG**SDRY**PL**DP**PF**Q**LL**Q**GS**L**K**
 D**QL**P**YS**I**R**-----
 : . .

GL50803_11389_Protein_21.1_
 GL50803_93551_Metalloproteas
 Iron_regulatory_protein-1B_
 -----DHTG**R**TAL**S**W**A**T**E**R**G**V**N**I**V**R**Y**L**I**H-----KEAR**I**V**D**R**K**G
 Y**L**NAGTY**D**FT**L**Y**P**FAS**R**CE**K**D**Y**L**N**I**M**A**I**Y**L**DA**V**FC**P**AL**L**H**D**K**R**V**F**H**Q**E**A**
 -----V**L**LES**A**V**R**NC**D**N**F**H**I**-----LE**K**D**V**Q**S**I**L**G
 . : . : : : : : : : : :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 GL50803_93551_Metalloproteas
 Iron_regulatory_protein-1B_
 VTAL**M**I**A**V**K**R**Q**N**I**S**C**V**M**S**L**Y**A**Y**E**S**G**F**Q**-D--NHG**W**S**A**L**H**W**A**V**F**Y**G**-----
 W**S**M**H**L**M**S**N**T**S**E**L**E**L**R**G**A**I**L**N**E**L**T**V**A**F**S-E**P**I**H**I**A**V**H**A**L**K**Q**A**L**F**D**G**G**S**L**M**Y**
 W**S**P**A**L**K**Q**G**S**N**D**V**E**S**F**K**P**A**R**V**I**L**Q**D**F**T**G**V**P**A**V**V**D**F**A**A**M**R**D**A**V**L**D**L**G-----
 : : . : : * : : * : :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 GL50803_93551_Metalloproteas
 Iron_regulatory_protein-1B_
 -CAN**I**V**Q**L**A**P**L**E**A**G-L**I**T**N**N**G**T**T**A**L**M**C**A**A**Q**K**Y**A**N**I**I**P**Y**L**L**A**A**G**R**E**L**R**-
 T**S**I**G**H**P**D**H**I**V**T**L**E**P**D**L**V**E**Y**H**S**T**H**Y**T**M**A**N**G**R**I**A**Y**H**S**T**L**P**L**E**K**E**L**S**L**I**Y**D**R
 ---G**D**P**E**K**I**N**P**I**C**P**A**D**L**V**I**D**H**S**V**Q**V**D**F**A**R**A**P**D**A**L**A**K**N**Q**S**L**E**F**E**R**N**K**E**R**F**T
 . : : : : . * : : . :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 GL50803_93551_Metalloproteas
 Iron_regulatory_protein-1B_
 -----M**V**D**N**L**K**K**S**A**L**I**Y**A**V**E**A**G**H**E**D**I**V**Q**L**L**A**E
 Y**L**Q**P**L**E**S**M**S**E**E**L**A**P**Y**I**V**K**K**A**P**I**L**A**G**A**L**P**I**N**A**C**I**E**P**L**R**L**S**P**I**A**K**E**S**Q**V**G**
 F**L**K**W**G-----A**K**A**F**N**N**M**L**I**V**P**P**G**S**G**V**I**H**Q**V**N**L**E**Y**L**A**R**V**V**F**E**N**D
 : : : : : : : : : :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 GL50803_93551_Metalloproteas
 Iron_regulatory_protein-1B_
 KE**A**G**I**T**D**M**L**G**R**S**A**L**M**Y**A**V**I**N**K**R**P**A**C**V**S**I**L**A**P**Y**E**A**G**I**V**S**S**E**G**M**T**A**L**M**Y**A**V**Q
 F**R**Q**G**Y**L**V**R**M**W**R**T**F**N**I**N**E**V**T**R**T**E**R**L**A**D**T**L**S**G**I**L**F**G**A**T**S**S**P**V**L**A**H**L**Q**K**L**G**L
 A**T**D**G**S**K**I**L**Y**P**D**S**V**V**G**T**S**H**T**T**M**I**N**G**L**G**V**L**G**W**G**V**G**G**I**E**A**E**A**V**M**L**G**Q**S**I**S**M**L
 * : : . : * : * : :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 GL50803_93551_Metalloproteas
 Iron_regulatory_protein-1B_
 Q**H**E**W**-----H**I**A**M**I**L**A**K**Q**K**A**E**L**G**Q**A**A**E**V**T**A**L**M**L**L**M**D**A**K--
 I**S**E**L**S**V**E**T**D**D**T**N**C**Q**G**Y**T**I**C**L**H**G**C**E**Y**D**E**D**S**T**S**R**L**R**R**E**L**D**R**V**F**L**L**E**N**E**N**S**
 L**P**E**V**I**G**-----Y**K**L**E**G**K**L**S**P**L**V**T**T**D**L**V**L**I**T**I**K**H**L**R**Q**L**G---
 * : : : : : : : : :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 GL50803_93551_Metalloproteas
 Iron_regulatory_protein-1B_
 ----D**P**P**S**E**V**V**L**A**L**G**D**R**L**I**P**-----Y**E**A**K**L**S**D**S**A**G**N**T**A**L**M**R**A**A**M**R**--
 T**R**T**E**Q**D**P**L**S**D**Y**M**F**Y**L**S**P**T**R**I**S**S**E**M**D**R**L**E**F**E**L**R**E**H**Q**T**N**Y**G**V**K**V**L**T**S**L**F**G**S**W**
 -----V**V**G**K**F**V**E**F**Y**G**P-----G**V**A**E**L**S**I**A**D**R**--
 . : : . : : : :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 GL50803_93551_Metalloproteas
 Iron_regulatory_protein-1B_
 -----G**D**I**K**M**V**E**R**L**V**T**H**E**A**G**M**Q**S**L**A**G**T**A**M**L**A**S**H**A**G**H**D**E**I**
 F**Y**N**V**T**P**E**E**E**L**L**F**E**G**A**F**L**E**L**R**E**K**I**A**E**G**T**I**S**V**M**R**E**L**L**R**R**Y**I**D**N**K**A**W**K**D**A**I**
 -----A**T**I**S**N**M**C**P**E**Y**G**A**T**V**G**Y**F**P**I**D**E**N**T**L**G**M**K**Q**T**N**R**S**E**K**K
 . : . : . : : :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 GL50803_93551_Metalloproteas
 Iron_regulatory_protein-1B_
 V**R**L**L**S**P**I**E**K**L**G**V**D**A**M**G**R---T**A**L**M**Y**A**T**R**A**N**D**N**V**I**R**Y**L**I**P**F**E**S**R-----
 L**T**P**T**P**G**L**A**E**D**I**A**E**A**K**Q**R**E**L**Q**D**K**S**M**M**S**E**K**E**I**N**G**L**V**A**Q**T**L**A**V**L**N**R**S**N**E**V**D**E
 I**D**I**R**Q**Y**L**K**A**T**Q**Q**L**R**N**Y**A**D**A**A**Q**D**P**K**F**T**Q**S**I**T**L**D**L**S**T**V**T**S**V**S**G**P**K-----
 : : : : : : : : :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 GL50803_93551_Metalloproteas
 Iron_regulatory_protein-1B_
 --M**T**D**F**Y**G**K**T**A**L**M**C**A**A**K**N**Y**M**P**I**L**K**F**L**A**S**-----K**E**C**K**I**K**D**H**K**G**R**T**A**L**
 K**V**L**R**E**F**P**Q**V**S**E**A**D**L**V**S**L**E**D**D**Y**L**Q**L**R**I**F**S**R**S**L**S**K**H**N**S**P**G**V**H**L**N**D**V**P**I**N**V**Y**N**
 ---R**P**H**D**R**V**S**V**S**D**M**P**E**D**F**K**S**C**L**S**S**P**V**G**F**K**G**F**A**I**A**P**E**A**Q**S**A**F**G**E**F**Q**W**D**D**G**K
 . : : . : : : :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 GL50803_93551_Metalloproteas
 Iron_regulatory_protein-1B_
 M**R**A**A**S**G**H**I**E**S**V**A**F**L**A**R**Y**E**S**Q**L**Q**S**E**S**G**L**T**A**L**M**F**A**A**V**N**G-----H**S**T
 T**G**S**L**G**N**G**I**V**H**F**S**M**F**I**D**V**S**E**L**V**T**F**E**E**A**P**L**I**S**F**L**A**G**A**M**L**G**N**V**S**T**E**N**Y**E**S**P**E**Q**
 T**Y**K**L**H**H**G**S**V**V**I**A**A**I**T**S**C**T**N**T**S**N**P**S**V**M**L**G**A**L**L**A**K**K**A**V**E**K**G-----L**S**
 * : : : : : : : :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 GL50803_93551_Metalloproteas
 Iron_regulatory_protein-1B_
 V**A**R**V**L**A**K**T**E**A**G**M**R**D**S**T**G**R**T**A**L**L**S**L**V**N**H**E**N**V**A**R**A**L**L**V**F**E**H**Q**L**A**D**D**Q**K**R**T**
 L**Q**L**A**I**S**N**V**L**G**K**F**R**V**S**M**E**Y**R**Y**S**T**V**H**T**L**N**A**S**E**T**Y**P**R**A**Y**I**R**I**D**A**S**F**L**E**S**K**T**D**Q**
 I**L**P**Y**I**K**T**S**L**S**P**G**S**G**V**W**T**Y**Y**L**K**E**S**G**V**I**P**Y**L**E**K**L**G**F**D**I**V**G**Y**C**M**T**C**I**G**N**S**P**
 : : . : : : * : : : :

GL50803_11389_Protein_21.1_
 GL50803_93551_Metalloproteas
 Iron_regulatory_protein-1B_
 A**L**M**Y**S**A**Q**T**A**F**D**S**V**T**R**S**L---I**A**L**D**N**L**A**K**R**Q**D**D**V**G**R**T**A**L**M**Y**A**V**T**S**S**R**N**A**
 A**L**H**L**I**L**S**E**I**W**Q**K**S**M**V**L**G**N**L**E**L**V**F**K**I**L**H**S**H**K**E**Q**M**E**S**H**F**L**Q**K**M**G**Y**I**A**Y**T**R**
 L**E**E**N**V**V**T**Q**S**K**K**T**G**L**V**C**A**R**---V**L**S**G**N**R**N**F**E**G**R**I**H**P**N**T**R**A**N**Y**L**A**S**P**L**L**V**I**
 . : . : : : : :


```

GL50803_11389_Protein_21.1_[      IRALLPKENCMDK--NGRTALMYAARACLSPGVPLIESEAGIHNDNDGL
GL50803_93551_Metalloproteas    AMALSGSIGAIYDEYVNGINYLEYLKKTLLLEPPADSEISSANGLDFDEEC
Iron_regulatory_protein-1B_[     AYAIAGRVDIDFKEKPLGVDANGKNVFLQDIWPTRSEIQEVENKHVIPAM
      *:      .  ::  *      . . * . . .

GL50803_11389_Protein_21.1_[      TAL-----MYCCLSKNYSLADLLSTEVCMRDK
GL50803_93551_Metalloproteas    IKHNVYTLTDDDLKIAIVMSRKLKNMYARLLQRHTSIAVCIGLNVPELEP
Iron_regulatory_protein-1B_[     FQE-----VYSKIELGSQDWQTLQVSEGLKFSW
      : * . :      : .

GL50803_11389_Protein_21.1_[      RGQTALMYAAKEGCKELVNKLLPHEADMRDHSKGTSLIYAVENGSHLSV
GL50803_93551_Metalloproteas    FMNKRIITSNTQAVVDKIINGLLIVQKLQAIHDKYSTHTYDINKWNMMP
Iron_regulatory_protein-1B_[     SADSTYIK--RPPFFEGMTRDLPKLQSIQKARCLLFLGDVTTDHI SPAG
      :. :      : : . *      : : :      :.

GL50803_11389_Protein_21.1_[      SLASENRLSDKHLQTPYDYAMRLRCT--KSVQSLVSIILTDTST--LVLSA
GL50803_93551_Metalloproteas    DIFPITEHAAHFLTPVKLHKKDLCPPEKDSQRFLKMEQDIQHRMLSVA
Iron_regulatory_protein-1B_[     SIAX-TSPAARFLSE-----RNITPRDFNSYGSRRGNDAIMSRGTFANI
      :. :      : : : *      : . .

GL50803_11389_Protein_21.1_[      SVCLQFIRNLSPIVSYMLWKSNTLYAIIHAHTLLDTLMS-----FL
GL50803_93551_Metalloproteas    PVNVNVARSGRLPLTELTGAELLLHIITYDYLAKKIRIENGACGCFI
Iron_regulatory_protein-1B_[     RLVNKLVEKTGPPTVHIPSQEELDIFDAAERYREEGTP-----L
      : : : . .      : :

GL50803_11389_Protein_21.1_[      FDDLDISLLRSEEEQRCGESLMHLCTIND----SFMASSSSFWRGEAR
GL50803_93551_Metalloproteas    LRSRWSYLTYYLDPQLVETKVFDEIKEYIDRLTLTAEELFFKIGAVG
Iron_regulatory_protein-1B_[     VLVVGKDYGSGSSRDWAAKGPFLGK-----AVIAESYERIHRSNMV
      . .      : :      : : * . .

GL50803_11389_Protein_21.1_[      RRYMHRTRTMEISDASHDSVCAVCLDNHP---NVVFLPCRHMVVCACL
GL50803_93551_Metalloproteas    KRQMDLAPLVRFTQAVDYWLEGNSVNDYRRAVGQIRRMTINDLKSAAVSF
Iron_regulatory_protein-1B_[     GMGIIPXQFLPGQSAETLNLTGREVYNIALPESGLKPGQKIQVEADGTVF
      :      : *      : . : :      : . : . :

GL50803_11389_Protein_21.1_[      TSMERHCPYCRKYVCRHFTINEEDILC-----
GL50803_93551_Metalloproteas    EAVISGQTVVFGKADDVRQAEEGIILGCQEYKI
Iron_regulatory_protein-1B_[     ETILRFDEVDITYYKNGGILNYMIRKMLS----
      : :      .      : *

```

Fig 31. Alineamiento Múltiple en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro 1B de *D. melanogaster* y las secuencias IRP-like GL50803_93551, GL50803_11389 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

Con la proteína reguladora de hierro de *Plasmodium falciparum* cuyo número de acceso es CAB41452.1 obtuvimos el 30% de identidad con la secuencia GL50803_28635, 38% de identidad con GL50803_12174, 38% de identidad con GL50803_17385, 25% de identidad con GL50803_3534; los cuales están anotados como proteínas hipotéticas, y el 23% de identidad con GL50803_9327 el cual está anotado como NEK cinasa; conocidas como reguladores del ciclo celular eucarionte (Chen y col, 2011; Liu y col, 2010; O'Regan y col, 2007; Quarmby y Mahjoub, 2005; Fry, 2002) (Figura 32). Se realizaron diferentes alineamientos, primero por separado entre la IRP de *P. falciparum* y cada una de las secuencias de Giardia (Figuras 33-37) y después un alineamiento múltiple entre la IRP de *P. falciparum* y las cinco secuencias de Giardia (Figura 38). Se realizaron alineamientos por separado para mostrar los sitios conservados de las secuencias de Giardia con las secuencias de las proteínas reguladoras de hierro, así como también realizamos alineamientos por grupos para demostrar si las secuencias anotadas en el genoma con una descripción similar también presentaban homología con las proteínas tipo IRP. Las secuencias que alinearon mejor fueron GL50803_17385 (proteína hipotética) y GL50803_9327 (NEK cinasa).

Finalmente, se alinearon la secuencia de la proteína reguladora de hierro de *P. falciparum* y las secuencias GL50803_12174, GL50803_17385 de *G. duodenalis* (Figura 38), debido a que estas presentaron mayor porcentaje de identidad con la proteína reguladora de hierro de *P. falciparum*. Sin embargo, los alineamientos se observan mejor por separado ya que presentan diferencias en longitud.

```

>GL50803\_28635 | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
  product=hypothetical protein |
  location=GLCHR02:594915-601121(-) | length=2068 |
  sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
  Length = 2068
  Score = 30.0 bits (66), Expect = 2.2, Method: Compositional matrix adjust.
  Identities = 20/65 (30%), Positives = 32/65 (49%), Gaps = 5/65 (7%)

>GL50803\_12174 | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
  product=hypothetical protein |
  location=GLCHR03:1931059-1932204(+) | length=381 |
  sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
  Length = 381
  Score = 28.9 bits (63), Expect = 4.8, Method: Compositional matrix adjust.
  Identities = 14/36 (38%), Positives = 21/36 (58%), Gaps = 2/36 (5%)

>GL50803\_17385 | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
  product=hypothetical protein |
  location=GLCHR02:923585-925849(-) | length=754 |
  sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
  Length = 754
  Score = 28.9 bits (63), Expect = 5.4, Method: Compositional matrix adjust.
  Identities = 17/44 (38%), Positives = 23/44 (52%), Gaps = 1/44 (2%)

>GL50803\_35341 | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
  product=hypothetical protein |
  location=GLCHR02:499865-520684(-) | length=6939 |
  sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
  Length = 6939
  Score = 28.9 bits (63), Expect = 5.7, Method: Compositional matrix adjust.
  Identities = 17/66 (25%), Positives = 29/66 (43%)

>GL50803\_9327 | organism=Giardia_Assemblage_A_isolate_WB |
  product=Kinase, NEK |
  location=GLCHR03:1829978-1832179(-) | length=733 |
  sequence_SO=chromosome | SO=protein_coding
  Length = 733
  Score = 29.6 bits (65), Expect = 3.1, Method: Compositional matrix adjust.
  Identities = 22/94 (23%), Positives = 47/94 (50%), Gaps = 11/94 (11%)

```

Fig 32. Descripción de las secuencias obtenidas del proteoma de *G. duodenalis*, utilizando como sonda la secuencia de la proteína reguladora de hierro de *P. falciparum*.

GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	MTHRANLTGDSITKIQIDLITTPASHTRHSSHRIGSDQSRSVRGKNRVE -----
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	NGMQQASTLEQEINMAILNSRESSRRHKHARPHSKQSRVTTNPHSVPL -----
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	PRHAQSSQPARIQSSRVTHPLACAHYIPNSSLLSSAEASFPGAQSMQDPT -MHFRRCIRKYCINKKIVNPFQHVQRTLNKKNYYYYDINELHDSRIKSLP * : * : . * . . :
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	EAMQRQTEALQREVQHLQLSNMISKSRQLQPGEPSELETQFVEVPAPMP YSIRVLLSAVRNCDNLKVSEKNVETILG----- ::: * : * : * : * : * : * : * : *
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	RLDQNVFSSVEKDLLGSPASNLDLEYGLDTGLDGCVTEHPPKSIQLSPG -----WKENCCKKKEVP-- . * : * . : * *
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	PDDLVELADLVKESSTLEDPIGGPHSIDVLSNVMRHTSRTDLHKPPSI -----FMPTRVLLQDLTGVPCIVDLATMRDTAEKLGCDNER---- : : * : * * * : * : : . . . * : :
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	SVSLSSTVSPITSTMSDLTFSEEQIKEEIAQRNTHLSRLVSTLEPKQYAC -INPLIPVDLVIDHSVQVDYSRREDALELNK-KEYERNLERFKFLKWMG : . * . * . : : * . . : * : : . . * : . : : :
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	PDPLEPQLQPINMTKPPDCYVADISKLSAHGVSVPSTTEPPSVTLTEDL NS-----FKNMLILPPGSGIVHQINLEYLAHCVFN-----KDNL . : : : * . * : * . * * . . : : * :
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	VHATASISPTLSPTLTTMATTMGTPSTSQTVKQDEQLVSPVIATTVTSIR LYPDSVVG---TDSHTTMINGLGLGWGVGGIEAEATMLG----- : : : : : : * * . : * . . : * :
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	KLLPSASEPFIVARRVEKLTQSSDQQGHTIHAPAYS LQHSKSPSGEELV -----
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	VLNTTVEGQLSEVQTTEYPVSGPVLHPPERIPATTPEQSPDSSTSVVAM -----LPI SM T L P E V G I N V V G K L S D * * . * * * . . . : :
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	RFPQRPIILMSTSLARPHSAQPTLNKTYRPLDTSSTSLTASRVARDRLP YLLSTDIVLYITSFLRKEVGVNKYVEFFG-----TGLKDLKLADRATI : . * : : : * : . . . : : * . * . : * *
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	TSTASDIRAQSAYSVRKQLSQTLYSDHLPKMHVFFDPSSSVINEATVPVT SNMAPEYGATVGFPP-----VDDITLEYLLQTGR----DKEKVELI : . * . : * : : * . . . : : * . : : : : : : : * : :
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	RSAVFTSSLCSKEAPQDHSSLFHTTRSRVRENIPDIATLLSITNLSLSP REYLMKN-----SMFNTYKDNVEY--TDVYTLDSLKLNLSL- * . : : . . * : * : * : . . * . * : * * * * * *
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	KTVSFYSLPRKKVESDGDLLNYNTCATYTEAYRLQSQGSQKPHERLRGL -----GPKRPHDNVLLSE * . : * * : : * .
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	PVVQFSTKKSIPITSGDLAAISVTKPRTLRLKQSKTSVWTHTRVSSQILS LHKDFMCLLESPIG---FKGYNIAKE---EREKKISFVCSKDGKEYVLS : * : . * * : . . : * * . . . : * * . . . : * *

GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	TYSSDSVDSFTVHDEIIEKIYDLEREKNAYNIITEEKCKNAQYQHSVY YYNMDGTEKFTILLNDGNIKAQQTIKVQMNQ----- * . * . . . * * : : * * : : : : *
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LSAMSLLDPSVCSLIDNISCETSIAEALHDTLRIGDTNKILSPICVPNF -----
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	EPLSCLHLNEKSPSSASANDSHVDALHESITVKNPLLLLSNICCEEEDKHSL -----KGGKIIIFDVLCRIDTEIE * : : : : : : * . * . .
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	NADCRSPCQPELQATALLKHLENQLSTRKSLECVAYSTHYVFREAGWPS ERYFRN-----GGILKYVLRSLVNEANK----- : * . : : * * : * . : . : .
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	ASATGAINQLSKENDEATSSMNVQLQNVISFLKDRWMAEEDLMAQKLR -----
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	SEKYVARQDLLDELKAKIVDRRRVPELESALSQMHFKEHMILANNVEYY -----
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	GEELERPRRWGFCGSQLPRRKKQADCMVVKIQPQLTKSRKSKTEAGKVST -----
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	RDAGEKKVCKDGSNGLRSKAVDKKARQRTKNLLMGLFKPKDKEATTNMS -----
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	VSHLNRDADSINPINISSPAVTEEPTPSGPKSTVEEMGACQDTQDTCAVL -----
GL50803_28635_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	STADRLLRDIWGGGTGLD -----

Fig 33. Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de *P. falciparum* y la secuencia IRP-like GL50803_28635 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

GL50803_12174_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	----- MHFRRCIRKYCINKKIVNPF EHV QRTLNEKNYYYYDINELHDSRIKSLPY
GL50803_12174_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	----- SIRVLL ESA VNRCDNLK VSE KNVETILG WK ENCKKKKEVPFMPTRVLLQD
GL50803_12174_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	----- LTGVPCIVDLATMRDTAEKLGCAERINPLIPVDLVIDHSVQVDYSRRED
GL50803_12174_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	-----MSAKEFMITW S IDS I VVLLLR-----TLIPYTCLFL ALELNEKKEYERNLERFK FL KG M NS F KNMLILPPGSGIVHQINLEYLAH : :.*.::*: :* * *
GL50803_12174_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	SSLIPPHIPVYDKRMGVIRVFLS W DVEWFLRIAGGGYSTE A R L AFFPALP CVFNKDNLLYPDSVVG T SDSHTT M INGL I LGWG V GGIEA E ATMLGLPISM . : : : * . .* : :* ** .::*: : *
GL50803_12174_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	FLLREIGIKGVLALNGVLR I INAVLQIKLCWHLNR----- TLPEVVG I NVVGKLS D YLLST D IVLYITSFLRKEVGVV N KYVEFFGTGLK * . : ** : * * . * : ** * . : :
GL50803_12174_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	-----LAGEAFTPQTIRK L HFL L IFSP----- DLKLADRATISNMAPEYGA T VG F FPVDDIT L EYLLQTGRDKEKVELIREY * . * * * .::** .
GL50803_12174_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	-----IAVFETVPY T ETLFGCL S VM F LLVYSSMTLYN----- LMKNSMFNTYKDNVEY T DVYTL D LSKLNLSL S GPKRPHDNVLLSELHKDF : : * ** . ** : * : . . : :
GL50803_12174_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	----- TMCLESPIGFKGYNIAKEEREK K ISFVCSKDGKEYVLSQGSVVLCAITSC
GL50803_12174_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	-----KKVQVLGYVALV L IG-----M TNTSNSSSMIAAGLLAK K AIEE F GLKSLPYIKSSLS P SGSKTVQKYLEAGG * : : * : * *
GL50803_12174_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LMGLVRNTAVFHAGY-----FMFG-- LLKYLEQLGFY N VGYGCMTCIGNSGHLDEEVEEVINKNDLIVSSVLSG N R *: : : . . . ** : *
GL50803_12174_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	-----VIFLSRPIG--ELILSGY F LS-----V NFEGRVHPLIKANYL A SPV L VVLSIIGNV N VDLSNYTFNYK G KKINALD : : * ** : : ** * *
GL50803_12174_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LLPLKRRLEQYEMCIPLKNVSKIY S NIQ--NKYWG V GLFNYWKITNLPR LIPRKEEIEEYESTYIKPEMYTEIYK N IKYV N KYW N DIQIKKNKLYEWDK *:* * . : *: * . * : : ** ** : **** . : : * : : :
GL50803_12174_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	--FLVL P STFLC L SYMFTESK-----KWIHS NSTYIHKPPYFENMTLEIEKIQDIK D AHVLLFLGDSITTDHISPAGMIHK : * . * : : : : : ** .
GL50803_12174_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	VCRERNVFPRLTSFKFAVATHAFVLT S IVVFLANVEILPRILLSSCPS-- TSEAYKFLKTKNIK D QDLNTY G ARRGNDEVMIRGTFANIRLINKLCPD G K ... : : . . . * . . * : : . . * : : * .
GL50803_12174_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	-----ILAHVPFNRSTIY M VVLVS-----TLGAG PNTIHIPTNQLMSVYQAAMKYK D NI D VII I IAGKEYGCGSSRDWAAK G PN * : : : . * : : : . : : . : * .

```

GL50803_12174_hypothetical_p      LFGAFLPWT-----
Iron_regulatory_protein-like      LLGVKAVIAESYERIHRSNLIGMSVLP
LQFINNQSPQYYNMDGTEKFTIL
*:*          ;

GL50803_12174_hypothetical_p      -----
Iron_regulatory_protein-like      LNDGNIKAQQTIKVQMNQKGIIFDVL
CRIDTEIEERYFRNGGILKYVL

GL50803_12174_hypothetical_p      -----
Iron_regulatory_protein-like      RSLVNEANK

```

Fig 34. Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de *P. falciparum* y la secuencia IRP-like GL50803_12174 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

GL50803_17385_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like
 -----MISNTDQGLDVALQTR----AAISDLVHHIISAGQ
 MHFRR CIRKYCINKKIVNPF~~FEHV~~QRTLNEKNYYYYDINELHDSRIKSLPY
 * . : : : * : * * . : : * : *

GL50803_17385_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like
 RLRITTPFKAP-----NPRPVILVLGEDYSGKSSLSHITGSRRLRSEG
 SIRVLL~~ESA~~VNRCDNLK~~VSE~~KNVETILGWKENC~~KKK~~KEVPFMPTRVLLQD
 : * : . : * : * : * . : : * : :

GL50803_17385_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like
 MCINIYVPCVNDVAYFTDSLADTLPSIHACFRENGFP~~PGSH~~IRCSAFNSYS
 LTG---VPCIVDLATMRD-TAEKLG~~CD~~AERINPLIPVDLVIDHSVQVDYS
 : * * * : * : * * : * . : . * * . * * :

GL50803_17385_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like
 KQTPGSVLSTDSQSLQ-----SGFHANLSPTGKSMYYSTKST
 RR~~ED~~ALELNEKKEYERNLERFKFLKWGMNSFKNMLILPPGSGIVHQINLE
 : : . * . : : : . . * * : * * . : : . :

GL50803_17385_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like
 AEGTKQLPRG---RDS~~S~~S~~S~~TASRYKDVSSNSATLYNSID--KLEKSVSHL
 YLAHCVFNKDNLLYPDSVVGTD~~SHT~~TINGLILGWGVGGIEAEATMLGL
 . : : . * . : : : . . . * . : : * : : *

GL50803_17385_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like
 PQSN~~NI~~LHGASDQLMGPTCPFI~~EV~~PFYRYVIESSTSKGILSSLSNLS
 PISMTLPEVVGINVVGKLS~~DY~~LLSTDIVLYITSFLR-KEVGVV~~NK~~YVEFF
 * * . : . . : : * . : : : * : : . . * : : . : :

GL50803_17385_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like
 KR~~G~~QAKPSSLFSKAETRVFENTIKALFHQVDKILFTTSCGIDTKTEGFS
 GTGLKDLK~~LADR~~ATISNMAPEYGATVGF~~FP~~VDDITLEYLLQ~~TGR~~DKEKVE
 * : : : . . . * . . * . * * : : . . . * . .

GL50803_17385_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like
 VENGRL~~LH~~--YISS~~N~~ELFGKTTILITKCDRLTDKQSCIDAIQ~~EY~~ASSLI
 LIREYLMKNSMFNTYKDNVEYTDVYTL~~DL~~SKLNL~~SL~~SGPKRPHDNVLLSE
 : . * : : : : : . * : . . * . * . : : .

GL50803_17385_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like
 LLS~~PY~~RRFKMNLVCIPHYGNAKMANQQAKTTRLKQD-----IC
 LHKDF~~TM~~CLESPIGFKGYNAKEEREK~~KS~~IFVCSKDGKEYVLSQGSVLLC
 * . : . : : * . * * . : : : : * : : *

GL50803_17385_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like
 DTIRCLNEQTRALVDTSNIVLEVTKLSATLSNRPQQYG-----ASE
 AITSCTNTSS~~SM~~IAAGLLAKKAIEEFGLKSLPYIKSSLS~~PG~~SKTVQKY
 * * . . : : : : : : . * . * . . .

GL50803_17385_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like
 VETGALPQLSQEP~~TH~~LGI~~ST~~L~~TS~~SADKQDKFLSSSVAPSQQQNYTLADSL
 LEAGGLKYLEQLGFY~~N~~VGYGCMTCIGNSGHLDEEVEEVINKNDLIVSSV
 : * . * * : : . : . : : . . * . . * : * : * . * :

GL50803_17385_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like
 QQSN-----VVKTLAASQAI~~V~~NAMAGKLISQC~~GT~~M~~L~~R~~V~~NPNTY-----
 LSGNRNFEGRVHPLIKANYL~~AS~~PVLLVLSIIGNVN~~VD~~LSNYTFN~~Y~~KGKK
 . * * . * . * : : : . . : * * * . : : * :

GL50803_17385_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like
 -DAHSIIISQGPASSEVG-----LG~~N~~LHQSCASTSRIGELLASTDEL~~C~~
 INALDLIPRKEIEEYESTYIKPEMYTEIYKNIKYV~~N~~KYWN~~DI~~QIKK~~N~~L
 : * . * : : . * : : . : : . . : : : :

GL50803_17385_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like
 WSLEQS-----IFVDNERILRDCHAVIVSILRRLEYNIRAV
 YEWDKNS~~TY~~IHKPPYFENMTLEIEKIQDIKDAHVLLFLGDSITTDHISPA
 : . : . : : : : : : : * . * . : : * . .

GL50803_17385_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like
 RRIK~~R~~KN~~A~~FL~~T~~LLR-----ILMITLAILL
 GM~~I~~HKTSEAYKFLKTKNIKQDLN~~TY~~GARRGNDEVMIRGTFANIRLINKL
 * : . . . : * : : : * * *

GL50803_17385_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like
 CFMMASAAQLFGADFLYARCHVHHLERHRI~~F~~EGGRFDGSALEMAICVLLY
 CPDKGPNTIHIPTNQLMSVYQAAMKYKQDNIDV~~II~~IAGKEYGCGSSRDWA
 * . . : : : * : : . : : : : * . . .


```

GL50803_17385_hypothetical_p      EIG--VLGLQRLATNTLTMVCIWALVPLLVLMAVFLDALYS-----
Iron_regulatory_protein-like      AKGPNLLGVKAVIAESYERIHRSNLIGMSVLPQLQFINNQSPQYYNMDGTE
      *  ;**::: : :::  :  *; : **  *::  .

GL50803_17385_hypothetical_p      -----AKPLQNNELASLKKESYVFKPMLILLDGFLEQKEHDVT--
Iron_regulatory_protein-like      KFTILLNDGNIKAQQTIKVQMNQKGKIIIFDVLCRIDTEIEERYFRNGGI
      *:.  ..:::~::~ : : *  : *  : *::  .

GL50803_17385_hypothetical_p      -----
Iron_regulatory_protein-like      LKYVLRSLVNEANK

```

Fig 35. Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de *P. falciparum* y la secuencia IRP-like GL50803_17385 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	MRRSWVLDCLQPHIGTTDKAPDRPDDQPPQPGDANALVYLGSTLDENALY -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	FTHGPCTFYAKIRDIQYRHGRATALVYLSPTLAITTSVPLHQVRAIYDSE -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LYDQLLYQISQANDNSENTKTHGQDAIKAAPTILTDERDRIASFATLYLA -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	PTALSTIVPSSYKPFKLTKRMFASIMQHLPRMLPDREHVEDIKINYQTA -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	QMVYANRYFYFSPNPMYDLTLMDKIVSKERFRADSIQEAFELRRKRFKL -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LQTYLSHELRFLLPTYTMSLFLLSLANLHADLFHQQQVPSTELLSRFSL -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	CLSCFQQFLVDIADAEERTKHLKIRIDKLEDYHKNMCAAVSLLSGEPYIS -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	TVELFVRALLPFGLFLFCVHVTLRLRITYTSSRIMQLLRAEQRLAEEDPDN -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	VLSCSATELIPVDKELSDTDTDTSESSLAAVTSVGTGHPVPDFSRAS -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	FSLKSKRREESFATTQRLHSSNALMGASSQALVEMLVGGDFSPERISKL -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	VDLAQERDKHELLEAIHYALLGARRITVAPLNTPEVYASITRYQQPTLED -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	QRLPSTEQPSKASFEVSTMPSPKAILGTSIRTSIPTTVPTRKATTMVFKD -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	PQTSLSLSAIYTIAILVYSQTLRLLDVHGCTDYLLNLVELSKKLSFNPD -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LLFNRSPDFMQYFSFEPRLRITRPMRLSLLYNLASQSVLFDSSIQTIRAH -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	FQPVEYMRLLSFFCPYLFYDSTTKKDLQIADFCSHQLEKRLKLTLEKL -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	ANKTYEFVQDFPSLGSPLSVLSQGSNNQASSDTSQTNDTTDEIVIRIVT -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	ASLSDEALAFYTSNRCVFLTDTEDMRRVLATPLARFLISPLEHVVTHFTG -----

GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	ITNQISTLSSEFLNFMSSNASVKLLEALKPHTPEEKLGKDIQQFIIFQE -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	TDSITPPDMRCLGDFISKLDQIQAAALLSMQPSQSEHETMQLPSVVDPQP -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	CTDLTGRSQKPIESQSLELGDTMPLKDFAAQQRFPETAIHFGPASIIV -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	SIIRDQFLQLVDETKNTIRSRISVLLNFINVVSSEIHALHTLFFSFMLD -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	PELLRDIDKVKYELSMSRLKSAFARVFDYIHTIVTQCSSCLISILDSVS -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	SLVERIFRDFRAMSALANESPPYREGKAALGVLNDQAMQLTQVFAAYVVS -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	PSNRQEQPIYGPDMPPFYLRPQDVTIGTRETNYAPVCKQREIKYDTSK -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	VVEFLLCVNETDPSLGDITLSFNFFSSVILLDDIISMTQSTSSDLVHRAF -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	IYSRFIRSTEQHLQITNHLVNSVAEVLCLTYHSMKAAHDSATEFEQENP -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	YLSTDFNLMLQFDLSLNSSDIDASSLYVTEAQILEYERFLLSLAKTA -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LPICTKHHSREELFGKGGGINVAIMGVNDYTFLLKNSQTSGQPSVAAPST -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	DPSVSASASARGELNKDAQEDSLSYTLADQLSEEAVPSSRALPVSGVDAL -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LASELKLRSRTIGTLKRQGLELHKVVPDSLFTEGMFYRRPIIKKKVKTFF -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	NIIQILAEELRFILQEICIIQASIDKWKRFIQDIHKRQDSVSGVANKHPS -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	KDLHRTYSPYTLISICHPLCSVVANVSDLVALHEKGVTVAVADYPSSPLL -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	HLLEQTADIKVIHRVSNPDQHSFISIPSSNLTILKPSQSSQNRSIEGHN -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LAAIGTEQDGDVANSLSANIMSLASVPLTDKAKRLKGVGPTLKPETKTN -----

GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	DNLIVLTYASWTEYVDYAQEMIVAYALPITIMYFVRSPLCEHHYKALAE -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LVGCTLPSQTEISTGTVQPTVREPSEASTWTAKDGNLDESTAHIVSTNEI -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	IVSKDQYARAVLSLSVSSFLEAFEKSDLFSVLLCITNNASIDMEAREQL -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	AVIDDLLHNIIMEFSYDMATEVANRTSTAWNSKSAFVITPVNSEALLRE -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	SLYTISNILNSIGHGNKKVQPELSVLHGIHAYIARTSSLRTRRHLPLRYQ -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	GYSDIIQQSRYAPDIEVLARYLECGAWMLVYKALFRITHIYALLCVT -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	KYGICISLSKNTRTYTTISTQHGEKLAFLDGLAVTFISQEDLCTFKE -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LFSQWKELAMKYLSKPFTPLFSIIFDRTFNEAVTTLCKRLNRIYDKVISV -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	RDHGILTNLKINASINPSMEVPLWYEVATSNPQIRSKVCQRVVPLIDDH -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	YHPSSLFFCNTPILYCGEFLIRRNCFAVQSLHFEVLSGVDGFVLLPQRP -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	PLVDATHSGDIQETNMPLRELTALSSDEVLELLEPIELPKGVFLVSDKI -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	IRNIAPALMKNISKAWEEFNHQIQRYEKILATELNKLRQERMVPTATKQ -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	KTDSVSFKLNSLSKRMQEKVGGQIGSDDSSSSDDTNAIEKSLREQDTSNT -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	TSQPDERSRDDYKGFLENDPHLIAISESDPDSSNQSATQPQQLTAPQVL -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	HTLTPHDIIGVQIQCCSIFDNFFSNFLFRSTIIVLSSYIRLVYSKEISDA -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	FAGKHTKESMMPLNLLKNFGKAIEMEVICSHKPTIHKKAIVAKLHEWFD -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LLTECKRIFMSTKGMQLLSASVHFPVYFQPGANKIFITSEHGTYSEAS -----

GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	QQWLGAAITLDTTLKLNPRQLGLLNKIFSAISERMIIFLVCSEKGSNT -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	ELYLITTALSRYLFMRVIYCPFSEYTFANLQRLSSAVANGCLAIVVGIE -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	YLPWQQLQLCTLANDLRVKQGALPGLVVMKDTGVARGATMSDFPNLGF -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	IVFFLPELSPISCMEDVFYVDPINTTTTSMMLLPVLGQTSFTNESNYLA -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	NNVTDYSSSYAASERLDLVVAPFRIRRVISLEIESPDALYLRLSPEYGR -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	AFYEISVFLRQFSGLTYKFVAGDIPMVYTHVKERTDALCMAAVTLDMIMR -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	QTLFSILHPMTNDNLVEVYCRIISSAFGLDKTSTVQLYKLSKAYWDFIKA -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	SLFSLNLLHDHSSDGKLGAMGYNASTAVQSVVHARSTFAKYFSEHLSKY -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LAPRLNLYVTLFGQMHLAPQFVIDIIFANELLKSGRPLLAVVPQSSYIR -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	AYTAVLTSVKHWDVSYVTDSSRLRAALKRLTYGDSAMSSSELLEPIPGKV -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	AGEQEKARKSEHLIVVAPPTSHALLRMFDQLFGASLHYPPIILDEFGCTYY -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	QFDIGRGPYFMICVTISMLQDFGPLIDLFTHRVLLPSIEGSDGCRKILH -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	GSLFIDTPHLRFIAKMNVDLWKSELKRRKVESRDALFLLQGLESLMATAS -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	KQTTYMTRVIQRIAVLPTFINSIIGFLYDTMAHVFNCGRSVDEVFLIRSM ---MHFRRCIRKYCINKKIVN-----PFEHVQRTLNE-----KNY :: * * :: . : . : * : : : : * : .
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	FYFFLLRFNVVITLRKPLPSQFLLKSLEYSQAARGETPQAMKNRVSEIAK YYVDINELHDSRIKSLPYSIRVLLLES AVR----- :* : : . : : * * . : . : * : *
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	HKAYEDGCSPMFTGTFAFTLVSHVRECVELMRLKEALAKQPGSVIPS -----NCDNLKVS-----EKNVETILGWKENCKKKKEVPFMP . * . : : . : * : : * * * : : . : * :
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LPEPFGMTLDQRAQILTFLDITIGVTIPKEILATTNIYSCSSSSSRLKKA R-----VLLQDLTGVPDIVDLATMRDTAEKLG----- : * : : : : : * : . * * .

GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	ICGPESGKTAQAIKQALVQKQHMQR LHRAFYSSTSTSHILADEVW -CDAERINPLIPVDLVIDHSVQVDYSRRED----- *..* . . :. : ** : : * .
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	PFLDVAGFSLQEIQLDDHVKQKSSGTTNLT SIINTAL LMNAERDVLQLG -----ALELNEKKEYERNLERFKFLKWMNSFKNMLILPPGSGIVHQIN . : . * : * : : : . . . : * : * : * . . * * :
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	MGFCGSLAYELSSSFMLEAVFSPETHAEAFNLVLPVLI AFWNACSLFVT LEYLAHCVFNKDNLLYPDSVVGTDSTHTMIN----- : : . . : : . : : * . : : * : . :
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	TYDDGKNKVS KGT TNYARWL GK KYDAL TTEFQSIEKLTQAMYCGVSPFVT -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LLLL EANSPLVHPGLLKHYDTLYRLDLGALNHLSSEVIISNFRTFSKKV -----GLGILGWVG--GIEAEATMLGLPI . * * . * : . * : : . : :
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	VALLPK EFPVNMSSSTTQNYNPGTIANSCFSYIDFTYGLGQNKKAVSYKK SMTLPEVVGIN VVG-----KLSDD * * : . * :
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	YLCKAEFRLYEIGHGIMKRIHEFRDRTFVEKSIDMITRLVERKHHNLAV YLLSTDIVLYIT--SFLR-----KEVG VNKYVEFFGTGLKDLKLADRAT * * : : * * . : : : : : * * : : * * : * : * :
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	AKRKATEEHAKEI HAKEDALFTKLVTTTASQTQSAAAQDSSKPLRLIKP ISNMAPEYGATVGFPPVDDITLEYLLQTRDKEK-----VELIRE . . * * * : . . * : : : * . : : : : * : * :
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	ANVDFYMSSSDEEELVTDKTL SKDKEQEESDSSSENDAADNLEQAKKAMN YLMKNSMFNTYKDNVEYTDVYTL DLSKLNLSL SGPKRPHDNVLLSELHKD : . * . : : : : . . : * . : : . * . : : * * : : : :
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LELTKLSKLSRNERTAIDLELHDYDKGESVSVQCSNPITVTFSPHCAII FTMCLESPIGFKG----YNI AKEEREKKISFVCSKDGKEYVLSQGSVVL : : * . : . : : : : : : : : * * : * : : : : :
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	VALGCAMLSPITVALIGRQSGKSRLIDMARLLFRDLLAPDTFLNDVQT CAITSCTNTSNSSMIAAGLLAKKAIIEFG----- * : . . : . : : * . * . : : :
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	SNSVHAIASSLSRCLQRNYLTAASSRRKNAYIGKNTSPNTVLEYCDTLC LKS LPYIKSSLS P-----GSKTVQKYLEAGGL LKYLEQLG : * : * * * * . . : * . . . : * : * :
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	FPSLHFHCS-DIDPAASINGHFALLLRDHMLLDANAEPHPIYLDMPYD FYNVGYGCMTCIGNSGHLDEEVEEVINKNDLIVSS-----VLSGNRN * . : : * * . . : : . . : : : : * : : : * . : :
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LKTGAISLSDMSIIVECTADHNLTSYCGLQIEVPPCTEAYLNGLCRIFP FEGRVHPLIKANYLASPVLVLF SIIGNVNVDL SNYTFNYKGGKINALDL : : . . * . . : . . : : . : : : : * * . : : :
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	HQTDSWISQYVSGYFLVRGSLPNSISETYAVFSNMYQNFVMTMNSLTVPV IPRKEEIEEYESTYIKP-----EMYTEIYKNIKYVKNKYW . . * : * * * : : : : * * : : : : . .
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	DKMMLHIREEEESVRADNCIDKEECSPTMI IKYNNQDLLLRASLHSLFSS NDIQIKKNKLYEWDKNSTYIHKPPYFENMTLEIEKIQDIKDAHVLLFLGD : : : : : * : . . * * . * : : : : * : * : : : . .
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LRSAQMDAQFMDAVIERFASLSFLGYLDTDEEYVESVKGAVARRAEKL S-----ITTDHISPAGMIHKTSEAYKF : : : . . * . * * :

GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	KKAKASKSPRLKASKKEEGSGNRSEQVKMHPTVLKKSEGPWSDVKLMLI LKTKNIKQDQLNTYGARRGND-----EVMIR *.* *.* *:: ..*.. :*:
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	SNFAYFPAWEAFIINHGIRLGHKSLASHRFMGMTSMSMKTTPFVKENTLL GTFANIRLINKLCPDKGP----- ..** : : :*
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	MASTLNSVLQVDGIHVNASIELIALSYATINAFWFGHFLLASRLPIYDP -----NTIHIPTNQLMS-----VYQA : ** : :*: :*:
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	YMLSRVFHLYVTIETEKENMMARFVSMINNFAPRPATSSLSDFYDYPDFH AMKYKQDNIDVIIAGKEYGCG----- * : : * * : * * . .
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	GTRIYLANRAAPYAGKIHIVQNTIAMRTGKQPTYVDQDVREYLSAICDA SSRDWAAGKPN-----LLGVKAV .* : * : *
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	ETRSWRLLLRKQTASLVISPSATVEEISQRISFQAKPKVNPKAAMFPG IAESYERIHRSNLIGMSVLPQFINNQSPQYYNMDG----- :.*:.*: *.: .: : * :*: :.* :*:
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	FSLAAMCLRPKYTINIANGTLQSYAEILSQLVALSNQKQFTVSSFSGSI -----TEKFTILLNDGNIIKAQQTIKVMNQKGGKIIIFDVLCR--- . **:* : :*: :* : * : *
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	YNSSTQQRVLLDAASVIVSSDPLNQYFVDLLHKVNAADMREYEFLLLLMI IDTEIEERYFRNGG-----ILKYVLRSLVNEANK----- : : . : * : : . . * : : . * : : * *
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	RTAMALALGIKPEALYPDTVSPNPSTGLSFKSALETCLPSRTIGTGRAY -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	SLLPPAINESGLRGKPHQIIAREKREKAQDFLLPSAHDVTVIAPKSALG -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	RVGAAGISVYQLLTRTLEPLNAAEGIFSSEEMGVICSLVPQSYGLNLTCD -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	RRMLASFLSINLAVIIVDDLPGPAVYLGSDSSAYVKPQLYSESLRVPVL -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	NSIKSPAIEIENDIETGLESFRMQGVSINEEHMHDMQQLLLGNSNIKAKQ -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	EEYKMNLIRYSFADIVSICNISRCTFPNEPPAHIFRKGNHRTEFLAAFK -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	HTFAAATISIIYKFAFRFTSVPTVSLMRFTALASQLTNAIYQRIGSF FEYI -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	DILTNALFFYEYLSAPSKTKHKIIEITKLTVPVMVRIVENAVSSVERHTG -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	TTRLVQKGFISRHNIIQTAVAEAVIMRDFLHSLHLHLIKREIMVMEAVVQT -----

GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	AHIDALLCSAYMLFSETDRLSEDKCLQCLINGECGLSPYLQDLLAACQK -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	HTENNSLSPFTVAMVSI LNNGIPVHIHRFDKTMDELLKDPMMISITAET -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	TGKSFFLNHIIRVMAIDFPTYIILKVLNVEWKPTDPARQTLDCVALSDMI -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	NSCVHVVP SHLGLSAAYLLEGIHRSKRKRRTGYLQALNSSLNGL EDDKSME -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LIDEISKNI IKL D L L L P P E E F S R E L D I A I Q K N M Q R F S E A R D V A P G T E Q W Y -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	KYKYLILNYGAPNANGANISLLRKL YINRN V N N G N N S V V F S L Y P G T D F T T -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	ACMRVGM L T Q T T L D M F S C S C P C S I I A R K E V D T I D L A E Y P T E N A H K I S C I L -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	IESIFGENSAGRSSDECTRVGNAAISQLLVGLSLSVKNYLLTF L A S C S D M -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	QALRTIASTPAESSHQHSQSLSYCLKQDSP L K S N Q E K A L T T I F S L G R D I A -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	FSAVGKYALIDTLIKKDIDKPIDKEINIICLQRTIVDTLGTSIAMK L G R -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	SLSLVAEIMWRYAQVHTPSVILADDNFMPDLHLRIKRAVASYTEMLIKGN -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	AAKPGALTPEQLKAQGLMSMRESYPFIYAMKQNPAAITSF L A A C I L P Y I N -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	ERVFRLFEPRIAAGVMTSLSIFFIANLNVFEQDL MNKHSTSMERSLGITV -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	IGKNSYPDFIKMISIQQLANCF L V N S R F P L T K I Y T R S Q I K A I T N F E H V T E -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LIPEICISPRITYAWLVVTVLARYNTIIAESLPWFAQHHSSFVALALTE -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	NPFLAIMAFYAQKNPKFEWKGPHAEWLKAQIYQEAAKKHTIINLPNFLE -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	PSGSVIFAVYCISVALRPHTIAYASNACICFMNSLVGNSSAYLYQNSTSN -----

GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	AYFGATGIVVYSQETAAFVARAGSKDSSMGPLSIASSTKLLKKQALSAKIAE -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	GFADLVALCSENPEFFVFSEKLLSDGIYSLSELCEVSIKQLAYFKEMASQ -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	NIELTSRAPLIVDIIIFYDSCVAIEILLEYALNLAQIGLPSVPAPIRFVRD -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	PTLNDLKNSIIVSVETALLGYTMIDSLTRMLAQKETLYRSDITYPLFVL -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	IPSSLTPHNIFVPGKVGGLDGDPSLQYETAMSISKLIIVAKPNFFYLRSR -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	STLVGGFTHTICLSIAVVGNIMLKVLGGKTIRSLNKSIIHFSISLRGLSLL -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	CLKQAFLFRDITIAASDYEVVNVIGSCILKALSTAKHQIDTRNFGQVAM -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LDSAYFTYNLDLTKSVFDSQYLSKLNEMSQLLFARHDAIQVLLTRLVT -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	TEIELYDKTLMRQLKEKMKAKNDEKIEKEQEESYSSDGDSETSMDNSM -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	ANSAKSSMFDGDSLSEHLSERSFRSSKSNRYSSSRSSVSGISEALDDFD -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	DSVSQTPSSVSKMSGTSVQSTTLFRMADGGVTFMPEEDIYNFFLMGVQM -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	TSNNLDPSKPVYVDSIEKSVLGMQPRRRTVTVDAPNMIHKKLERYEKH -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LAVSSADGAVARNIERGGSAAETSSSQKIGTDGHVIKDDSLSLLELATR -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	NGEAPKKENIKHYLVIPTHVAKMPDLMSIYAQLVQYDTRHVFVFDEQGV -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	QKDKCELLASLGQQLNTAYRLIFSSHFLDTICRFLSIERKSKMVYQIS -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	DMKAMPQIFKTYLINLNNYSAIKFGYPGVLLSGDVLNGLLPSTFSTSA -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	KMITGQYGFSGFMDHWIVSGAVYYKVLGDILNYLRVISSIMTTSPVLRQ -----

GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	VIVLLKKPTTMPRILEDGSI*FIDKNTTNPRPVFYILIRNMELLGVSYPV -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	LDTICDISPEKGQGFSNCFDLYACCTIIDDAMGKKEPSLNKRHMRLPKNI -----
GL50803_35341_hypothetical_p Iron_regulatory_protein-like	VPVPLKIGGYCAPIVYIPNKTEIPSEEKSRHPCFVAKVL -----

Fig 36. Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de *P. falciparum* y la secuencia IRP-like GL50803_35341 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los sitios totalmente conservados, en dos puntos color verde los sitios conservados de grupos fuertes y en un punto color azul los sitios conservados de grupos débiles.


```

GL50803_9327_Kinase__NEK_[Gi      -----LEIVELLMKYENG-----MEDNYGMLAI
Iron_regulatory_protein-like      LLGVKAVIAESYERIHRSNLIGMSVLP LQFINNQSPQYYNMDGTEKFTIL
                                   : : * ::: *.          *:. . : :
                                   : : * ::: *.          *:. . : :

GL50803_9327_Kinase__NEK_[Gi      MYAAFTGHLEIVKLLFEKEGHLVDKSNKFFFSELETRGYSEILSLLSSSS
Iron_regulatory_protein-like      LNDGNIKAQQTIKVMNQKGIIFDVLCRIDTEIEERYFRNGGILKYVL
                                   : .      : :* : :::*::: .      :.      . * . . :*.

GL50803_9327_Kinase__NEK_[Gi      TLGVDGHNDP
Iron_regulatory_protein-like      RSLVNEANK-
                                   * : * .

