



00377

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

REACTIVIDAD DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNAS
DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE
Giardia lamblia A AGENTES DERIVATIZANTES
ESPECÍFICOS DE CISTEÍNA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)
P R E S E N T A :
SERGIO ENRÍQUEZ FLORES

DIRECTOR DE TESIS: DR. HORACIO REYES VIVAS

MÉXICO, D.F.



NOVIEMBRE, 2005

0350020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo reespolonal.

NOMBRE: Sergio Enríquez Flores

FECHA: 12-NOV-05

FIRMA: [Firma]

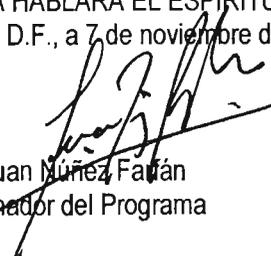
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 24 de enero del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **ENRÍQUEZ FLORES SERGIO** con número de cuenta **89166512** con la tesis titulada: **Reactividad de los residuos de cisteínas de la triosafosfato isomerasa de Giardia lamblia a agentes derivatizantes específicos de cisteína**, bajo la dirección del(a) **Dr. Horacio Reyes Vivas**.

Presidente:	Dra. Marietta Tuena de Gómez Puyou
Vocal:	Dra. Georgina Garza Ramos Martínez
Secretario:	Dr. Horacio Reyes Vivas
Suplente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente:	Dr. Gabriel López Velázquez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 7 de noviembre del 2005


Dr. Juan Núñez Falcón
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Agradezco a los miembros del Comité Tutorial, por las sugerencias y aportaciones realizadas para el enriquecimiento de este trabajo

Dra. Marietta Tuena de Gómez Puyou

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dr. Horacio Reyes Vivas

Así mismo, agradezco a los miembros del jurado por sus acertados comentarios en la revisión de esta tesis.

Dra. Georgina Garza Ramos Martínez

Dr. Gabriel López Velázquez

El presente trabajo se llevo a cabo con la ayuda del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de los Proyectos J37071-B y J43022-M. Dicha institución también otorgo una beca para estudios de Maestría que abarcó desde Agosto de 2002 hasta Agosto de 2004.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica Genética del Instituto Nacional de Pediatría S. S.

DEDICATORIA

Esta tesis esta dedicada a la memoria de *Ángela Flores Torres* y *Elvira Enríquez Flores* por su apoyo y ejemplo como madre y hermana.

A mi esposa *María Felix Ramos Ordoñez* por ser el motor que impulsa mi vida.

A mis hermanos *Irma, Norma, Alberto, Carmela, Raymundo* y *Miguel Ángel* porque me han apoyado y han creído en mi.

A todos y cada uno de **Mis sobrinos** de los que espero tomen este esfuerzo como un ejemplo para su futuro.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Ángela y Antonio por todo el apoyo que me brindaron para llevar a buen término mi carrera.

A mi esposa Mary por todos los momentos buenos que hemos compartido y aquellos detalles que me han hecho valorarla aun más.

A mis hermanos por su apoyo incondicional y por la unión existente entre nosotros.

A mi suegra Ana por esos ricos platillos que prepara especialmente para mí.

A cada uno de los integrantes del laboratorio de Bioquímica Genética: **Gloria** Hernández Alcántara, **Ignacio** de la Mora de la Mora, **Sara** Navarrete y **Carmen** Ortiz por sus consejos y colaboración en la parte experimental, así como por su gran amistad.

A Dora Molina Ortiz y **César** Guerrero, dos muy buenos amigos de la Maestría con los que he compartido tres años de sinceridad y buenos momentos.

A Bruno Islas por ser un gran brother, gracias por tu amistad.

A Nallely Cabrera por todas sus sugerencias y por tenderme la mano cuando lo necesité.

Muy especialmente a **Horacio Reyes** y **Gabriel López** quienes además de haberme enseñado sobre biología molecular y bioquímica, me han cultivado en muchos otros aspectos demostrándome su gran calidad humana.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
Abreviaturas	iii
RESÚMEN	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Problemática actual de la giardiasis	1
1.2 Generalidades de <i>G. lamblia</i> (morfología y ciclo de vida)	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Enzimas de la glucólisis como blanco para el diseño de compuestos antiparasitarios	4
2.2 Estructura de la TIM	6
2.3 La interfase como sitio blanco en algunas TIM	8
2.4 Algunas Cys como blanco en la inactivación de TIM	9
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo general	13
3.2 Objetivos particulares	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1 Reactividad de la GITIM a agentes derivatizantes de Cys	14
4.1.1 Determinación de la actividad enzimática	14
4.2 Determinación del número de Cys derivatizadas	15
4.3 Doble marcaje con MMTS, DTNB y determinación del número de Cys	16
4.3.1 Determinación de la concentración de proteína	17
4.4 Mutagénesis dirigida por PCR	17
4.4.1 Clonación del gen mutado en el vector de sobre-expresión	21
4.4.2 Expresión y purificación de las enzimas recombinantes de la GITIM	22
4.5 Experimentos realizados con las mutantes construidas	23

4.6	Efectos de un agente reductor en la GITIM incubada con DTNB y MMTS	23
4.7	Determinación del estado oligomérico y actividad en la GITIM silvestre, incubada con los derivatizantes a distintas relaciones estequiométricas	24
4.8	Fluorescencia intrínseca	24
4.9	Determinación del patrón de corrimiento de la GITIM silvestre incubada con MTSCE, en geles nativos	25
4.10	Determinación del área accesible al solvente de los residuos de Cys de GITIM	26
5.	RESULTADOS	27
5.1	Inactivación de GITIM silvestre por derivatización de Cys	27
5.2	Cuantificación de Cys y determinación de actividad en la GITIM silvestre	30
5.3	Doble marcaje con MMTS y DTNB, medición de la actividad y determinación del número de cisteínas en la GITIM	31
5.4	Reactividad de las mutantes de la GITIM a los agentes derivatizantes de Cys DTNB, MTSCE y MMTS	32
5.5	Efecto del DTT en la GITIM incubada con DTNB y MMTS	36
5.6	Datos estructurales	37
5.6.1	Determinación del estado oligomérico y porcentaje de actividad en la GITIM, incubada con los derivatizantes a distintas relaciones estequiométricas	38
5.6.2	Fluorescencia intrínseca de la GITIM silvestre	40
5.6.3	Determinación del patrón de migración en GITIM mediante gel nativo	41
6.	DISCUSIÓN	42
6.1	La Cys222 de la GITIM es un sitio blanco para la inactivación de la enzima	42
6.2	La disociación del dímero no es responsable de la inactivación en la GITIM	44
6.3	Análisis de la GITIM derivatizada con MTSCE	45
7.	CONCLUSIONES	46
8.	REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Estructura del metronidazol.	1
2. Ciclo de vida del parásito <i>Giardia lamblia</i> .	2
3. Pasos de la glucólisis.	5
4. Estructura de la triosafosfato isomerasa (TIM).	7
5. Reacción del PTTS con una Cys en su forma tiolato.	10
6. Alineamiento de la secuencia primaria de las TIM de <i>G. lamblia</i> , <i>E. histolytica</i> , humano, <i>T. brucei</i> , <i>T. cruzi</i> y <i>L. mexicana</i> .	12
7. Reacción acoplada en dirección GAP a DHAP.	15
8. Reacción del DTNB con un grupo sulfhidrilo de una Cys.	16
9. Pasos de PCR.	19
10. Inactivación de la GITIM en función de la concentración de DTNB.	27
11. Inactivación de la GITIM incubada con MTSCE.	28
12. Inactivación de la GITIM con distintas concentraciones de MMTS.	29
13. Doble marcaje con MMTS y DTNB.	31
14. Porcentaje de actividad residual de la GITIM silvestre y mutantes, incubadas con DTNB.	33
15. Porcentaje de actividad remanente de las enzimas silvestre y mutantes tratadas con concentraciones crecientes de MTSCE.	34
16. Porcentaje de actividad residual en las enzimas silvestre y mutantes, a distintas concentraciones de MMTS.	35
17. Recuperación de la actividad empleando DTT en la GITIM pretratada con DTNB.	36
18. Reversibilidad en la inactivación de GITIM con MMTS.	37
19. Relación entre el porcentaje de actividad y el estado oligomérico en la GITIM.	38
20. Espectro de emisión de fluorescencia.	40
21. Gel nativo de la GITIM incubada 1h a 25°C con distintas relaciones estequiométricas MTSCE:monómero.	41
22. Estructura de una de las subunidades de la GITIM en representación de listones.	43

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
1. Posición de los residuos de Cys y Met en la estructura primaria en las TIM de algunos organismos.	8
2. Porcentaje de actividad de algunas TIM al incubarse con el PTTS.	10
3. “ <i>Primers</i> ” utilizados y su secuencia.	20
4. Condiciones de PCR.	20
5. Reacciones de los derivatizantes con Cys.	30
6. Número de Cys por monómero de GITIM que derivatizó cada compuesto.	30
7. Número de Cys por monómero de GITIM obtenidas con el doble marcaje.	32
8. Constantes cinéticas de las mutantes construidas de GITIM.	33
9. Cys derivatizadas con DTNB y porcentaje de actividad residual de la GITIM determinadas a distintas relaciones estequiometricas.	39
10. Cys derivatizadas a distintas relaciones estequiometricas con MTSCE.	39

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
TIM ó TPI	Triosafosfato isomerasa
GAP	Gliceraldehído 3-fosfato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
ATP	Trifosfato de adenosina
GiTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Giardia lamblia</i>
TbTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
TcTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
PfTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Plasmodium falciparum</i>
Cys	Cisteína
Met	Metionina
Ala	Alanina
PTTS	Fenil-tolueno tiosulfonato
MMTS	Metilmetano-tiosulfonato
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico
MTSCE	2-carboxietil metano tiosulfonato
DTT	Ditio treitol
C14	Cisteína 14
C127	Cisteína 127
C202	Cisteína 202
C222	Cisteína 222
C228	Cisteína 228
TE	Trietanolamina + EDTA
NADH	Dinucleótido de niacina y adenina
Rpm	Revoluciones por minuto
TNB	Ácido 2-nitrotiobenzóico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

ASA

K_m

k_{cat}

C(14, 127, 202, 222 y 228)A

Área accesible al solvente

Constante de Michaelis-Menten

Constante catalítica

Mutantes de GITIM, donde se sustituyó una Ala por una Cys

RESUMEN

Giardia lamblia agente causal de la giardiasis tiene una amplia distribución mundial. Esta enfermedad es controlada con fármacos derivados del nitroimidazol. Sin embargo hay reportes de cepas resistentes a tales compuestos, así como efectos secundarios en distintas variedades de células humanas evaluadas. Además el mecanismo de acción de esas drogas que operan en *G. lamblia* no ha sido completamente establecido. Por tanto es necesario explorar alternativas anti-giardiasis, donde exista gran selectividad por el parásito, disminuyendo los efectos secundarios del hospedero. La triosafosfato isomerasa (TIM) enzima que pertenece a la vía glucolítica, se ha considerado como blanco para el diseño de antiparasitarios de patógenos como *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi*, *Entamoeba histolytica* y *Plasmodium falciparum*.

Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar funcional y estructuralmente la TIM recombinante de *G. lamblia* (GITIM) frente a tres derivatizantes específicos de cisteínas: DTNB, MMTS y MTSCE.

El DTNB y MTSCE disminuyeron 90 % la actividad, mientras que el MMTS inactivó aproximadamente 50 %. Se cuantificaron el número de Cys/momómero que cada compuesto derivatizó: el DTNB y el MTSCE modificaron 4 y el MMTS 3. El DTNB fue el único que disoció a la enzima, esto como un evento posterior a su inactivación.

Al incubar a GITIM primero con MMTS y posteriormente con DTNB, la actividad se mantuvo alrededor del 50 %. Esto se interpretó como que el MMTS derivatiza las mismas Cys que el DTNB, por lo que al bloquear con MMTS se previene el efecto inactivador y de disociación del DTNB. Para conocer la contribución de cada Cys en la inactivación, se generaron cinco mutantes sencillas de Cys por Ala y se expusieron a concentraciones crecientes de los agentes alquilantes. Las mutantes C14A, C127A, C202A y C228A se inactivaron cerca del 100%, similar a lo que ocurrió con la enzima silvestre. Con distintas concentraciones de MMTS, la C202A y C228A se inactivaron aproximadamente 50 %, mientras que la C14A se inactivó 35 % y la C127A 40 %. La C222A no se inactivó con ninguno de los compuestos.