```

Fig 37. Alineamiento en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de *P. falciparum* y la secuencia IRP-like GL50803_9327 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.


```

GL50803_12174_hypothetical_p      -NKYWGVLFNWKITNLPR--FLLVLPSTFLCLSYMFTESK-----
Iron_regulatory_protein-like      VNKYWNDIQIKKNKLYEWDKNSTYIHKPPYFENMTLEIEKIQDIKDAHVL
GL50803_17385_hypothetical_p      LAASQAIVNAMAGKLISQCCTMLRVVNPNTYDAHSIISQGPASSEVGLG-
                                     *: .      : * : :
                                     :
GL50803_12174_hypothetical_p      -----KWIHSVCRERNVFPRLTSFKFAVATHAFV-----
Iron_regulatory_protein-like      LFLGDSITTDHISPAGMIHKTSEAYKFLKTKNIKDQDLNTYGAR-----
GL50803_17385_hypothetical_p      -----NGLHQSCASTSRIGELLASTDELCSLEQSIFVDNERIL
                                     .... :.: :
                                     :
GL50803_12174_hypothetical_p      ---LTSIVVFLANVEILPRILLSSCPS-----ILAHVPF
Iron_regulatory_protein-like      ---RGNDEVMIRGTFANIRLINKLCPDKGPNTIHIPTNQLMSVYQAAMKY
GL50803_17385_hypothetical_p      RDCHAVIVSILRRLEYNIRAVRRIKRKNAFLTLLRILMITLAILLCFMMA
                                     :.      * : .      . :
                                     :
GL50803_12174_hypothetical_p      NRSTIYMVLVS-----TLGAGLFGAFLPWT-----
Iron_regulatory_protein-like      KQDNIDVIIIAGKEYGCGSSRDWAAKGNLLGVKAVIAESYERIHRSNLI
GL50803_17385_hypothetical_p      SAAQLFGADFLYARCHVHHLERHRIFEGGRFDGSALEMAICVLLYEIGVL
                                     . : :      . :.
                                     :
GL50803_12174_hypothetical_p      -----
Iron_regulatory_protein-like      GMSVLPLQFINNQSPQYYNMDGTEKFTILLNDGNIKAQQTIKVQMNQKGK
GL50803_17385_hypothetical_p      GLQRLATNTLTMVCIWALVPLLVLMAVFLDALYSAKPLQNNELASLKKE
                                     :
GL50803_12174_hypothetical_p      -----
Iron_regulatory_protein-like      IIIFDVLCRIDTEIEERYFRNGGILKYVLRSLVNEANK
GL50803_17385_hypothetical_p      EYVFKPMLILLDGFLEQKEHDVT-----

```

Fig 38. Alineamiento Múltiple en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de *P. falciparum* y las secuencias IRP-like GL50803_12174, GL50803_17385 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

Finalmente, se realizaron comparaciones entre las secuencias IRP utilizadas como sondas (humano y *P. falciparum*) y las secuencias de Giardia (GL50803_12174, GL50803_17385, debido a que presentaron mayor porcentaje de similitud al utilizar como sonda la secuencia de la proteína reguladora de hierro de *P. falciparum* parásito protozoario evolutivamente cercano a Giardia) (Figura 39). Al realizar dichas comparaciones observamos mayor homología con la secuencia GL50803_17385 debido a que presenta más sitios conservados con las proteínas reguladoras de hierro de humano y *P. falciparum* (Figura 40). Posiblemente también esta secuencia GL50803_17385 pudiera participar como IRP en Giardia. Por tanto, se muestran al menos cuatro candidatos a IRP-like en Giardia (GL50803_14790 proteína hipotética, GL50803_11099 proteína 21.1, GL50803_17385 proteína hipotética y GL50803_9327 NEK cinasa).

El encontrar ortólogos de IRP en *G. duodenalis* concuerda con lo reportado en *P. falciparum* (Loyevsky y col, 2001) en el cual se tiene la proteína recombinante y se une a algunas estructuras IRE-like de dicho parásito. En *T. vaginalis* en cambio no se ha reportado la presencia de una secuencia similar a la IRP; sin embargo, mediante ensayos REMSA, UV crosslinking, Northwestern y análisis de espectrofotometría de masas; se identificó y caracterizó la α -actinina, una proteína citoplasmática de 135 kDa la cual interacciona específicamente con la estructura tallo-burbuja del RNAm de la *tvcp4* localizada en la región 5' (Calla-Choque y col, 2014). Por lo anterior, los protozoarios mencionados pudieran presentar el mecanismo de regulación IRE/IRP aunque con variantes de acuerdo a su posición en la escala evolutiva. Con estos análisis podemos sugerir la presencia de ortólogos de IRP en este protozoario, lo que apoya la existencia del mecanismo de tipo IRE/IRP también en *G. duodenalis*.

Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	MHFRR CIRKYCINKKIVNPF EHVQRTLNEKNYYYYDINELHDSRIKSLPY ----- -----
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	SIRV LLESAVRNC DNLKVSEKNVETILGWKENCKKKKEVPFMPTRVLLQD ----- -----
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	LTGVPCIVDLATMRDTAEKLG CDAERINPLIPVDLVIDHSVQVDYSRRED -----MRDAVKKLG G DPEKINPVC PADLVIDHSIQVDFNRRAD -----MISNTDQGLDVALQTRAAISDLVYHHIISAGQRLRIT : . * * . * * : * : * : * : * : *
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	ALELNEKKEYERNLERFKFLK WGMNSFKNMLILPPGSGIVHQINLEYLAH SLQKNQDLEFERNRERFEFLK WGSQAFHNMRIIPGSGI IHQVNLLEYLAR TPFKAPNRP RPVILVLGEDYSGKSSLISHITGSR LRSEGM CINIYVPCVND : : . : : . * : : : : :
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	CVFNKDNLLYPDSVVG TDSHTTMING--LGILGWGVGGIEAEATMLGLPI VVF DQDGYYPDSLVG TDSHTTIDG--LGILGWGVGGIEAEAVMLGQPI VAYFTDSLADTLPSIHACFRENGFP GSHIRCSAFNSYSKQTPG SVLSTDQ . : * . . . : : : * : . : . : : * :
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	SMTLPEVVGIN VVGKLSDYLLSTDIVLYITSF LRKEVGVN KYVEFFGTG SMVLPQVIGYRLMGKPHPLVTSTDIVLITITKHLR-QVGVGK FVEFFGPG SQLQSGFHANL SPTGKSMYSTKSTAEGTKLP----RGRDSSSTSAS * : . * * . * * : :
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	LKDLK LADRATISNMAPEYGATVGF FVDDITLEYLLQTGRDKEKVELIR VAQLSADRATI ANMCP EYGATAAF FVDEVSITYLVQTGRDEEKLKYIK RYKDVSSNSATLYNSIDKLEKSVSHLPQSNN----ILHGASDQLMGTPC . : : * * : : : : * : : : : * :
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	EYLMKNSMFNTYKD--NVEYTDVYTL DLSKLNLSL SGPKRPHDNVLLSE KYLQAVGMF RDFNDPSQDPDFTQVVELDKTVVPCCSGPKRPQDKVAVSD FIFIEVFFFYRY----VIESSTSKGILSSLSNLSKR GKQAKPSSLSFSA : : * : : : : . . * : : : .
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	LHKDF TMCLESPIGFKG--YNI AKEEREK KISFVCSKDGKEYVLSQGSV MKKDFESCLGAKQGFKG--FQVAPEHNDHKTFIY--DNTEFTLAHGSV ETRVFENTIKALFHQVDKILFTTSCGIDTKTEGFSVENGRLLHYISSNE : * : : . : : . * . . : : . .
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	VLCAITSCTNTSNSSS MIAAGL LAKKAI EEFGLKSLPYIKSSLSPGSKTV VIAAITSCTNTSNPSVMLGAGLLAKKAVDAG-LNVMPYIKTSLSPGSGVV LFGKTTILITKCDRLTDKQSCIDAIQEYASSLILLSPYRRFKMN--LVCI : : * . . . : : * : : : * : : . .
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	QKYLEAGGLLKYLEQLGFYVNVGYGCMTCIGNSGHLDEEVEEVINKNDLIV TYYLQESGVMPYLSQLGFDVVG YGCMTCIGNSGPLPEPVVEAITQGD LVA PHYGNAKMANQQAKTTRLKQDICTIRCLN----EQTRALVDTSNIVLE * : . : . : * : : : : :
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	SSVLSGNRNFEGRVHPLIKANYL ASPVLVLF SIIIGNVNV DLSN--YTFN VGVLSGNRNFEGRVHPNTRANYL ASPPLVIAYAIAGTIRIDFEKEPLGVN VTKLSATLSNRPQQYGASEVETGALPQLSQEP THLGISTLTL S-----A * * . . . : : . : * * * : * : : .
Iron_regulatory_protein-like Iron_Regulatory_Protein_1_[H GL50803_17385_hypothetical_p	YKGK KINALDLIPRKEEIEEYESTYIKPEMYTEIYKNIKYV NKYWN DIQI AKGQQVFLKDIWPTRDEIQ AVERQYVIPGMFKEVYQKIETVNESW NALAT DKQDKFLSSSVAPSQQQNYTLADSLQSNVVKTLAASQAI V NAMAGK LIS * . : . : * : : . : . : . * * . : :

```

Iron_regulatory_protein-like      KKNKLYEWDKNSTYIHKPPYFENMTLEIEKIQDIKDAHVLLFLGDSITTD
Iron_Regulatory_Protein_1_[H     PSDKLEFFWNSKSTYIKSPFFENLTLDLQPPKSIVDAYVLLNLGDSVTTD
GL50803_17385_hypothetical_p     QCQTMLRVVNPNTYDAHSIISQ-----GPASSEVGLGNGLHQSCA
      ..:  . .**  . :  . .: * * * :

Iron_regulatory_protein-like      HISPAGMIHKTSEAYKFLKTKNIKDQDLNTYGARRGNDEVMIIRGTFANIR
Iron_Regulatory_Protein_1_[H     HISPAGNIARNSPAARYLTNRGLTPREFNSYGSRRGNDVAMARGTFANIR
GL50803_17385_hypothetical_p     STRIGELLASTDELCSLEQSIIFVDNERILRDCHAVIVSILRRLEYNIR
      * * : .. : :. :. : * ***

Iron_regulatory_protein-like      LINKLCPDKGPNTHIIPNTQLMSVYQAAMKYQDNIDVIIAGKEYGCGS
Iron_Regulatory_Protein_1_[H     LLNRFNLKQAPQTIHLPSGEILDVFDAAERYQQAGLPLIVLAGKEYGAGS
GL50803_17385_hypothetical_p     AVRRIRKRNAFLLLRILMITLAILLCFMMAS-----AAQLFGADFLYAR
      :.:  .. * :  : : . . : * : : .

Iron_regulatory_protein-like      SRDWAAGPNLLGVKAVIAESYERIHRSNLIGMSVLPQLFINNQSPQYYN
Iron_Regulatory_Protein_1_[H     SRDWAAGPFLLGKAVLAESYERIHRSNLVGMGVIPLEYLPGENADALG
GL50803_17385_hypothetical_p     CHVHHLERHRIFEGGRFDGSALEMAICVLLYEIGVGLQRLATNTLTMVC
      .:  :  : : . .: * * :.: * : : :.

Iron_regulatory_protein-like      MDGTEKFTILLNDGNKAQQTIKVMNQKGGKIIIFDVLCRIDTEIEERYF
Iron_Regulatory_Protein_1_[H     LTGQERYTIIIP-ENLKPQMKVQVKLDTG---KTFQAVMRFDTDVELTYF
GL50803_17385_hypothetical_p     IWALVPLLVLMAVFLDALYSAPLQNNNE-----LASLKKESYVFK
      : .  : : : : : : : : : : : * :

Iron_regulatory_protein-like      RGGILKYVLRSLVNEANK
Iron_Regulatory_Protein_1_[H     LGGILNYMIRKMAK----
GL50803_17385_hypothetical_p     PMLILLDGFLEQKEHDVT-
      :* . :. . . :

```

Fig 40. Alineamiento Múltiple en ClustalW entre la proteína reguladora de hierro de humano, proteína reguladora de hierro de *P. falciparum* y la secuencia IRP-like GL50803_17385 de *G. duodenalis*. Los resultados muestran en un asterisco azul los aminoácidos idénticos, en dos puntos color verde los aminoácidos fuertemente conservados y en un punto color azul los aminoácidos débilmente conservados.

D Unión de los IREs like en RNAs de Giardia a la proteína tipo IRP de humano

Para que se presente el sistema de regulación por hierro tipo IRE/IRP los RNAm de Giardia deben presentar estructuras tallo-burbuja en sus UTR pero además estas deben unirse a proteínas tipo IRP. Por lo que seleccionamos dos estructuras tallo-burbuja, una encontrada en el RNAm que codifica para Catepsina L11 y la otra encontrada en el RNAm que codifica para la Proteína Ribosomal L13 (Cuadro 4). De las proteínas de virulencia se seleccionó la Catepsina L11 debido a que presentó una estructura tallo-burbuja con una longitud de 32 nt y presentó la secuencia GCCACA similar a la secuencia GGCACA encontrada en la *tvcp4* en la región 5' traducida en *T. vaginalis* (Solano-González y col, 2007) en la burbuja. De las proteínas ribosomales se seleccionó la RPL13, esta estructura tiene una longitud de 28 nt con una citosina no apareada y el motivo GUU/UUG propuesto para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo, 2009). Para determinar si estas estructuras son reconocidas por proteínas IRPs, realizamos ensayos de retardo en geles de poliacrilamida. Para obtener las regiones del RNA del parásito *G. duodenalis* que contiene las estructuras tallo burbuja, se diseñaron oligonucleótidos como se indica en el cuadro 1 en Materiales y Métodos para su amplificación (Figura 41). Estos amplicones se transcribieron *in vitro* (Figura 42) para obtener los RNAm necesarios para la interacción con la IRP de humano y probar si estas regiones podían formar complejos ribonucleoproteicos con dicha proteína. Para lo anterior, se purificó la proteína hIRP-1 recombinante (Figura 43), como se indica en materiales y métodos, y se interaccionó con el IRE de ferritina de humano como control positivo (Figura 44). Nuestros resultados muestran la formación de complejos ribonucleoproteicos específicos entre los IREs-like de Giardia con la proteína IRP de humano lo que sugiere la existencia de un mecanismo de regulación postranscripcional por hierro tipo IRE/IRP similar al ser humano.

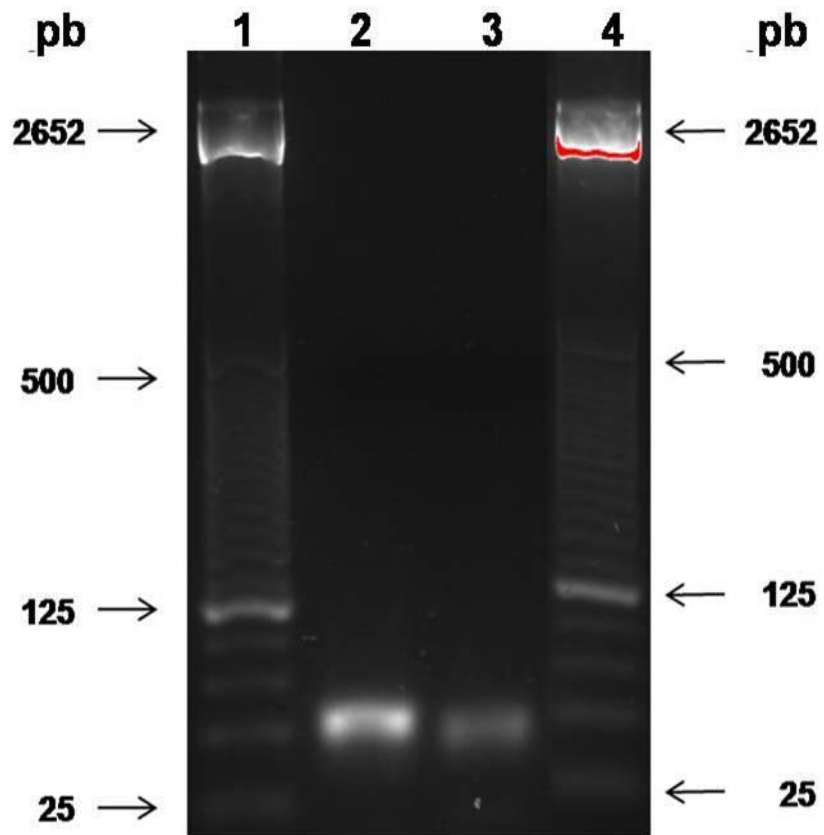


Fig 41. Amplificación por PCR de Catepsina L11 y RPL13 de *G. duodenalis*. Gel de agarosa al 3%. Carril 1 y 4, Marcador de tamaño molecular de 25 pb. Carril 2, Catepsina L11. Carril 3, RPL13.