CONCLUSIONES: La modificación química de la C222 es fundamental para inducir la inactivación de la enzima, sugiriendo ser un blanco promisorio en el diseño de algún compuesto que inactive a GITIM sin perturbar la TIM de humano. Otro(s) residuo(s) de Cys también podrían ser considerados como un blanco secundario o en sinergia con el residuo 222.

ABSTRACT

Giardia lamblia, the causative agent of giardiasis, has a worldwide distribution. This sickness is treated with drugs derivatives of nitroimidazol. Nevertheless, there are reports of resistant strains to these compounds as well as secondary effects over different varieties of human cells essayed. In addition the mechanism of action al which these drugs operate in *G. lamblia* has not been fully established. The aforementioned promotes to search alternative routes for the design of more selective anti giardial drugs. Triosephosphate isomerase (TIM) is an enzyme that belongs to the glycolytic pathway, this enzyme has been considered as target for the design of antiparasitics drugs against pathogenic organisms like *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi*, *Entamoeba histolytica* and *Plasmodium falciparum*.

The objective of this work was characterized functionally and structurally the recombinant TIM from *G. lamblia* (GITIM), exposed to three different agents: DTNB, MMTS and MTSCE. All of them derivatized specifically Cys residues.

DTNB and MTSCE induced an inactivation close to 90 %, whereas only decayed near of 50 % with MMTS. We quantified the number of cysteines modified by each compound: DTNB and MTSCE derivatized 4 Cys/monomer, MMTS modified 3 Cys/monomer. DTNB induced dissociation of the enzyme, such effect however was afterward of the enzyme inactivation. When GITIM was first incubated with MMTS followed by the addition of DTNB, the activity was preserved close to 50 %. This data suggest that MMTS and DTNB derivatized the same Cys, consequently, blocking the Cys with MMTS there is a protection against both, the inhibitory and the dissociation effect of DTNB. To investigate the contribution of each Cys derivatized, we constructed five single mutants in which each Cys was changed by Ala. The mutants were exposed to different concentrations of DTNB and MTSCE. Analysis of their residual activity showed that the variants C14A, C127A, C202A and C228A, were completely inactivated, similar to occurred in wtGITIM. The incubation of variants with MMTS showed that C202A and C228A were inactivated near to 50 %, whereas the activity of C14A and C127A only decreased 35 % and 40 % respectively. For the case of mutant C222A, there was not exhibited inactivation with anyone of the compounds analyzed.

CONCLUSIONS: The chemical modification of C222 of GITIM is essential to induce the inactivation of the enzyme, suggesting to this residue as promissory target for drug design. Others Cys residues also could be considered like a secondary target or in synergy with the C222.



1. INTRODUCCION

1.1 PROBLEMÁTICA ACTUAL DE LA GIARDIASIS.

Las parasitosis intestinales son un problema serio en cuanto a salud pública se refiere. Dentro de este tipo de infecciones, *Giardia lamblia*, el agente causal de la giardiasis, es uno de los principales protozoarios intestinales causantes de la diarrea en humanos (Ish *et al.*, 1989; Walterspiel *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1996). En el año 2002 *G. lamblia* ocasionó 1000 millones de infecciones a nivel mundial (Wright *et al.*, 2003), siendo la población infantil la más susceptible y los países en desarrollo los más afectados.

En México, la giardiasis se considera dentro de las primeras 20 causas de enfermedad generadas por parásitos intestinales, representando un importante problema de salud pública debido a su elevada frecuencia (Moya-Camarena *et al.*, 2002).

Los fármacos que generalmente se utilizan para combatir la giardiasis son los derivados del nitroimidazol y de entre estos, el metronidazol (2-metil-5-nitroimidazol-1-etanol) es el más utilizado. Otras drogas incluyen los mebendazoles, la quinacrina y la furazolidona.

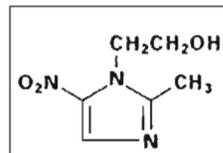


Figura 1. Estructura del metronidazol.

La efectividad del metronidazol contra diversas infecciones de bacterias intestinales se evidenció a partir de 1955, pero fue hasta 1959 cuando Durel y colaboradores, descubrieron que eliminaba los trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica*. Darbon y colaboradores en 1962, reportaron que podía utilizarse para tratar la giardiasis. Cabe mencionar que el metronidazol sólo es efectivo en los trofozoítos y no en los quistes (ver ciclo de vida Fig. 2) (Paget *et al.* 1989).

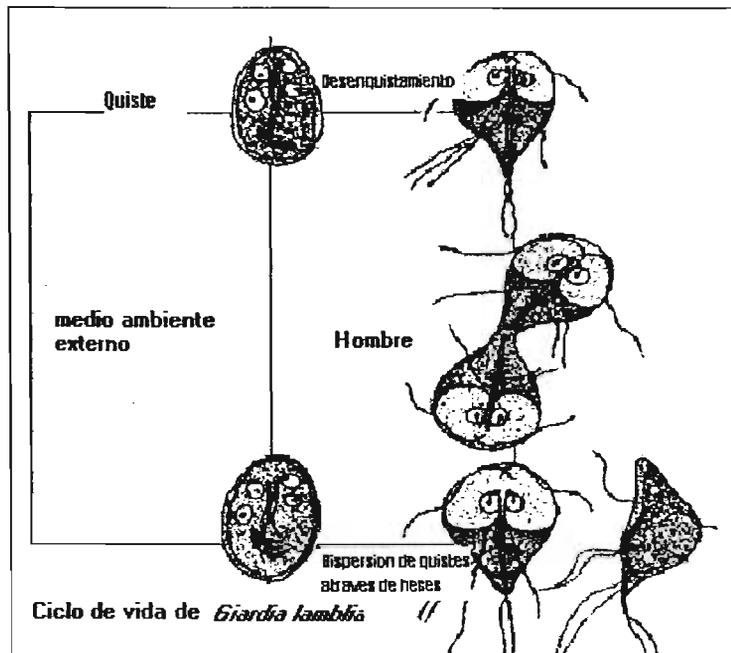


Figura 2. Ciclo de vida del parásito *Giardia lamblia*. Tomado de la página de internet: <http://www.soton.ac.uk/~ceb/Diagnosis/Vol3.h2.gif>