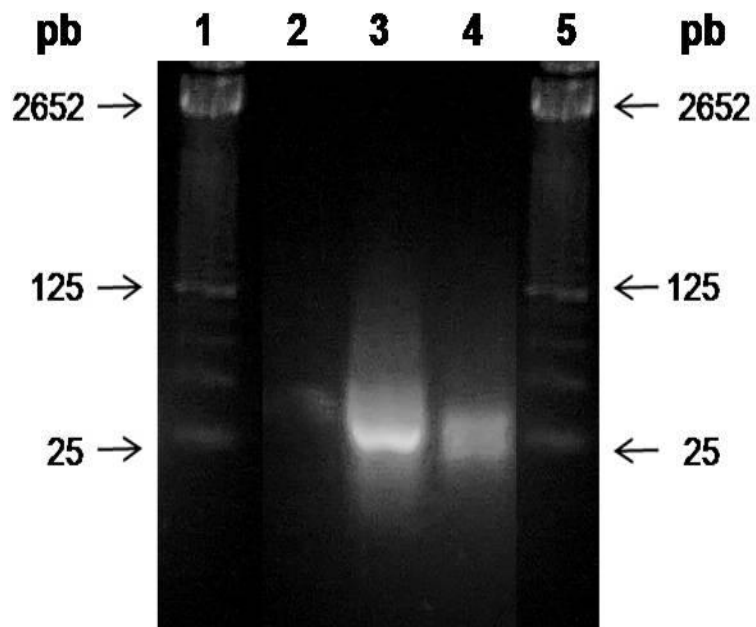


Fig 42. Transcripción *in vitro* del IRE-ferritina, Catepsina L11 y RPL13 de *G. duodenalis*. Carril 1 y 5, Marcador de 25 pb. Carril 2, IRE-ferritina. Carril 3, Catepsina L11. Carril 4, RPL13.

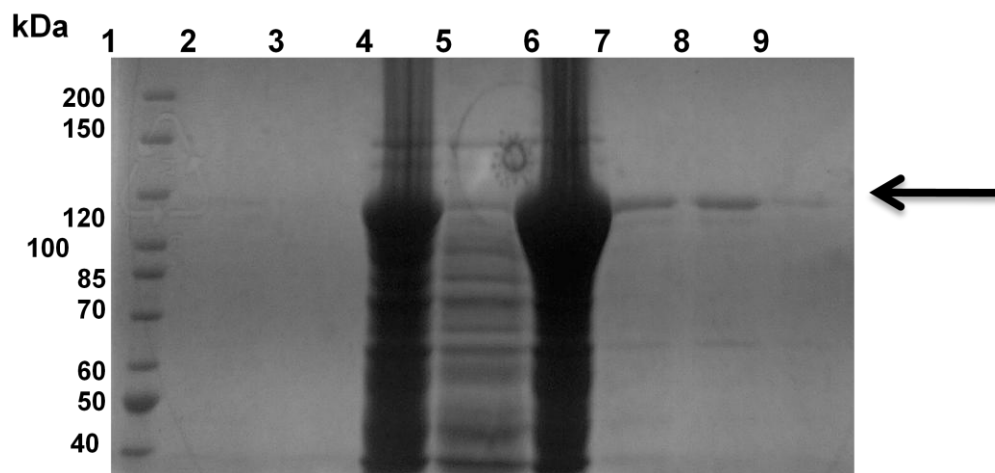


Fig 43. Expresión y purificación de la proteína hIRP-1. Carril 1, Marcador de tamaño molecular de amplio rango. Carril 2, extracto de *E. coli* sin inducir. Carril 3, sobrenadante. Carril 4, pastilla. Carril 5, sobrenadante lisado. Carril 6, pastilla lisada. Carriles 7-9, proteína IRP purificada por cromatografía de afinidad (GST- etiqueta en pGEX que se une a Glutation sefarosa 4 FF).

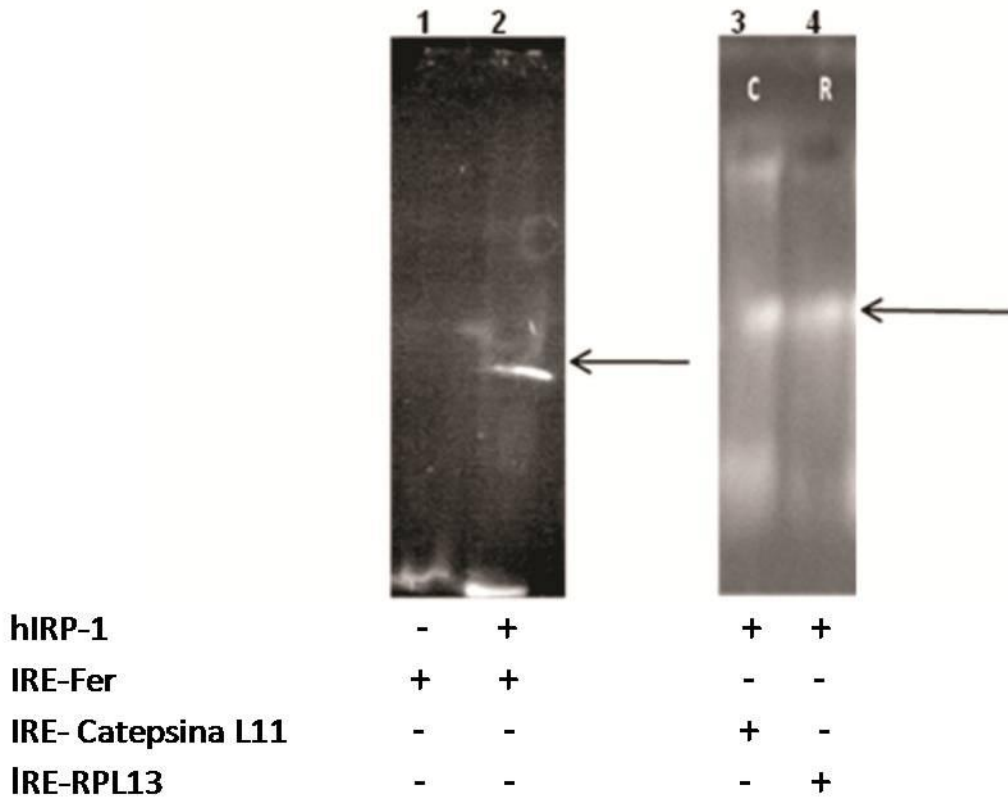


Fig 44. Formación de complejos entre los RNAm's de *G. duodenalis* y la proteína IRP-1 recombinante de humano. La proteína recombinante purificada se incubó con el IRE de ferritina de humano como control y con los RNAm con estructuras tipo IREs de *G. duodenalis* a 4 °C por 15 minutos. Los complejos se observaron en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 6%. Carril 1, IRE- fer libre. Carril 2, interacción IRE/IRP. Carril 3, complejo IRE-Catepsina/ IRP. Carril 4, complejo IRE-RPL13/ IRP.

La unión de las estructuras seleccionadas en este estudio contenidas en el RNAm de Catepsina L11 y RPL13 a la hIRP-1 fortalece la hipótesis de la presencia del mecanismo de regulación postranscripcional por hierro en este parásito. La localización del IRE-like en la región 5' codificante del RNAm de la Catepsina L11 es similar a la encontrada en el IRE de *tvcp4* de *T. vaginalis* (Solano-González y col, 2007). De esta manera, cuando el parásito se encuentra en bajas condiciones de hierro, la proteína citoplasmática de tipo IRP se une al IRE-like encontrado en el RNAm de Catepsina L11, por lo que esta unión funciona como represor de la traducción y por lo tanto no se esperaría expresión de la proteína en bajo hierro. Por otro lado, si el parásito se encuentra en condiciones de alto hierro una proteína tipo IRP en el citoplasma no tendría la capacidad de unirse a la estructura tipo IRE localizada en su RNAm por lo que no hay actividad represora para la maquinaria de traducción de la Catepsina L11. Para demostrar lo anterior, se necesitan otras estrategias experimentales como ensayos de RT-PCR para determinar el nivel de regulación de la Catepsina L11 y los ensayos de unión RNA-proteína en el sistema homólogo. En otros parásitos se ha reportado la importante función de las proteasas en los diferentes mecanismos de patogenicidad (León-Sicairos y col, 2015 in press; Solano-González y col, 2007; Park y col, 2001,) así como el efecto del hierro en la expresión diferencial a nivel de RNA y proteína. Por lo anterior, aunque no está reportada la función específica de la Catepsina L11 en *Giardia* posiblemente esta también se regule por hierro y participa en alguno de los mecanismos de patogenicidad además de proporcionar nutrientes al patógeno y de esta manera se pudiera explicar que *G. duodenalis* provoca una disminución de hierro en suero sanguíneo de su hospedero (Monajemzadeh y Monajemzadeh, 2008).

Como es bien sabido, las proteínas ribosomales son fundamentales en la síntesis de proteínas (Jones-Dylan y col, 2013). En *E. histolytica*, se observó una expresión diferencial por hierro en la proteína ribosomal PRL21 y nuestro equipo de trabajo reportó que contiene un IRE en su RNAm (Hernández-Peña y col, 2015 *en revisión*). La RPL13 de *G. duodenalis* contiene una estructura tallo-burbuja de 28 nt en la región 5' traducida y presenta el motivo GUU específico para protozoarios (Torres-Romero y Arroyo; 2009) y una citosina no apareada en el tallo medio. Además, los ensayos de retardamiento en geles de poliacrilamida (Figura 45) muestran la formación de complejos ribonucleoproteicos entre los RNAm de *Giardia* con la proteína IRP de humano lo que sugiere la existencia de un mecanismo de regulación postranscripcional por hierro tipo IRE/IRP similar al ser

humano. Esta proteína ribosomal presentaría el mismo panorama que el descrito anteriormente para la Catepsina L11, ya que contiene el IRE-like en la región 5' UTR.

Finalmente, para nuestro conocimiento este es el primer estudio relacionado con el efecto del hierro en el crecimiento y el mecanismo de regulación por hierro tipo IRE/IRP en *G. duodenalis*. Nuestros datos podrían contribuir al entendimiento de la expresión regulatoria de genes en *G. duodenalis*, así como en el diagnóstico y tratamiento de la giardiasis y sus complicaciones.

IX CONCLUSIÓN

Las estructuras tallo-burbuja encontradas en RNAm de *G. duodenalis*, la unión del IRE-Catepsina L11, IRE-RPL13 y el efecto del hierro en el crecimiento del parásito sugieren la existencia de un mecanismo de regulación postranscripcional tipo IRE-IRP en este protozooario en su forma más primitiva.

X PERSPECTIVAS

1. Continuar con el estudio del efecto del hierro en el crecimiento del parásito utilizando otras concentraciones de hierro.
2. Valorar el efecto del hierro sobre la adhesión de trofozoitos de *G. duodenalis* hacia células epiteliales en cultivo.
3. Evaluar el daño citotóxico ejercido por los trofozoitos de *G. duodenalis* crecidos en diferentes concentraciones de hierro.
4. Identificar proteínas expresadas diferencialmente en los trofozoitos de *G. duodenalis* crecidos en diferentes concentraciones de hierro.
5. Evaluar la expresión diferencial por hierro de algunos genes utilizados como modelo de estudio.
6. Continuar con el estudio del mecanismo de regulación por hierro en el sistema homólogo.

XI BIBLIOGRAFÍA

- Aisen P y Listowsky I. 1980. Iron transport y storage proteins. *Annual Review of Biochemistry*; (49):357-93.
- Al-Mekhlafi MS, Azlin M, NorAini U, Shaik A, Saiah A, Fatmah MS, Ismail MG, Ahmad Firdaus MS, Aisah MY, Rozlida AR y Norhayati M. 2005. Giardiasis as a predictor of childhood malnutrition in Orang Asli children in Malaysia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine y Hygiene*; (9): 686-91.
- Alvarez-Sánchez ME. 2001. Participación de la cisteín proteinasa de 65 KDa (CP65) de *T. vaginalis* en la citotoxicidad a la célula blanco. Tesis de Doctorado. Departamento de Patología Experimental. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F., México.
- Álvarez-Sánchez ME, Avila-Gonzalez L, Becerril-García C, Fattel-Facenda L y Arroyo R. 2000. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial Pathogenesis*; 28: 1-10.
- Argüello-García R, Argüello-López C, González-Robles A, Figueroa AM y Ortega-Pierres MG. 2002. Sequential exposure y assembly of cyst wall filaments on the surface of encysting *Giardia duodenalis*. *Parasitology*; (125): 209-219.
- Bagchi S, Oniku A, Topping K, Mamhoud ZN y Paget TA. 2012. Programmed cell death in *Giardia*. *Parasitology*; 139(7): 894-903.
- Bartelt LA, Roche J, Kolling G, Bolick D, Noronha F, Naylor C, Hoffman P, Warren C, Singer S y Guerrant R. 2013. Persistent *Giardia lamblia* impairs growth in a murine malnutrition model. *Journal of Clinical Investigation*; 123(6): 2672-84.
- Bazán-Tejada ML, Argüello-García R y Ortega-Pierres G. 2008. La Biogénesis del quiste de *Giardia duodenalis*, como modelo de diferenciación unicelular. Departamento de Genética y Biología Molecular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Disponible en (<http://bq.unam.mx/mensajebioquímico>).
- Bernander R, Palm JE y Svard SG. 2001. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cellular Microbiology*; 3(1): 55-62.
- Brazzalotto X, Timmins P, Dupont Y y Moulis JM. 2002. Structural changes associated with switching activities of the human iron regulatory protein 1. *The Journal of Biological Chemistry*; (277): 11995-12000.

- Buret AG. 2007. Mechanism of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut*; 56(3): 316-7.
- Buret AG, Mitchell K, Muench DG y Scott KG. 2002. *Giardia lamblia* disrupt tight junctional ZO-1 y increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology*; 125(Pt 1): 11-9.
- Busatti HG, Alves RJ, Santana-Anjos KG, Gil FF, Cury MC, Vannier-Santos MA y Gomes MA. 2013. Effects of metronidazole analogues on *Giardia lamblia*: experimental infection y cell organization. *Diagnostic Microbiology y Infectious Disease*; 75(2): 160-164.
- Carpenter ML, Assaf ZJ, Gourguechon S y Cande WZ. 2012. Nuclear inheritance y genetic exchange without meiosis in the binucleate parasite *G. intestinalis*. *Journal of CellScience*; 125(10): 2523-32).
- Carranza P y Lujan H. 2009. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes y Infection*; (12): 71-80.
- Calla-Choque JS, Figueroa-Angulo EE, Ávila-González L y Arroyo R. 2014. α -Actinin TvACTN3 of *Trichomonas vaginalis* is an RNA-binding protein that could participate in its posttranscriptional iron regulatory mechanism. *Biomed Research International*; volume 2014: 1-20.
- CDC (Centers for Disease Control y Prevention). 2010. Parasites-Giardia. 07 de enero del 2012. Disponible en web <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/biology.html>.
- Chávez B, Knaippe F, Gonzalez-Mariscal L y Martínez-Palomo A. 1986. *Giardia lamblia*: electrophysiology y ultrastructure of cytopathology in cultured epithelial cells. *Experimental Parasitology*; (3): 379-89.
- Chen Y, Chen CF, Chiang HC, Pena M, Polci R, Wei RL, Edwards RA, Hansel DE, Chen PL y Riley DJ. 2011. Mutation of NIMA-related kinase 1 (NEK1) leads to chromosome instability. *Molecular Cancer*; 10:5.
- Coradi ST y Guimaraes S. 2006. *Giardia duodenalis*: protein substrates degradation by trophozoite protease. *Parasitology Research*; 99(2): 131-136.
- Cotton JA, Beatty JK y Buret AG. 2011. Host parasite interactions y pathophysiology in *Giardia* infections. *International Journal for Parasitology*; 41(9): 925-33.
- Craun GF. 1986. Waterborne giardiasis in the United States 1965-84. *The Lancet*; (8505): 513-4.
- Crossley R y Holberton DV. 1983. Characterization of proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Journal of CellScience*; (59): 81-103.

- Cruz-Castañeda Ay Olivares-Trejo J. 2008. Ehhmbp45 is a novel hemoglobin-binding protein identified in *Entamoeba histolytica*. FEBS Letters; 582: 2806-2010.
- De Carvalho TB, David EB, Coradi ST y Guimaraes S. 2008. Protease activity in extracellular products secreted *in vitro* by trophozoites of *Giardia duodenalis*. Parasitology Research; 104(1): 185-190.
- Danquah I, Gahutu JB, Ignatus R, Musemakweri A y Mockenhaupt FP. 2014. Reduced prevalence of *Giardia duodenalis* in iron-deficient Rwandan children. Tropical Medicine & International Health; 19(5): 563-7.
- Das S, Stevens T, Castillo C, Villaseñor A, Arredondo H y Reddy K. 2002. Lipid metabolism in mucous-dwelling amitochondriate protozoa. International Journal for Parasitology; 32 (6): 655-75.
- Davids BJ, Gilbert MA, Liu Q, Reiner DS, Smith AJ, Lauwet T, Lee C, McArthur AG y Gillin FD. 2011. An atypical proprotein convertase in *Giardia lamblia* differentiation. Molecular y Biochemical Parasitology; 1750(2): 169-180.
- Dolezal P, Smíd O, Rada P, Zubáková Z, Bursac D, Suták R, Nebesárová J, Lithgow T y Tachezy J. 2005. Giardia mitochondria y trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. Proceedings of the National Academy of Sciences; 102(31): 10924-9.
- DuBois KN, Abodeely M, Sakanari J, Craik CS, Lee M, McKerrow JH y Saij M. 2008. Identification of the major cysteine protease of *Giardia* y its role encystation. The Journal of Biological Chemistry; 283(26): 18024-18031.
- Elmendorf H, Singer S, Pierce J, Cowan J y Nash T. 2000. Initiator y upstream elements in the α 2-tubulin promoter of *Giardia lamblia*. Molecular y Biochemical Parasitology; (113): 157-169
- Emery SJ, Van Sluyter S y Haynes PA. 2014. Proteomic analysis in *Giardia duodenalis* yields insights into strain virulence y antigenic variation. Proteomics; 14: 2523-2534.
- Franzén O, Jerlstrom-Hultqvist J, Einarsson E, Ankarklev J, Ferella M, Andersson B y Svard SG. 2013. Transcriptome profiling of *Giardia intestinalis* using strand-specific RNA-seq. PLOS Computational Biology; 9: e1003000.
- Fry AM. 2002. The Nek2 protein kinase: a novel regulator of centrosome structure. Oncogene; 21: 6184-6194.
- Gascón J. 2006. Epidemiology, etiology y pathophysiology of traveler's diarrhea. Digestion; Vol 73 Suppl 1:102-8.
- Gegout V, Schlegl J, Schlangner B, Hentze MW, Reinbolt J, Ehresmann B, Ehresmann C y Romby P. 1999. Ligand-induced structural alterations in human iron regulatory protein-1 revealed by protein footprinting. The Journal Biological Chemistry; (274): 15052-15058.

- Gillon J. 1984. Giardiasis: review of epidemiology, pathogenetic mechanisms y host responses. QJM: International Journal of Medicine; 53(209): 29-39.
- Goforth JB, Anderson SA, Nizzi CP y Eisenstein RS. 2010. Multiple determinants within iron-responsive elements dictate iron regulatory protein binding y regulatory hierarchy. RNA Journal; 16(1): 154-69.
- Good MF, Powell LW, Halliday JW. 1988. Iron status y cellularimmunocompetence. Blood Reviews; (1): 43-9.
- Goyal N, Rishi P y Shukla G. 2013. *Lactobacillus rhamnosus* GG antagonizes *Giardia intestinalis* induced oxidative stress y intestinal disaccharidases: an experimental study. World Journal of Microbiology y Biotechnology.
- Guo B, Phillips JD, Yu Y yLeibold EA. 1995. Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. The Journal Biological Chemistry; (270): 21645-21651.
- Haile DJ, Rouault TA, Harford JB, Kennedy MC, Blondin GA, Beinert H y Klausner RD. 1992. Cellular iron regulation of the iron-responsive element binding protein: disassembly of the cubane iron-sulfur cluster results in high affinity RNA binding. Proceedings of the National Academy of Sciences;(89): 11735-11739.
- Haile DJ, Rouault TA, Tang CK, Chin J, Harford JB y Klausner RD. 1992. Reciprocal control of RNA-binding y aconitaseactivity in the regulation of the iron-responsive element binding protein: role of the iron-sulfur cluster. Proceedings of the National Academy of Sciences; (89): 7536-7540.
- Halliez MC y Buret AG. 2013. Extra-intestinal y long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. World Journal of Gastroenterology; 19(47): 8974-85.
- Halliday CEW, Clark C y Farthing MJG. 1988.Giardia-bile salt interactions *in vitro* y *in vivo*. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine y Hygiene; (82): 428-432.
- Hantke K. 2001. Iron y metal regulation in bacteria. Current Opinion in Microbiology; (4):172-177.
- Henderson B y Kuhn L. 1995. Differential modulation of the RNA binding proteins IRP1 y IRP2 in response to iron: IRP2 requires translation of another protein. . The Journal Biological Chemistry; (270): 20509-20515.
- Hentze MW, Muckenthaler MU y Andrews NC. 2004. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. TheJournal Cell; (3):285-97.
- Hentze M y Kuhn L. 1996. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, y oxidative stress. Proceedings of the National Academy of Sciences; 93:8175-8182.

- Hentze M, Caughman S, Casey J, Koeller D, Rouault T, Harford J y Klausner R. 1988. A model for the structure y functional of iron-responsive elements. *Gene*. 72:201-208.
- Hernández-Cuevas NA, Weber C, Hon CC y Guillén N. 2014 Gene expression profiling in *Entamoeba histolytica* identifies key components in iron uptake y metabolism. *PLoS One* 9(9):e107102, doi:10.1371/journal.pone.0107102
- Hernández-Gutiérrez R, Ávila-González L, Ortega-Lopez J, Cruz-Talonia F, Gómez-Gutiérrez G y Arroyo R. 2004. *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental Parasitology*; 107: 125-135.
- Hernández-Gutiérrez R, Ortega-López J y Arroyo R. 2003. A 39 kDa cysteine proteinase CP39 from *Trichomonas vaginalis*, which is negatively affected by iron may be involved in trichomonal citotoxicity. *Journal of Eukaryotic Microbiology*: 696-698.
- Hernández- Peña J, Plata-Guzmán LY, Figueroa-Angulo EE, Soto-Castro L, Calla-Choque JS, Puga-Barraza F, Reyes-López M, De la Garza M, León-Sicairos N, Garzón-Tiznado JA, Arroyo Ry León-Sicairos CR. 2015 (en revisión). Evidence of Iron-Responsive Elements in the parasite *Entamoeba histolytica*. *Biometals*.
- Hernández Y, Castillo C, Roychowdhury S, Hehl A, Aley SB y Das S. 2007. Clathrin-dependent pathways y the cytoskeleton network are involved in ceramide endocytosis by a parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology*; 37(1): 21-32.
- Humen MA, Pérez PF y Liévin-Le Moal V. 2011. Lipid raft-dependent adhesión of *Giardia intestinalis* trophozoites to a cultured human enterocyte-like Caco-2/TC7 cell monolayer leads to cytoskeleton-dependent functional injuries. *Cell Microbiology*; 13(11): 1683-702.
- Inoue K, Nakai Y, Ueda S, Kamigaso S, Ohta KY, Hatakeyama M, Hayashi Y, Otagiri M y Yuasa H. 2008. Functional characterization of PCFT/HCP1 as the molecular entry of the carrier-mediated intestinal folate transport system in the rat model. *Gastrointestinal and Liver Physiology*; 294(3); 660-8.
- Iwai K, Klausner R y Rouault T. 1995. Requeriments for iron-regulated degradation of the RNA binding proteins, iron regulatory protein 2. *European Molecular Biology Organization*; (21): 5350-5357.
- Jedelsky PL, Dolezal P, Rada P, Pyrih J, Smíd O, Hrdy I, Sedinová M, Marcincikova M, Voleman L, Perry AJ, Beltrán NC, Lithgow T y Tachezy J. 2011. The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PLoS One*; 6(2): e17285.

- Jex AR, Koehler AV, Ansell BR, Baker L, Karunajeewa H y Gasser RB. 2013. Getting to the guts of the matter: The status y potential of “omics” research of parasitic protists of the human gastrointestinal system. *International Journal for Parasitology*; 3564: 1-12.
- Jones DT, Lechertier T, Reynolds LE, Robinson SD, Kirn-Safran CB y Hodivala-Dilke KM. 2013. Endogenous ribosomal protein L29 (RPL29): a newly identified regulator of angiogenesis in mice. *Disease Models & Mechanisms*; 6: 115-124.
- Kaldy P, Mwnotti E, Remy M y Kuhn L. 1999. Identification of RNA-binding surfaces in iron regulatory protein-1. *European Molecular Biology Organization*; 18 (21): 6073-6083.
- Kaur H, Ghosh S, Samra H, Vinayak VK y Ganguly NK. 2001. Identification y characterization of an excretory-secretory product from *Giardia lamblia*. *Parasitology*; 123 (Pt4): 347–356.
- Knodler L, Svard S, Silberman J, Davids B y Gillin F. 1999. Developmental gene regulation in *Giardia lamblia*: first evidence for an encystations-specific promoter y differential 5' mRNA processing. *Molecular Microbiology*; 34(2):327-340.
- Lane S y Lloyd D. 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Critical Reviews in Microbiology*; 28(2): 123-47.
- Lee J, Park S y Yong TS. 2008. Effect of iron on adherence y cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* to CHO cell monolayers. *The Korean Journal of Parasitology*; 46: 37-40.
- Lehker M, Arroyo R y Alderete JF. 1991. The regulation by iron of the synthesis of adhesions y cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Experimental Medicine*; 174: 311-318.
- Leipuviene R y Theil C. 2007. The family of iron responsive RNA structures regulated by changes in cellular iron y oxygen. *Cellular y Molecular Life Sciences*; (64): 2945-2955.
- León-Sicairos CR, Gutiérrez-Escolano L, Solano-González E, Ortega-López Jy Arroyo, R. 2015 (en revisión). The expression of the *Trichomonas vaginalis* TVCP12 cysteine proteinase is regulated by an IRE/IRP-like system.
- León-Sicairos CR, León-Félix J y Arroyo R. 2004. tvcp12: a novel *Trichomonas vaginalis* cathepsin L-like cysteine proteinase- encoding gene. *Microbiology*; 150(Pt 5): 1131-8.20.
- Liu Q, Hirohashi Y, Du X, Greene MI y Wang Q. 2010. Nek2 targets the mitotic checkpoint proteins Mad2 y Cdc20: a mechanism for aneuploid in cancer. *Experimental y Molecular Pathology*; 88: 225-233.

- Loyevsky M, Mompont F, Yikilmaz E, Altscgul SF, Madden T, Wootton JC, Kurantsin-Mills J, Kassim OO, Gordeuk VR y Rouault TA. 2003. Expression of a recombinant IRP-like *Plasmodium falciparum* protein that specifically binds putative IREs. *Molecular y Biochemical Parasitology*; (126): 231-38.
- Loyevsky M, LaVaute T, Allerson C, Stearman R, Kassim O, Cooperman S, Gordeuk V y Rouault T. 2001. An IRP-like protein from *Plasmodium falciparum* binds to a mammalian iron-responsive element. *The American Society of Hematology*; (98):2555-2562.
- Malquori L, Carsetti L y Ruberti G. 2008. The 3' UTR of the human CTLA4 mRNA can regulate mRNA stability y translational efficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*; (1): 60-65.
- Manning G, Reiner DS, Lauwaet T, Dacre M, Smith A, Zhai Y, Svard S y Gillin FD. 2011. The minimal kinome of *Giardia lamblia* illuminates early kinase evolution y unique parasite biology. *Genome Biology*; 12(7): R66.
- Mark-Carew MP, Adesiyun AA, Basu A, Georges KA, Pierre T, Tilitz S, Wade SE y Mohammed HO. 2013. Characterization of *Giardia duodenalis* infections in dogs in Trinidad y Tobago. *Veterinary Parasitology*; 196(1-2): 199-202.
- Militello KT, Dodge M, Bethke L y Wirth DF. 2004. Identification of regulatory elements in the *Plasmodium falciparum* genome. *Molecular y Biochemical Parasitology*; 134(1): 75-88.
- Monajemzadeh S y Monajemzadeh M. 2008. Comparison of iron y hematological indices in *Giardia lamblia* before y after treatment in 102 children in Ahwaz, Iran. *Medical Science Monitor*; (1): 19-23.
- Muckenthaler M, Gunkel N, Frishman D, Cyrklaff A, Tomancak P y Hentze MW. 1998. Iron-regulatory protein-1 (IRP-1) is highly conserved in two invertebrate species characterization of IRP-1 homologues in *Drosophila melanogaster* y *Caenorabditis elegans*. *European Journal of Biochemistry*; 254(2): 230-7.
- Müller N y Von Allmen N. 2005. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *International Journal for Parasitology*; 35(13):1339-47.
- Nakai Y, Inoue K, Abe N, Hatakeyama M, Ohta KY, Otagiri M, Hayashi Y y Yuasa H. 2007. Functional characterization of human proton-coupled folate transporter/heme carrier protein 1 heterologously expressed in mammalian cells as a folate transporter. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 322(2): 469-76.
- Olivares JL, Fernández R, Fleta J, Ruiz MY, Clavel A y Moreno LA. 2004. Iron deficiency in children with *Giardia lamblia* y *Enterobius vermicularis*. *Nutrition Research*; 24: 1-5.
- O'Regan L, Blot J y Fry A M. 2007. Mitotic regulation by NIMA-related kinases. *Cell Division* 2: 25.

- Pantopoulos K. 2004. Iron metabolism y the IRE/IRP regulatory system: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences*; (1012): 1-13.
- Pantopoulos K, Weiss G y Hentze MW. 1996. Nitric oxide y oxidative stress (H₂O₂) control mammalian iron metabolism by different pathways. *Molecular y Cellular Biology*; (16): 3781-3788.
- Park SJ, Lee SM, Lee J y Yong TS. 2001. Differential gene expression by iron-limitation in *Entamoeba histolytica*. *Molecular Biochemical Parasitology*; 114: 257-260.
- Peattie DA. 1990. The giardins of *Giardia lamblia*: genes y proteins with promise. *Parasitology Today*; 6(2): 52-6.
- Peattie D, Alonso R, Hein A y Caulfield J. 1989. Ultrastructural Localization of Giardians to the Edges of Disk Microribbons of *Giardia lamblia* y the Nucleotide y Deduced Protein Sequence of Alpha Giardin. *The Journal of Cell Biology*; (109): 2323-2335.
- Pegado MG y de Souza W. 1994. Role of surface components in the process of interaction of *Giardia duodenalis* with epithelial cells in vitro. *Parasitology Research*; 80(4): 320-326.
- Pérez G, Vittori D, Pregi N, Garbossa G y Nesse A. 2005. Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*; 39(3): 301-314.
- Piccinelli P y Samuelsson T. 2007. Evolution of the iron-responsive element. *RNA Society*; (13):952-966.
- Plata-Guzmán LY. 2013. Estudio del mecanismo de regulación por hierro tipo IRE/IRP en *G. duodenalis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Ponka P, Beaumont C y Richardson DR. 1998. Function y regulation of transferrin y ferritin. *Seminars in Hematology*; (35):135-154.
- Prucca CG y Lujan HD. 2009. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cellular Microbiology*; 11: 1706-1715.
- Que X, Svard S, Meng T-C, Hetsko M, Aley S y Gillin F. 1996. Developmentally regulated transcripts y evidence of differential mRNA processing in *Giardia lamblia*. *Molecular y Biochemical Parasitology*; (81):101-110.
- Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, Goldman ID. 2006. Identification of an intestinal folate transporter y the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *The Journal Cell*; 127(5): 917-28.
- Quarby LM y Mahjoub MR. 2005. Caught Nek-ing: cilia y centrioles. *Journal of Cell Science*; 118: 5161-5169.
- Rascón Jr AA y McKerrow JH. 2013. Synthetic y Natural Protease Inhibitors Provide Insights into Parasite Development, Virulence y Pathogenesis. *Current Medical Chemistry*; (20): 3078-3102.

- Ringqvist E, Palm JE, Skarin H, Hehl AB, Weily M, Davids BJ, Reiner DS, GriffithsWJ, Eckmann L, Gillin FD y Svard SG. 2008. Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Molecular y Biochemical Parasitology*; 159(2): 85-91.
- Rodríguez-Fuentes GB, Cedillo-Rivera R, Fonseca-Liñán R, Argüello-García R, Muñoz O, Ortega-Pierres G y Yépez-Mulia L. 2006. *Giardia duodenalis*: analysis of secreted proteases upon trophozoite-epithelial cell interaction in vitro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 101(6):693-696.
- Rouault T y Harford JB. 2000. Translational Control of ferritin synthesis. In translational control of gene expression. *Cold Spring Harbor Laboratory*; (4): 655-670.
- Sánchez-Cruz C, López-Casamichana M, Cruz-Castañeda A y Olivares-Trejo JJ. (2011) Transferrin regulates mRNA levels of gene involved in iron utilization in *Entamoeba histolytica*. *Molecular Biology* 39: 4545-51.
- Said DE, Elsamad LM y Gohar YM. 2012. Validity of silver, chitosan, y curcumin nanoparticles as anti-*Giardia* agents. *Parasitol Research*; 111(2): 545-554.
- Shant J, Ghosh S, Bhattacharyya S, Ganguly NK y Majumdar S. 2004. The alteration in signal transduction parameters induced by the excretory product from *Giardia lamblia*. *Parasitology*; 129(Pt 4):421-30.
- Scott KG, Yu LC y Buret AG. 2004. Role of CD8+ y CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infection y Immunity*; 72(6):3536-42.
- Selezneva AL, Walden WE y Volz KW. 2013. Nucleotide-specific Recognition of Iron-Responsive Elements by Iron Regulatory Protein 1. *Journal of Molecular Biology*; (13): 00403-8.
- Shiflett AM y Johnson PJ. 2010. Mitochondrion-related organelles in eukaryotic protists. *Annual Review of Microbiology*; 64: 409-29.
- Solano-González E, Burrola-Barraza V, León-Sicairos CR, Ávila-González L, Gutiérrez-Escolano L, Ortega-López J y Arroyo R. 2007. The trichomonad cysteine proteinase *TVCP4* transcript contains an iron responsive element. *FEBS letters*; 581; (16):2919-2928.
- Suchan P, Vyoral D, Petrak J, Sutak R, Rasoloson D, Noynkova E, Dolezal P y Tachezy J. 2003. Incorporation of iron into *Trichomonas foetus* cell compartments reveals ferredoxin as a major iron-binding protein in hydrogenosomes. *Microbiology*; (149):1911-1921.
- SSA (Secretaría de Salud). 2014. Notificación Mensual Casos Nuevos de giardiasis. Disponible en web <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/>.
- SSA (Secretaría de Salud). 2015. Notificación Mensual Casos Nuevos de giardiasis. Disponible en web <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/>.