Aunque no se conoce de forma precisa el mecanismo de acción del metronidazol, se sabe que una vez reducido por la piruvato ferredoxin oxido-reductasa (PFOR), enzima que dona un electrón al grupo nitro del 5-nitroimidazol, el nitro anión-radical producido puede formar compuestos citotóxicos (Lloyd y Pendersen, 1985), dañando al ADN del parásito, posteriormente se genera un entrecruzamiento de hebras de ADN, desapareadas de forma azarosa (Muller 1983; Edwards 1986). Como consecuencia de lo anterior, se inhibe la segregación del ADN y se modifican los genes involucrados en la terminación de la división celular. La evidencia experimental que apoya esta teoría fue que el metronidazol tiene la habilidad en *G. intestinalis* de detener el ciclo celular en el estado G2+M (Hoyne *et al.*, 1989). Sin embargo, se ha demostrado que el metronidazol causa además mutaciones en bacterias del género *Salmonella* e induce tumores en roedores (Legator *et al.*, 1975). Por otro lado, existen reportes de daño genotóxico y citotóxico *in vitro* sobre linfocitos humanos de sangre periférica (López-Nigro *et al.*, 2003). Más aún, se han reportado cepas de *G. lamblia* resistentes a este y otros fármacos, tanto *in vitro* como en la clínica (Upcroft, 1998). Por todo lo anterior surge la necesidad de buscar alternativas para combatir la giardiasis y a este respecto el diseño racional de fármacos específicos de especie podría ser una herramienta eficiente para lograrlo.



El diseño racional de fármacos específicos de especie, se basa en la búsqueda de residuos de aminoácidos no conservados, que sean centrales para la estabilidad y catálisis de una enzima, más adelante se abordará este punto con más detalle.

1.2 GENERALIDADES DE *Giardia lamblia*

Morfología y ciclo de vida.

Giardia lamblia (sinónimos: *G. intestinalis* y *G. duodenalis*) se ha clasificado en la siguiente forma: phylum *Sarcomastigophora*, clase *Zoomastigophorea*, orden *Diplomonadida*, familia *Hexamitidae* que incluye al género *Giardia* (Levine *et al.*, 1980). Se han descrito varias especies de *Giardia* en donde se consideran criterios como: especificidad del hospedero, dimensiones del cuerpo y las variaciones en la morfología que ayuden a diferenciar al parásito. Utilizando este criterio se tienen las siguientes especies: *G. agilis* que infecta anfibios, *G. muris* que infecta a roedores, aves y reptiles, y *G. lamblia* que infecta una gran variedad de vertebrados incluyendo al hombre (Adam, 2001).

El ciclo de vida de *G. lamblia* consta de dos fases: una vegetativa de trofozoíto y otra infectiva de quiste (Fig. 2). El trofozoíto que coloniza el intestino del hospedero, mide de 12 a 15 μm de largo por 5 a 9 μm de ancho. Se caracteriza por ser binucleado, con cuatro pares de flagelos distribuidos en las regiones antero-lateral, postero-lateral, caudal y ventral. Además posee un disco ventral que le permite adherirse al epitelio intestinal del hospedero. El quiste tiene apariencia ovoide, mide de 6 a 10 μm de longitud, puede ser bi o tetranucleado (dependiendo si ha tenido lugar la división celular). Está limitado por una pared compuesta de carbohidratos y proteínas que le confieren resistencia a las condiciones medioambientales. Con base en la comparación de secuencias de ARNr, molécula altamente conservada entre las especies (Sogin *et al.*, 1989) se considera que *G. lamblia* es un eucarionte de divergencia temprana.

Por mucho tiempo se consideró a *G. lamblia* como un eucarionte amitocondriado, hasta que Tovar y colaboradores en el 2003 demostraron la presencia de reductos mitocondriales denominados mitosomas. A pesar de la existencia de mitosomas, *G. lamblia* no presenta fosforilación oxidativa, por lo que obtiene su ATP principalmente de la vía glucolítica. Aunque se ha demostrado que el metabolismo de la arginina también produce energía (Edwards *et al.*, 1992), esta no representa una fuente importante. Por todo lo anterior,



sugerimos que las enzimas de la glucólisis en *G. lamblia* pueden ser un buen blanco para dirigir compuestos que logren abatir al parásito.

Antes de discutir esta estrategia, cabe mencionar que se han reportado otros estudios donde se propone como blanco a moléculas exclusivas del parásito en cuestión. Como ejemplo está la tripanotión reductasa, presente en *Trypanosoma cruzi* pero ausente en el hombre. Esta situación se trató de aprovechar para desarrollar fármacos altamente específicos. No obstante al evaluar, Tovar y Fairlamb en 1996 moléculas que inhibían *in vitro* a esta enzima, encontraron que no eran efectivas *in vivo*. Para el caso de *G. lamblia* esta estrategia no se ha explorado.

2. ANTECEDENTES

2.1 ENZIMAS DE LA GLUCÓLISIS COMO BLANCO PARA EL DISEÑO DE COMPUESTOS ANTIPARASITARIOS.

En 1998 Eisenthal y Cornish-Bowden realizaron un estudio teórico de la inhibición de las enzimas de la glucólisis de *T. brucei*, con el propósito de determinar si estas podían ser blancos adecuados para diseñar inhibidores. De éste trabajo se concluyó que ningún inhibidor de tipo competitivo sería exitoso para abatir alguna de las enzimas de esta vía. En cambio, un inhibidor del tipo acompetitivo contra el transportador del piruvato, podría tener posibilidades de éxito. Por otra parte, un inactivador con buena eficiencia, que no compitiera por el sitio activo de una enzima tendría mayores probabilidades de éxito.