- Tandara L y Salamunic I. 2012. Iron metabolism: current facts y future directions. *Biochemical Medicine*; 22(3): 311-28.
- Tasca T, Bonan CD, De Carli GA, Sarkis JJ y Alderete JF. 2005. Heterogeneity in extracellular nucleotide hydrolysis among clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*; 131(1):71-8.
- Tolba MEM, Kobayashi S, Imada M, Suzuki Y y Sugano S. 2013. *Giardia lamblia* Transcriptome Analysis Using TSS-Seq y RNA-Seq. *PLoS ONE* 8(10): e76184. doi:10.1371/journal.pone.0076184
- Torres-Romero JC y Arroyo R. 2009. Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: Evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE-IRP-like system. *Infection, Genetics y Evolution*; (602): 1-10.
- Touz MC, Nores MJ, Slavin I, Piacenza L, Acosta D, Carmona C y Lujan HD. 2002. Membrane-associated dipeptidyl peptidase IV is involved in encystation specific gene expresión during *Giardia* differentiation. *Biochemical Journal*; 364(Pt 3): 703-710.
- Tovar J, León-Avila G, Sánchez LB, Sutak R, Tachezy J, Van der Giezen M, Hernández M, Muller M y Lucocq JM. 2003. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*; 426(6963): 172-6.
- Townson SM, Upcroft JA y Upcroft P. 1996. Characterisation y purification of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. *Molecular y Biochemical Parasitology*; Volume 79, Issue 2: 183-193.
- Troeger H, Epple HJ, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard GD, Jelinek T, Zeitz M, Fromm M y Schulzke JD. 2007. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport y barrier function in human duodenum. *Gut*; 56(3):328-35.
- Vanacova S, Liston R, Tachezy J y Johnson P. 2003. Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*. *International Journal for Parasitology*; (33):235-255.
- Wilkinson N y Pantopoulos K. 2014. The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. *Frontiers in Pharmacology*; 28(5): 176.
- Williams AG y Coombs GH. 1995. Multiple protease activities in *Giardia intestinalis* trophozoites. *International Journal for Parasitology*; 25(7): 771-778.
- WHO. 1998. The World Health Report 1998, World Health Organization, Geneva.
- www.giardiadb.org.
- www.ncbi.nlm.nih.gov.

www.workbench.sdsc.edu

Yichoy M, Duarte TT, De Chatterjee A, Mendez TL, Aguilera KY, Roy D, Roychowdhury S, Aley SB y Das S. 2011. Lipid metabolism in Giardia: a post-genomic perspective. *Parasitology*; 138(3): 267-78.

Yoshida N, Tyler KM y LlewellynMS. 2011. Invasión mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends in Parasitology*; 27(10): 459-66.

Zuker M. 2003. Mfold web Server for nucleic acid holding y hibridization prediction. *Nucleic Acids Research*; 31(13): 3406-3415.

ABREVIATURAS

A	Adenina
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
APS	persulfato de amonio
C	Citosina
°C	grados centígrados
DNA	ácido desoxirribonucleico
G	Guanina
g	Gramo
h	Hora
H ₂ O	Agua
HCl	ácido clorhídrico
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopitanósido
IRE	elementos de respuesta al hierro
IRP	proteínas reguladoras por hierro
M	Molar
Mbp	mega pares de bases
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
μL	Microlitros
μM	Micromolar
nt	Nucleótidos
pb	par de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pH	potencial de hidrógeno
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
RNA _m	ácido ribonucleico mensajero
rpm	revoluciones por minuto
s	Segundos

TBE	solución amortiguadora de Tris, borato y EDTA
UTR	región no codificante
UV	Ultravioleta
V	Voltios

APÉNDICE

A Preparación de medios de cultivo TYI-S-33

1. Medio de cultivo en Bajo hierro

❖ Fosfato de potasio dibásico	0.2525 g
❖ Fosfato de potasio monobásico	0.1623 g
❖ Peptona de caseína	5.0 g
❖ Extracto de levadura	2.5 g
❖ L-cisteína	0.5015 g
❖ D-glucosa	2.5 g
❖ Ácido ascórbico	0.0513 g
❖ Resina Quelex	1.25 g
❖ Cloruro de sodio	0.57 g
❖ Bilis bovina	0.2095 g

Una vez añadida la resina quelex, tapar el vaso de precipitado con papel aluminio y dejar en agitación durante 16 hrs, en un cuarto frío (4°C).

Aforar a 250 ml de H₂O desionizada y ajustar a un pH de 7.0.

Realizar un pre-filtrado con embudo y papel fitro Whatman #2.

Esterilizar por filtración al vacío.

2. Medio de cultivo Normal

❖ Fosfato de potasio dibásico	0.2525 g
❖ Fosfato de potasio monobásico	0.1623 g
❖ Peptona de caseína	5.0 g
❖ Extracto de levadura	2.5 g
❖ L-cisteína	0.5015 g
❖ D-glucosa	2.5 g
❖ Ácido ascórbico	0.0513 g
❖ Citrato de amonio férrico	0.0062 g
❖ Cloruro de sodio	0.57 g
❖ Bilis bovina	0.2095 g

Aforar a 250 ml de H₂O desionizada y ajustar a un pH de 7.0.

Realizar un pre-filtrado con embudo y papel fitro Whatman #2.

Esterilizar por filtración al vacío.

3. Medio de cultivo en Alto hierro

❖ Fosfato de potasio dibásico	0.2525 g
❖ Fosfato de potasio monobásico	0.1623 g
❖ Peptona de caseína	5.0 g
❖ Extracto de levadura	2.5 g
❖ L-cisteína	0.5015 g
❖ D-glucosa	2.5 g
❖ Ácido ascórbico	0.0513 g
❖ Citrato de amonio férrico	0.0124 g
❖ Cloruro de sodio	0.57 g
❖ Bilis bovina	0.2095 g

Aforar a 250 ml de H₂O desionizada y ajustar a un pH de 7.0.

Realizar un pre-filtrado con embudo y papel fitro Whatman #2.

Esterilizar por filtración al vacío.

B Soluciones para la transcripción *in vitro*

1. Acetato de sodio 3 M

Disolver 40.8 g de acetato de sodio en 100 ml de H₂O destilada y ajustar a un pH de 5.2 con ácido acético y esterilizar en autoclave.

2. TBE 10X (Amortiguador de electroforesis)

- ❖ 108 g Tris base
- ❖ 55 g ácido bórico
- ❖ 40 ml EDTA 0.5 M pH 8

Aforar a 1000 ml con agua destilada y se esteriliza.

C Soluciones para la inducción y purificación de la proteína recombinante

1. Medio LB

- ❖ Triptona 10 g

- ❖ Extracto de levadura 5 g
- ❖ Cloruro de sodio 5 g
- ❖ Hidróxido de sodio 1ml

Disolver todos los ingredientes en 800 ml de agua destilada y ajustar a un pH de 7 con el hidróxido de sodio 1N y llevar a un volumen final de 1000 ml. Esterilizar en autoclave.

2. LB- ampicilina

Se añade 1 µl de ampicilina por cada ml de medio LB.

3. IPTG 100mM

Se disolvieron 0.297 g en 12.5 ml de H₂O inyectable. Se protege de la luz y se almacena a -20 °C.

4. PBS 10 X

- ❖ Cloruro de sodio 80 g
- ❖ Cloruro de potasio 2 g
- ❖ Na₂HPO₄·7H₂O 11.5 g
- ❖ KH₂PO₄ 2 g

Aforar a 1000 ml y esterilizar.

5. PBS 1X- tritón 1% (Buffer de lisis)

- ❖ Tritón 100 x 49.5 ml
- ❖ PBS 1X 0.5 ml

6. Glutación reducido 10mM

- ❖ Glutación reducido 0.76 g
- ❖ Tris- HCl 50 mM pH 8 1.51375 g

Se disolvieron en 250 ml de H₂O desionizada y se llevó a un pH de 8 con HCl.

D Soluciones para electroforesis SDS-PAGE

1. Acrilamida al 30%/Bisacrilamida al 0.8%

- ❖ Acrilamida 29.2 g
- ❖ Bisacrilamida 0.8 g

Disolver en 40 ml de agua destilada y una vez disuelto aforar a 100 ml.

Filtrar a través de papel filtro "Whatman" No. 1

Almacenar a 4°C hasta un mes, previamente protegido de la luz.

2. Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

❖ Tris base 27.23 g

Disolver en 80 ml de H₂O destilada ya ajustar a un pH de 8.8 con HCl.

Aforar a un volumen final de 150 ml con H₂O destilada y almacenar a 4°C.

3. Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

❖ Tris base 6 g

Disolver en 60 ml de H₂O destilada ya ajustar a un pH de 6.8 con HCl.

Aforar a un volumen final de 100 ml con H₂O destilada y almacenar a 4°C.

4. SDS 10 %

Disolver 10 g en 90 ml de H₂O destilada y llevar a un aforo de 100 ml.

5. Persulfato de amonio al 10%

Disolver 0.01 g en 1 ml de H₂O destilada y almacenar a -4 °C.

E Solución colorante de proteínas (azul brillante de coomassie)

❖ Metanol 45 ml

❖ Ácido acético 10 ml

❖ Agua destilada 45 ml

❖ Azul de Coomassie 0.25 g

Tapar perfectamente el matraz y disolver. Almacenarse a temperatura ambiente.

F Solución decolorante de geles de poliacrilamida

❖ Metanol 45 ml

❖ Ácido acético 10 ml

❖ Agua destilada 45 ml

Tapar perfectamente el matraz y disolver. Almacenarse a temperatura ambiente.

G Formulación de geles de poliacrilamida al 7 %

1. Gel separador

Soluciones	1 gel	2 geles
Agua destilada	2.55 ml	5.1 ml
Acrilamida al 30	1.15 ml	2.3 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.25 ml	2.5 ml
SDS 10%	0.05 ml	0.1 ml
APS 10%	75 µl	150 µl
TEMED	10 µl	20 µl

2. Gel concentrador

Soluciones	1 gel	2 geles
Agua destilada	1.525 ml	3.05 ml
Acrilamida al 30	0.325 ml	0.65 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	0.6 ml	1.2 ml
SDS 10%	25 µl	50 µl
APS 10%	50 µl	100 µl
TEMED	7.5 µl	15 µl

H Preparación de geles para retardos (6%)

Acrilamida al 30%	3 ml
TBE 10 X	0.75 ml
Agua desionizada	11.25 ml
APS 10%	200 µl
TEMED	50 µl

ANEXOS

A Presentación en Congresos Nacionales e Internacionales:

1. CONGRESO INTERNACIONAL DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA, XIX CONGRESO NACIONAL DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA Y XII JORNADAS CIENTÍFICAS DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR, Mazatlán, Sinaloa, México 9-11 abril del 2014; título de ponencia: Estructuras tallo-burbuja en RNAm que codifican proteínas de virulencia en *Giardia duodenalis*. **Laura Yuliana Plata Guzmán**, Jeanett Chávez Ontiveros, Rossana Arroyo Verástegui, Cuauhtemoc Reyes Moreno, Jorge Milán Carrillo, José Antonio Garzón Tiznado y Claudia del Rosario León Sicairos.
2. XXXIV ENCUENTRO NACIONAL Y III CONGRESO INTERNACIONAL DE LA ACADEMIA MEXICANA DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN INGENIERIA QUIMICA A. C, Mazatlán, Sinaloa, México 7-10 mayo del 2014; título de ponencia:El RNAm de la FeSOD de *E. histolytica* contiene un IRE-like en su 3' UTR. Jorge Hernandez-Peña, **Laura Yuliana Plata-Guzmán**, Dulce Xitlalic Beltrán-Mendoza, Rosana Arroyo, José Antonio Garzón-Tiznado, Claudia del Rosario León-Sicairos.
3. SEGUNDO ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES EN EL ESTADO DE SINALOA ORGANIZADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA Y LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE SINALOA, Mazatlán, Sinaloa, México, 25 y 26 de septiembre de 2014; título: Análisis *in silico* de una proteína reguladora de hierro (IRP) en *E. histolytica*. José Gorgonio Acuña Ochoa, Vianca Lizeth Ibarra García, Mario León Barraza, José Antonio Cruz Cárdenas, Jesús Rodrigo Payán Benitez, Jesús Christian Grimaldy Olivas, Claudia del Roario León Sicairos, **Laura Yuliana Plata Guzmán**, Liliana Soto Castro y José Antonio Garzón Tiznado.
4. 13TH INTERNATIONAL CONGRESS OF PARASITOLOGY, THE MEXICAN SOCIETY OF PARASITOLOGY Y THE WORLD FEDERATION OF PARASITOLOGISTS. MEXICO CITY, MEXICO, 10th-15 th AUGUST, 2014. 1) Iron Regulatory Proteins in the *G. duodenalis* genome. **Laura Plata**, Liliana Soto, Rossana Arroyo, Cuauhtémoc Reyes, Jorge Milán, José Antonio Garzón, Claudia del Roario León. 2) Iron Regulatory Protein-Like y Differential Gene

Expression in *E. histolytica*. Liliana Soto, **Laura Yuliana Plata-Guzmán**, Magda Reyes-López, Guillermo Ortiz-Estrada, Leticia Michelli Valle-García, Mireya de la Garza, Rossana Arroyo, José Antonio Garzón-Tiznado, Claudia del Rosario León-Sicairos.

5. XXX CONGRESO NACIONAL DE BIOQUÍMICA. Guadalajara, Jalisco, México, 2-8 de noviembre del 2014.1) Homologue sequences to Iron Regulatory Protein in *Giardia duodenalis* genome. **Laura Yuliana, Plata-Guzmán**; Liliana, Soto-Castro; Milagro de Jesús, Luque-Ramírez; Jeanett, Chávez-Ontiveros; Héctor Samuel, López-Moreno; Rossana, Arroyo; Cuauhtémoc, Reyes-Moreno; Jorge, Milán-Carrillo; José Antonio, Garzón-Tiznado; Claudia del Rosario, León-Sicairos.2) Homologue sequences to Iron Regulatory Protein in *Entamoeba histolytica* genome. Leticia Michelli Valle-García, Liliana Soto-Castro, **Laura Yuliana Plata-Guzmán**, José Gorgonio Acuña Ochoa, Vianca Lizeth Ibarra García, Mario León Barraza, José Antonio Cruz Cárdenas, Jesús Rodrigo Payán Benitez, Jesús Christian Grimaldy Olivas, Rossana Arroyo, José Antonio Garzón-Tiznado, Claudia del Rosario León-Sicairos.



EL COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS A.C.

EXTIENDE LA PRESENTE

CONSTANCIA

A

Laura Yulliana Plata Guzmán; Jorge Hernández Peña; Rossana Arroyo Verástegui; Cuauhtemoc Reyes Moreno; Jorge Milán Carrillo; José Antonio Garzón Tienado; Claudia del Rosario León Scairos

AUTORES DEL TRABAJO LIBRE


Estructuras tallo-burbuja en RNAm que codifican proteínas de virulencia en Giardia duodenalis

POR SU VALIOSA PARTICIPACIÓN EN LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO LIBRE EN MODALIDAD ORAL DURANTE EL

VIII CONGRESO INTERNACIONAL DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

XIX CONGRESO NACIONAL DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

XII JORNADAS CIENTÍFICAS DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR


IBQ. Miguel Rosales Domínguez
Vicepresidente


IBQ. Rodolfo Alejandro Romo Mexía Gutiérrez
Presidente


M. en C. Ricardo Monterrubio López
Presidente del Comité Científico

Mazatlán, Sinaloa, México 9, 10 y 11 de abril de 2014.

2. XXXIV ENCUENTRO NACIONAL Y III CONGRESO INTERNACIONAL DE LA ACADEMIA MEXICANA DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN INGENIERIA QUIMICA, A. C



AMIDIQ
Academia Mexicana
de Investigación y Docencia
en Ingeniería Química, A.C.

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C.
"La Ingeniería Química en la Biotecnología y la Energía"
Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Jorge Hernandez-Peña, Laura Yuliana Plata-Guzmán, Dulce Xitlalic Beltrán-Mendoza,
Rossana Arroyo, José Antonio Garzón-Tiznado, Claudia del Rosario León-Sicairos

Por la presentación del trabajo:
"El RNAm de la FeSOD de *E. histolytica* contiene un IRE-like en su 3'UTR"

ID: 751

XXXIV Encuentro Nacional y III Congreso Internacional de la AMIDIQ
llevado a cabo del 7 al 10 de mayo de 2013 en el Puerto de Mazatlán, Sinaloa, México.

Dr. Rubén González Núñez
PRESIDENTE DE AMIDIQ

Dr. Jesús Alberto Ochoa Tapia
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

Dr. Jorge Milán Carrillo
PRESIDENTE DEL COMITÉ ORGANIZADOR

3. SEGUNDO ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES EN EL ESTADO DE SINALOA ORGANIZADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA Y LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE SINALOA



**EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
Y LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE SINALOA**

Otorgan el presente

Reconocimiento

A. José Gorgonio Acuña Ochoa, Vianca Lizeth Ibarra García, Mario León Barraza, José Antonio Cruz Cárdenas, Jesús Rodrigo Payán Benitez, Jesús Christian Grimaldy Olivas, Claudia Del Rosario León Sicairos, Laura Yuliana Plata Guzmán, Liliana Soto Castro and José Antonio Garzón Tiznado.

Por su Participación con la Ponencia: "ANÁLISIS IN SILICO DE UNA PROTEÍNA REGULADORA DE HIERRO (IRP) EN ENTAMOEBA HISTOLYTICA". Dentro del marco del Segundo Encuentro de Jóvenes Investigadores en el estado de Sinaloa, celebrado los días 25 y 26 de Septiembre de 2014 en la ciudad y puerto de Mazatlán, Sinaloa, México. Sector Productivo, Ciencia Educación, Tecnología e Innovación.


Dra. Dolores Manjarrez Álvarez
Directora de Vinculación
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Dr. Leonardo Germán Gandarilla
Rector
Universidad Politécnica de Sinaloa



4. 13TH INTERNATIONAL CONGRESS OF PARASITOLOGY, THE MEXICAN SOCIETY OF PARASITOLOGY Y THE WORLD FEDERATION OF PARASITOLOGISTS. MEXICO CITY, MEXICO

1809



Iron Regulatory Proteins in the *G. duodenalis* genome
Plata-Guzmán, Laura Yuliana¹, Soto-Castro, Liliana¹;
Arroyo, Rossana²; Reyes-Moreno, Cuauhtémoc¹; Milán-
Carrillo, Jorge¹; Garzón-Tiznado, José Antonio¹ and León-
Sicairos, Claudia del Rosario¹.



¹Laboratorio de Patología, Biología Celular y Molecular, Programa Regional del Noroeste para el Posgrado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), Av. de las Américas y Josefa Ortiz (Cd. Universitaria), Culiacán, Sinaloa, México, C. P. 80030. ²Infectómica y Patogénesis Molecular (CINVESTAV-IPN), Av. IPN 2508 Col. San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, México City, México.

BACKGROUND

Iron is an important element for the survival of all living cells including protozoan parasites. Recent studies show the great necessity of *Giardia* by iron and the direct relationship of the presence of this parasite in children with anemia (3). However, mechanisms to maintain cellular homeostasis in these organisms have been poorly studied. Posttranscriptional regulation by the IRE/IRP system (Figure 1) is studied in humans and consists of iron cytoplasmic regulatory proteins that interact with iron responsive elements (IRE). Cellular iron store regulates the binding of IRP-1 and IRP-2 proteins by different mechanisms (1), when iron levels are high the IRP binding activity is inhibited, however, when cellular iron levels are low, the IRP binds to IRE.

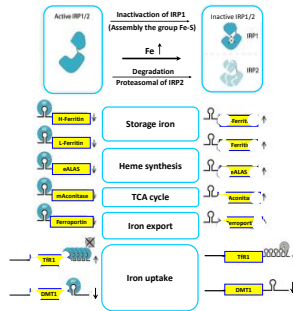


Figure 1. IRE/IRP system. Proteins involved in iron storage (Hentze y cols., 2004).

Recently in *T. vaginalis*, were found stem-loop structures which bind to both recombinant human IRP and cytoplasmic extracts of the parasite in low iron conditions (2,4). By their evolutionary proximity and the importance of iron in these protozoa, it is hypothesized that *G. duodenalis* may also have some iron regulatory proteins. The aim of this study was to search iron regulatory proteins in *G. duodenalis* to suggest a post-transcriptional IRE/IRP mechanism.

METHODS

IRP sequences search were performed using as probe: cytoplasmic iron regulatory protein 1 (*Homo sapiens*), iron regulatory protein 1A (*Drosophila melanogaster*), iron regulatory protein 1B (*Drosophila melanogaster*), iron regulatory protein (*Plasmodium falciparum*); which were obtained from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), used to search for homologies in *G. duodenalis* genome (www.giardiadb.org).



RESULTS

Giardia genome shared homology with: human IRP GL50803_14790 (32%) and GL50803_7555 (20%), IRP-1A protein of *D. melanogaster* GL50803_11099 (35%), GL50803_103818 (33%), GL50803_14790 (30%), GL50803_16220 (30%) and GL50803_86821 (26%), IRP-1B protein of *D. melanogaster* GL50803_11389 (32%) and GL50803_93551 (27%), IRP-like of *P. falciparum* GL50803_12174 (38%), GL50803_17385 (38%), GL50803_28635 (30%), GL50803_35341 (25%) and GL50803_9327 (23%), see Figure 2.

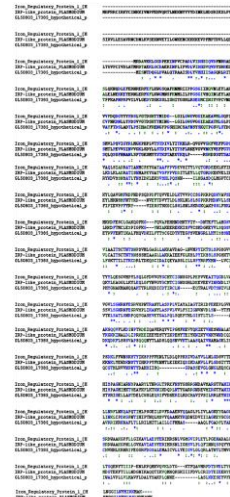


Figure 2. Multiple sequence alignment.

CONCLUSION

This is the first evidence of IRP proteins in *Giardia* which may suggest the presence of an IRE-IRP mechanism in this protozoa.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful for the support of SEP/CONACYT (152772), PROFABI-UAS, PROMEP-UAS to C.R.L. Laura Yuliana Plata Guzmán is CONACYT scholarship holder.

REFERENCES

- Henderson, B., and Kuhn, L. 1996. Differential modulation of the RNA binding proteins IRP1 and IRP2 in response to iron: IRP2 requires translation of another protein. *J. Biol. Chem.* (270): 20509-20515.
- León-Sicairos, C. R., Solano-González, E., and Arroyo, R. 2012. The iron negative expression of the *Trichomonas vaginalis* TVCP4 cysteine proteinase is regulated by an IRE/IRP-like system. *FEBS Lett.* (in press).
- Monajemzadeh, S. and Monajemzadeh, M. 2008. Comparison of iron and hematological indices in *Giardia lamblia* before and after treatment in 102 children in Ahwaz, Iran. *MedSciMonz.* (1): 19-25.
- Solano-González, E., Burrola-Barraza, V., León-Sicairos, C. R., Ávila-González, L., Gutiérrez-Escobedo, L., Ortega-López, J., and Arroyo, R. 2007. The trichomonad cysteine proteinase TVCP4 transcript contains an iron responsive element. *FEBS Lett.* 581: (16):2919-2928.



The Mexican Society of Parasitology and the World Federation of Parasitologists



Acknowledge:

Iron Regulatory Proteins in the *G. duodenalis* genome.

Laura Plata

Liliana Soto , Rossana Arroyo , Cuahtémoc Reyes , Jorge Milán , José Antonio Garzón , Claudia Del Rosario León

ICOPA XIII
MÉXICO

For Presenting an **Electronic Poster** in the

13th INTERNATIONAL
CONGRESS OF PARASITOLOGY
AUGUST 10th - 15th, 2014
at the Camino Real Hotel
Mexico City

Dra. Ana Fliser
President

Mexican Society of Parasitology

Dr. Alan Cowman
President

World Federation of Parasitologist



The Mexican Society of Parasitology and the World Federation of Parasitologists



Acknowledge:

Iron Regulatory Protein-like and Differential Gene Expression in *Entamoeba histolytica*

Liliana Soto

Laura Yuliana Plata-guzmán , Magda Reyes-lópez , Guillermo Ortiz-estrada , Leticia Michelli Valle-garcia
, Mireya De La Garza , Rossana Arroyo , José Antonio Garzón-tiznado , Claudia Del Rosario León-
sicairos

For Presenting an **Electronic Poster** in the

13th INTERNATIONAL CONGRESS OF PARASITOLOGY

AUGUST 10th - 15th, 2014
at the Camino Real Hotel
Mexico City

Dra. Ana Fliser
President
Mexican Society of Parasitology

Dr. Alan Cowman
President
World Federation of Parasitologist

5. XXX CONGRESO NACIONAL DE BIOQUÍMICA




Homologue sequences to Iron Regulatory Protein in *Giardia duodenalis* genome

Laura Yuliana, Plata-Guzmán¹; Liliانا, Soto-Castro¹; Milagro de Jesús, Luque-Ramírez¹; Jeanett, Chávez-Ontiveros¹; Héctor Samuel, López-Moreno¹; Rossana, Arroyo²; Cuauhtémoc, Reyes-Moreno¹; Jorge, Milán-Carrillo¹; José Antonio, Garzón-Tiznado¹; Claudia del Rosario, León-Sicairos¹.

¹Laboratorio de Patología, Biología Celular y Molecular, Programa Regional del Noroeste para el Posgrado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), Av. de las Américas y Josefa Ortiz (Cd. Universitaria), Culiacán, Sinaloa, México, C. P. 80030.
²Infectómica y Patogénesis Molecular (CINVESTAV-IPN), Av. IPN 2508 Col. San Pedro Zacatenco, C. P. 07360, México City, México.

Email: claudialeonsicairos@uas.edu.mx



BACKGROUND

Iron is an important element for the survival of all living cells including protozoan parasites. Recent studies show the great necessity of *Giardia duodenalis* by iron and the direct relationship of the presence of this parasite in children with anemia (3). However, mechanisms to maintain cellular homeostasis in these organisms have been poorly studied. Posttranscriptional regulation by the IRE/IRP system (Figure 1) is studied in humans and consists of iron cytoplasmic regulatory proteins that interact with iron responsive elements (IRE). Cellular iron store regulates the binding of IRP-1 and IRP-2 proteins by different mechanisms (1), when iron levels are high the IRP binding activity is inhibited, however, when cellular iron levels are low, the IRP binds to IRE.

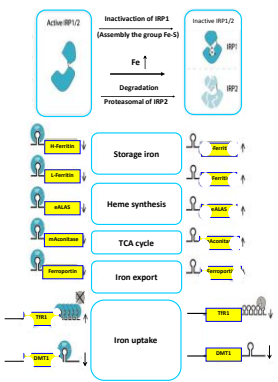
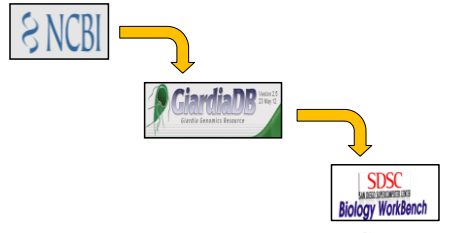


Figure 1. IRE/IRP system. Proteins involved in iron storage (Hentze y cols., 2004).

Recently in *T. vaginalis*, were found stem-loop structures which bind to both recombinant human IRP and cytoplasmic extracts of the parasite in low iron conditions (2,4). By their evolutionary proximity and the importance of iron in these protozoa, it is hypothesized that *G. duodenalis* may also have some iron regulatory proteins. The aim of this study was to search iron regulatory proteins in *G. duodenalis* to suggest a post-transcriptional IRE/IRP mechanism.

METHODS

IRP sequences search were performed using as probe: cytoplasmic iron regulatory protein 1 (*Homo sapiens*), iron regulatory protein 1A (*Drosophila melanogaster*), iron regulatory protein 1B (*Drosophila melanogaster*), iron regulatory protein (*Plasmodium falciparum*); which were obtained from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), used to search for homologies in *G. duodenalis* genome (www.giardiadb.org).



RESULTS

Our data show that sequences in *Giardia duodenalis* genome shared homology with: human IRP GL50803_14790 (32%) and GL50803_7555 (20%), IRP-1A protein of *D. melanogaster* GL50803_11099 (35%), GL50803_103818 (33%), GL50803_14790 (30%), GL50803_16220 (30%) and GL50803_86821 (26%), IRP-1B protein of *D. melanogaster* GL50803_11389 (32%) and GL50803_93551 (27%), IRP-like of *P. falciparum* GL50803_12174 (38%), GL50803_17385 (38%), GL50803_28635 (30%), GL50803_35341 (25%) and GL50803_9327 (23%). All of them encoded for hypothetical proteins, see Figure 2.



Figure 2. Multiple alignment in ClustalW between Human, Plasmodium falciparum and Giardia duodenalis IRP sequences.

CONCLUSION

This is the first evidence of IRP-like proteins in *Giardia duodenalis* which may suggest the presence of an IRE-IRP mechanism in this protozoan, experimental studies to confirm that are in process.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful for the support of SEP/CONACYT (152772), PROFAPI-UAS, PROMEP-UAS to CRLS. Laura Yuliana Plata Guzmán was scholarship recipient from CONACYT.

REFERENCES

- Henderson, B., and Kuhn, L. 1995. Differential modulation of the RNA binding proteins IRP1 and IRP2 in response to iron: IRP2 requires translation of another protein. *J. BiolChem*; (270): 20509-20515.
- León-Sicairos, C. R., Solano-González, E., and Arroyo, R. 2012. The iron negative expression of the *Trichomonas vaginalis* TVCP12 cysteine proteinase is regulated by an IRE/IRP-like system. *FEBS lett.* (in press).
- Monajemzadeh, S. and Monajemzadeh, M. 2008. Comparison of iron and hematological indices in *Giardia lamblia* before and after treatment in 102 children in Ahwaz, Iran. *MedSciMonit.*; (1): 19-23.
- Solano-González, E., Burrola-Barraza, V., León-Sicairos, C. R., Ávila-González, L., Gutiérrez-Escobedo, L., Ortega-López, J., and Arroyo, R. 2007. The trichomonad cysteine proteinase TVCP4 transcript contains an iron responsive element. *FEBS lett.* 561; (16):2919-2928.



Posters Session 4

Friday November 7, 2014.

16:00 – 18:00h

MP-48

Identification of receptor ryanodine (IP3) in *Entamoeba histolytica*. **Isela Pérez Galarza**, Andrés Monsalvo Villagómez, Diana Jiménez López, Guadalupe Salazar-Enríquez, Ana Laura Cano Martínez, Alejandra Arreola Martínez, Omar González Maldonado, Andrés Salas Casas. Universidad Politécnica de Pachuca

MP-49

Purification and kinetic analysis of cytosolic and mitochondrial Thioredoxin glutathione reductase extracted from *Taenia solium* cysticerci. **Agustín Plancarte Crespo**, Gabriela Nava Balderas. Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM

MP-50

Evaluation of the non-catalytic binding function of Ts26GST a glutathione transferase isoform of *Taenia solium*. **Agustín Plancarte**, José Rodrigo Romero, Gabriela Nava, Horacio Reyes-Vivas, Martha Hernández. Facultad de Medicina, UNAM

MP-51

Homologue sequences to Iron Regulatory Protein in *Giardia duodenalis* genome. **Laura Yuliana, Plata-Guzmán**, Liliانا, Soto-Castro, Milagro de Jesús, Luque-Ramírez, Jeanett, Chávez-Ontiveros, Héctor Samuel, López-Moreno, Rossana, Arroyo, Cuauhtémoc, Reyes-Moreno, Jorge, Milán-Carrillo, José Antonio, Garzón-Tiznado, Claudia del Rosario, León-Sicairos. Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa

MP-52

Physiological and molecular analysis of *Sclerotium cepivorum* Berk mutant not forming sclerotia. **Sandra Elizabeth González Hernández**, Cesar Arturo Ojeda Gutiérrez, Edgar Reyes Navarrete, Alberto Flores Martínez, Patricia Ponce Noyola. Universidad de Guanajuato

MP-53

Identification of a casein kinase 2(TvCK2) in *Trichomonas vaginalis*. **Laura Itzel Quintas-Granados**, María Elizabeth Álvarez-Sánchez. Autonomous University of Mexico City (UACM)

BArtículos científicos en revisión

- 1.- **Plata-Guzmán LY**, Puga-Barraza F, López Moreno HS, León-Sicairos N, Chávez-Ontiveros J, Garzón-Tiznado JA, Arroyo R and León-Sicairos C. *2015 (en revisión). Stem-loop structures in the parasite *Giardia duodenalis*. *Microbiology*.

- 2.- Hernández- Peña J, **Plata-Guzmán LY**, Figueroa-Angulo EE, Soto-Castro L, Calla-Choque JS, Puga-Barraza F, Reyes-López M, De la Garza M, León-Sicairos N, Garzón-Tiznado JA, Arroyo R y León-Sicairos CR. 2015 (en revisión). Evidence of Iron-Responsive Elements in the parasite *Entamoeba histolytica*. *Biometals*.

Title Stem-loop structures in the parasite *Giardia duodenalis*.

Authors Laura Yuliana Plata-Guzmán, Francisco Puga-Barraza, Héctor Samuel López Moreno, Nidia León-Sicairos, Jeanett Chávez-Ontiveros, José Antonio Garzón-Tiznado, Rossana Arroyo, and Claudia León-Sicairos.*

Affiliations

L. Y. Plata-Guzmán. F. Puga-Barraza. Héctor Samuel López Moreno J.A. Garzón-Tiznado
Programa Regional del Noroeste para el Posgrado en Biotecnología de la Facultad de
Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Av. de las Américas y
Josefa Ortíz (Cd. Universitaria) Culiacán, Sinaloa 80030, México.

R. Arroyo

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de
Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), Avenida Instituto Politécnico Nacional
No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco. México, D.F. 07360. México.

Nidia León-Sicairos

Unidad de Investigación. Facultad de Medicina. Programa Regional del Noroeste para el
Posgrado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad
Autónoma de Sinaloa. Av. de las Américas y Josefa Ortíz (Cd. Universitaria) Culiacán,
Sinaloa 80030, México.

*Correspondence should be addressed to Claudia León Sicairos

Programa Regional del Noroeste para el Posgrado en Biotecnología de la Facultad de
Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Av. de las Américas y
Josefa Ortíz (Cd. Universitaria) Culiacán, Sinaloa 80030, México.

e-mail: claudialeonsicairos@uas.edu.mx

BioMetals

Evidence of Iron-Responsive Elements in the parasite *Entamoeba histolytica* --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Evidence of Iron-Responsive Elements in the parasite <i>Entamoeba histolytica</i>
Article Type:	Original
Keywords:	Iron posttranscriptional regulation; Iron-Responsive Element (IRE); Iron Regulatory Protein (IRP); <i>E. histolytica</i> .
Corresponding Author:	CLAUDIA LEÓN SICAIROS, PhD Universidad Autonoma de Sinaloa CULIACAN, SINALOA MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidad Autonoma de Sinaloa
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	JORGE HERNÁNDEZ-PEÑA, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	JORGE HERNÁNDEZ-PEÑA, M.D.
	LAURA YULIANA PLATA-GUZMÁN
	ELISA ELVIRA FIGUEROA-ANGULO, PhD
	LILIANA SOTO-CASTRO, M.D.
	JAESON SANTOS CALLA-CHOQUE, PhD
	FRANCISCO PUGA-BARRAZA
	MAGDA REYES-LÓPEZ, PhD
	MIREYA DE LA GARZA, PhD
	NIDIA LEÓN-SICAIROS, PhD
	JOSÉ ANTONIO GARZÓN-TIZNADO, PhD
	ROSSANA ARROYO, PhD
	CLAUDIA LEÓN SICAIROS, PhD