Una enzima que pertenece a la vía glucolítica es la triosafosfato isomerasa (TIM o TPI), la cual cataliza la interconversión entre la DHAP y el GAP (ver Fig. 3). Esta enzima ha sido ampliamente estudiada y se considera como un catalizador perfecto, ya que su catálisis se encuentra limitada sólo por la difusión de los sustratos (Stroppolo *et al.*, 2001). La TIM es un homodímero en la mayoría de las especies, cada subunidad esta formada de aproximadamente 250 residuos aminoácidos. No obstante, se ha reportado la presencia de tetrámeros en *Pyrococcus woesei*, *Methanothermus fervidus* (Kohlhoff *et al.*, 1996), *Thermotoga maritima* (Beauchamp *et al.*, 1997) y *Thermoproteus tenax* (Walden *et al.*,



sugerimos que las enzimas de la glucólisis en *G. lamblia* pueden ser un buen blanco para dirigir compuestos que logren abatir al parásito.

Antes de discutir esta estrategia, cabe mencionar que se han reportado otros estudios donde se propone como blanco a moléculas exclusivas del parásito en cuestión. Como ejemplo está la tripanotión reductasa, presente en *Trypanosoma cruzi* pero ausente en el hombre. Esta situación se trató de aprovechar para desarrollar fármacos altamente específicos. No obstante al evaluar, Tovar y Fairlamb en 1996 moléculas que inhibían *in vitro* a esta enzima, encontraron que no eran efectivas *in vivo*. Para el caso de *G. lamblia* esta estrategia no se ha explorado.

2. ANTECEDENTES

2.1 ENZIMAS DE LA GLUCÓLISIS COMO BLANCO PARA EL DISEÑO DE COMPUESTOS ANTIPARASITARIOS.

En 1998 Eisenthal y Cornish-Bowden realizaron un estudio teórico de la inhibición de las enzimas de la glucólisis de *T. brucei*, con el propósito de determinar si estas podían ser blancos adecuados para diseñar inhibidores. De éste trabajo se concluyó que ningún inhibidor de tipo competitivo sería exitoso para abatir alguna de las enzimas de esta vía. En cambio, un inhibidor del tipo acompetitivo contra el transportador del piruvato, podría tener posibilidades de éxito. Por otra parte, un inactivador con buena eficiencia, que no compitiera por el sitio activo de una enzima tendría mayores probabilidades de éxito.

Una enzima que pertenece a la vía glucolítica es la triosafosfato isomerasa (TIM o TPI), la cual cataliza la interconversión entre la DHAP y el GAP (ver Fig. 3). Esta enzima ha sido ampliamente estudiada y se considera como un catalizador perfecto, ya que su catálisis se encuentra limitada sólo por la difusión de los sustratos (Stroppolo *et al.*, 2001). La TIM es un homodímero en la mayoría de las especies, cada subunidad esta formada de aproximadamente 250 residuos aminoácidos. No obstante, se ha reportado la presencia de tetrámeros en *Pyrococcus woesei*, *Methanothermus fervidus* (Kohlhoff *et al.*, 1996), *Thermotoga maritima* (Beauchamp *et al.*, 1997) y *Thermoproteus tenax* (Walden *et al.*,



2004). Se debe hacer notar que todos los anteriores son organismos hipertermofílicos y que sólo en el caso de *T. tenax* coexisten tetrámero y dímero, aunque el dímero es inactivo.

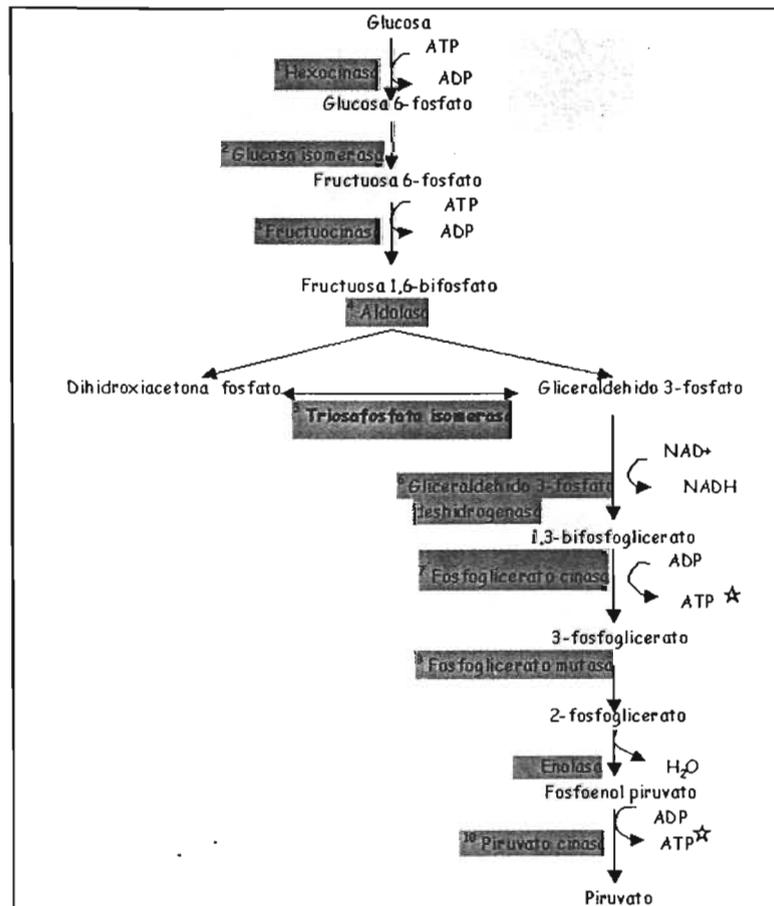


Figura 3. Pasos de la glucólisis. Se muestran los reactivos involucrados, así como las enzimas participantes (en gris sombreado).

En el 2004 se caracterizó la TIM recombinante de *G. lamblia*, demostrándose la coexistencia de dímero y tetrámero, ambos con actividad catalítica (López-Velázquez *et al.*, 2004). Esto es poco convencional, si se considera además, que es el único organismo mesofílico donde se ha reportado la presencia de tetrámero.

Aunque el gen de la TIM de *G. lamblia* fue clonado por complementación en células de *Escherichia coli* desde 1994 por Mowatt y su grupo, sólo recientemente el grupo de López-Velázquez logró caracterizar la enzima ampliamente, determinando algunos de sus parámetros cinéticos.

La importancia de la TIM en la glucólisis radica en la aportación de una molécula más de GAP (generando 2 moléculas de GAP por cada molécula de glucosa que entra a la vía),



sustrato para la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (enzima que lleva a cabo la sexta reacción de la glucólisis). En consecuencia, esta aportación “extra” de GAP permite la producción neta de 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa que se procesa en la glucólisis (ver Fig. 3). Una TIM ausente o inactiva, daría como resultado el consumo de glucosa sin ganancia neta de ATP. Por tanto, un organismo que basa su metabolismo en esta vía, vería seriamente amenazada su existencia. Esta conclusión es de particular importancia en *G. lamblia*, que es un organismo microaerofílico que depende en gran medida de la energía que le proporciona la glucólisis. Así, la TIM de este parásito se puede proponer como un blanco adecuado para el diseño de algún antiparasitario.

En el 2001 Compagno y colaboradores reportaron una mutante de *Saccharomyces cerevisiae*, con el gen de la TIM truncado. Al incubar esta mutante en un medio conteniendo como única fuente de carbono a la glucosa, fue incapaz de crecer. Sin embargo la adición de etanol o acetato, así como de rafinosa o galactosa al medio con glucosa revirtió el efecto, logrando un crecimiento apreciable. Aunque este experimento no es determinante, sugiere que la ausencia de la TIM podría traer consecuencias negativas en la obtención de ATP en células donde la glucólisis sea importante como fuente productora de energía.

Por otro lado, también se han reportado personas con deficiencia de la TIM. En tales casos se produce una anemia hemolítica crónica, así como degeneración neuromuscular progresiva, llegando inclusive a la muerte del paciente (Ahmad *et al.*, 2003). Estos datos en su conjunto muestran que la TIM es una enzima importante para el mantenimiento de la homeostasis celular.

2.2 ESTRUCTURA DE LA TIM.

La TIM esta codificada por un sólo gen. Cada subunidad o monómero de la enzima está formada por ocho hebras- β plegadas centrales, rodeadas por ocho hélices- α , las cuales se conectan a través de asas, aunque en ocasiones se encuentra presente un asa dentro de una hélice. La presencia de hélices- α y de hebras- β (Figura 4) representan un patrón de plegamiento que se conoce como dominio barril α/β o barril TIM (Banner *et al.*, 1975).

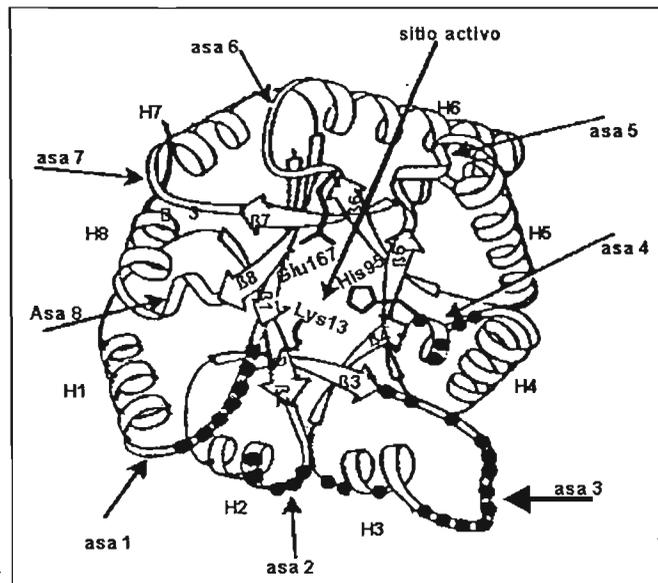


Figura 4. Estructura de la triosafosfato isomerasa (TIM). Se muestra el número y posición de las estructuras α -helices y β -plegadas y se indica la posición y los aminoácidos que constituyen el sitio catalítico.

El sitio catalítico de estas enzimas se localiza en la parte central del barril, siendo una región muy conservada, formada por los aminoácidos: Lys 13, His 95 y Glu 168 (de acuerdo a la numeración de *T. brucei*). Aunque pueden variar un poco en posición, esta triada catalítica se ha conservado estrictamente a través de la evolución.

Cada subunidad del dímero tiene un sitio catalítico independiente. A pesar de esto el monómero aislado no es activo, requiriendo de la dimerización para obtener una enzima catalíticamente activa (Waley, 1973; Casal *et al.*, 1987). Lo anterior implica que la interfase o sitio de contacto entre los dos monómeros, es importante para la funcionalidad de la enzima. Las uniones presentes en esta región son del tipo no covalente, como interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno. En la TIM de *T. brucei* (TbTIM) por ejemplo, la interfase esta formada por 32 residuos aminoaciles (Wierenga *et al.*, 1992), distribuidos en las asas 1 a la 4 (Fig. 4). Los aminoácidos involucrados en la formación de la interfase no se conservan a lo largo de la evolución, por lo que es una zona de baja identidad.

Un residuo aminoacil perteneciente a la interfase que ha sido estudiado extensivamente es la Cys en posición 14. Trabajos realizados desde 1995 (ver más adelante) han propuesto a este residuo como blanco para inactivar varias TIM.



2.3 LA INTERFASE COMO SITIO BLANCO EN ALGUNAS TIM.

En un estudio desarrollado en 1995, Gómez-Puyou y colaboradores demostraron que es posible inactivar de forma específica de especie a la TIM. La hipótesis planteada establecía que, considerando la existencia de residuos aminoácidos no conservados entre organismos patógenos y hospederos, que fueran además relevantes para mantener la actividad y/o estructura de la enzima, entonces tales residuos podrían aprovecharse para desarrollar compuestos inactivadores específicos de especie.

Este grupo logró inactivar a la TbTIM usando cloramina T (CAT), compuesto que derivatiza (modifica químicamente) residuos de Cys y Met. Previamente Zubillaga y colaboradores en 1994 demostraron que, utilizando este mismo compuesto, la TIM de conejo se inactivaba completamente, en tanto que la TIM de levadura sólo se inactivó un 50 %. Al analizar el contenido de residuos de Cys y Met de cada enzima, se puede observar que hay dos residuos de Cys en la TIM de levadura equivalentes en posición a las Cys de la TIM de conejo: 42 y 126 (Tabla 1).

Posiciones de Cys y Met					
Cys			Met		
Conejo	<i>Trypanosoma</i>	Levadura	Conejo	<i>Trypanosoma</i>	Levadura
41	14 39	42	14	50	
66			82		
86				122	
126 217	126	126			

Tabla 1. Posición de los residuos de Cys y Met en la estructura primaria en las TIM de algunos organismos. Tomada de Gómez-Puyou *et al.*, 1995.

En cambio la TIM de conejo tiene tres residuos de Cys y dos de Met que no están presentes en la TIM de levadura. Estos resultados indicaron que la elevada sensibilidad de la TIM de conejo al CAT se debía a la oxidación de uno o varios residuos de Cys y Met que no contiene la levadura.

El citado trabajo demostró que al incubar TbTIM con CAT, esta se inactiva de forma muy similar a la TIM de conejo. Este dato sugirió que en las TIM de conejo y de *T. brucei* existe un residuo equivalente en posición que al modificarse con la CAT conlleva a su



inactivación. En cambio, la resistencia de la levadura al derivatizante se debería a la ausencia de dicho residuo.

La Tabla 1 muestra que el único residuo que la TIM de conejo y de *T. brucei* comparten en posición, es el 14. En TbTIM es una Cys mientras que en la de conejo es una Met, por lo que los autores concluyeron que la integridad del residuo en la posición 14 es esencial para mantener estable la actividad catalítica en ambas enzimas. Para corroborar esta teoría, se construyó una mutante donde se sustituyó la Cys 14 por una Leu en TbTIM. Esta enzima presentó una cinética alterada con tendencia hacia la agregación, sugiriendo que este residuo es importante para mantener la estabilidad de la enzima. A continuación evaluaron el efecto del MMTS (reactivo derivatizante de Cys) sobre la actividad de las TIM de: conejo, levadura, *Leishmania mexicana* (LmTIM) y maíz.

El MMTS es un compuesto que al reaccionar con una Cys en su forma de tiolato le adiciona un metil disulfuro, la Tabla 5 esquematiza lo anterior. Esta derivatización confiere a la Cys un grupo relativamente pequeño, y neutro. Las TIM de conejo y levadura fueron prácticamente insensibles a este compuesto, mientras que las de *L. mexicana* y maíz se inactivaron un 90 y 80 %, respectivamente. La Tabla 1 muestra la posición de las Cys en TIM de conejo y levadura, estos residuos también los comparten *L. mexicana* y maíz exceptuando el residuo de Cys 14 (siguiendo la numeración de *T. brucei*, que en LmTIM ocupa la posición 15 y la de maíz ocupa la 13). Los autores demostraron que la TbTIM también se inactivaba con MMTS, apoyando con esto último que el efecto inhibitor de este compuesto resulta de derivatizar la Cys 14.

A partir de estas investigaciones surgieron mas trabajos en otras TIM donde el centro de atención fue la Cys 14 de interfase.

2.4 ALGUNAS Cys COMO BLANCO EN LA INACTIVACION DE TIM.

En trabajos posteriores a los descritos anteriormente se evaluó la posibilidad de inhibir en forma específica de especie a TIM carentes del residuo Cys 14, pero que presentan otras Cys poco conservadas. Garza-Ramos y colaboradores en 1996 utilizaron el MMTS y el PTTS (reactivos específicos de Cys). Este último compuesto es relativamente más grande que el MMTS y tampoco confiere carga neta. La Figura 5 muestra la reacción.

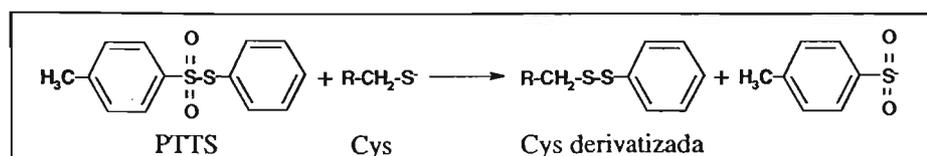


Figura 5. Reacción del PTTS con una Cys en su forma tiolato.

Al incubar la TIM de conejo con el MMTS, se inactivó de un 20 a 25 %. En contraste, el PTTS inactivó dicha enzima un 80 %. Estos resultados sugirieron que el grado de inactivación esta relacionado con el grupo derivatizante (metil- ó fenil-disulfuro). Aunado a esto el MMTS derivatiza 2 residuos, mientras que el PTTS derivatiza sólo 1 Cys. Al incubar dicha enzima con MMTS y después con el PTTS (doble marcaje), no se logró abatir la actividad más de lo previamente obtenido con el MMTS (20 % de inactivación). Esto demostró que el MMTS logró proteger a la enzima de la acción inactivadora por parte del PTTS; sugiriendo que ambos compuestos derivatizan la misma Cys. Con el propósito de identificar el sitio de acción del PTTS, este compuesto se incubó con otras TIM que tienen diferente contenido de Cys. La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos:

TIM	Porcentaje de actividad	Contenido de Cys/Monómero TIM
<i>S. cerevisiae</i>	100	42, 126
<i>E. coli</i>	100	36, 126, 143
Pollo	10	41, 66, 126, 216
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5-10	126, 216

Tabla 2. Porcentaje de actividad de algunas TIM al incubarse con el PTTS. Datos tomados de Garza-Ramos *et al.* 1996.

Como se observa en la Tabla anterior, las dos primeras TIM mantuvieron su actividad sin alteración, mientras que en las dos últimas la actividad disminuyó hasta un 90 o 95 %. Si se considera el contenido y posición de Cys, veremos que las TIM que tuvieron una fuerte inactivación comparten dos Cys (126 y 217). La primera de ellas (Cys 126) es estrictamente conservada y por tanto, puede ser descartada como responsable de la inactivación. Por tanto, la posible responsable de la inactivación de estas enzimas es la Cys 217. Además, los autores observaron que en la TIM de conejo, no obstante la derivatización de la Cys 217, el espectro de fluorescencia intrínseca de la enzima no presentó modificaciones. Adicionalmente, la inactivación se revirtió con el agente reductor DTT, a diferencia de la derivatización de la Cys 14 en TbTIM, donde fue irreversible. Estos datos sugirieron que la



derivatización de la Cys 217 por el PPTS, no causa perturbaciones estructurales tan extensas como las producidas por la modificación del residuo 14 que es parte de la interfase.

En un artículo posterior (Garza-Ramos *et al.*, 1998) se evaluó la diferencia en susceptibilidad a algunos derivatizantes de Cys, en TIM de los tripanosomátidos *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. mexicana*. Se observó que la TcTIM es 100 veces más susceptible que la TbTIM, tanto al DTNB (reactivo derivatizante de Cys) como al MMTS. Este dato es contrastante, pues entre TcTIM y TbTIM existe un 68 % de identidad en sus residuos aminoácidos. Es importante mencionar que a pesar de que TcTIM tiene un residuo adicional de Cys en la posición 117, se demostró que la elevada sensibilidad de TcTIM a los derivatizantes no se debía a la contribución de este residuo. Las diferencias se debían a la gran velocidad con que la Cys de interfase era derivatizada en TcTIM y no así en TbTIM. Sin embargo, no existe una respuesta satisfactoria del porque la Cys 14 de TcTIM es más reactiva que la correspondiente en TbTIM.

Si atendemos al planteamiento de Gómez-Puyou y colaboradores respecto a centrarse en los aminoácidos poco conservados, y con importancia para la catálisis y/o estabilidad enzimáticas, veremos que además de la Cys de interfase existen otras Cys en donde su perturbación conduce al abatimiento catalítico, tal es el caso de la Cys 217 que la poseen las TIM de *S. Pombe*, de pollo o bien de conejo. Actualmente no existen reportes donde se demuestre que la derivatización de otros residuos de Cys distintos a la Cys 14, conduzcan al abatimiento irreversible de la catálisis enzimática. Sin embargo en un estudio realizado por Maithal y colaboradores (2002) al derivatizar la TIM de *Plasmodium falciparum* con iodoacetamida y ácido iodoacético (compuestos que reaccionan con Cys), reportaron la secuencia de modificación química de las cuatro Cys que componen cada monómero. Así, identificaron que uno de los primeros residuos en derivatizarse es la Cys 196, siguiendo a su vez la Cys 13 y enseguida las Cys 217 y Cys 126. En este trabajo los autores identificaron a la Cys 13 como la responsable de la inactivación de PfTIM al derivatizarse. No obstante, los datos también sugieren que además de la Cys de interfase en las TIM que la poseen, podrían tomarse en consideración otros residuos de Cys como blancos. Actualmente no existen reportes sobre la TIM de *G. lamblia* en donde se haya considerado la posibilidad de inactivarla con compuestos selectivos para Cys, con el propósito de



proponerla como molécula blanco para el diseño de compuestos especie-específicos. La GITIM posee en su secuencia aminoácil cinco Cys que a continuación se presentan en alineamiento con otras TIM:

```

GITIM      -MPARRPFVGGNFKINGSLDFIKSHVAAIAA---HKIPDSVDVVIAPSAVHLSTAIAANT 56
HuTIM      MAPSRKFFVGGNWKINGRKQSLGELIGTLNA---AKVPADTEVVQAPPTAYIDFARQKLD 57
EhTIM      MG-AGKFVVGGNWKNGLTLASIEITLTKGVAASVDAELAKKVEVI VGVVPIYI PKVQQILA 59
TbTIM      -MSKPQPIAAANWKNINGSQQSLSELIDLFN---TSINHVDVQVVASTFVHLAMTKERLS 56
TcTIM      MASKPQPIAAANWKNINGSSELLVPLIETLNA---ATFDHDVQVVVAPTFLHIPMTKARLT 57
LmTIM      MSAKPQPIAAANWKNIGTTASIEKLVQVFNE---HTISHDVQVVVAPTFFVHIPLVQAKLR 57
          : . . . : * * * : . . . . . : : : . . . : : . . .

GITIM      S----KQLRIAQNIVYLEGNQAWTGETSVEMLQDMGLKHVIVGHSERRRIMGETDEQSAK 112
HuTIM      -----PKIAVAAQNIVYKVTNGAFTGEISPGMIKDCGATWVVLGHSERRHVPGESDELIGQ 112
EhTIM      GEANGANILVSAENAWTKS-GAYTGEVHVGMVLVDQVVPYVILGHSERRQIPHESNEQVAE 118
TbTIM      H----PKFVIAAQNAIAKS-GAFTGEVSLPILKDFGVNWIIVLGHSEERRAYYGETNEIVAD 111
TcTIM      N----PKFQIAAQNAITRS-GAFTGEVSLQILKDYGISWVVLGHSERRLYGETNEIVAE 112
LmTIM      N----PKYVISAENAIKAS-GAFTGEVSMPIKDIGVHWVILGHSEERRTYGETDEIVAQ 112
          : : : * : * * * * * : : * : : * * * * * * * * * * * * * * * *

GITIM      KAKRALEKGMTVIFVGETLDERKANRTMEVNIAQLEALGKELGESKMLWKEVVIAYEPV 172
HuTIM      KVAHALAELGLVIAICIGEKLDEREAGITEKVVFEQTKVIADNV---KDWKSVVLAYEPV 168
EhTIM      KVKVAIDAGLKVIAICIGETAQRIANQTEEVVAAQLKAINNAIS--KEAWKNII LAYEPV 176
TbTIM      KVAAAVASGFMVIAICIGETLQERESGRTAVVVLTOIAAIAKCLK--KADWAKVVIAYEPV 169
TcTIM      KVAQAIAAGFHVIVVGETNEEREAGRTAAVVLTLQAAVAQKLS--KEAWSRVVIAYEPV 170
LmTIM      KVSEAKKQGFVIAICIGETLQOREANQAKVVLSTSAIAAKLT--KDAWNQVVIAYEPV 170
          * . * * : * * * * * : * . . * * * * * : : : * : : * * * * *

GITIM      WSIGTG VATPEQAEEVHVLKRWFAEKVCAEGAQHIRIIYGGSSANGSNCEKLGQCPNID 232
HuTIM      WAIGTGKTATPQQAQEVHEKLRGWLKSNVSDAVAQSTRIIYGGSVTGATCKELASQPDVD 228
EhTIM      WAIGTGKTATPDQAQEVHQYIRKWMTENISKEVAEATRIQYGGSVNPNANLAKKADID 236
TbTIM      WAIGTGKVATPQQAQEAHALIRSWVSSKIGADVAGELRILYGGSVNGKNARTLYQQRDVN 229
TcTIM      WAIGTGKVATPQQAQEVHELLRRWRSKLGTDIAAQLRILYGGSVTAKNARTLYQMRDIN 230
LmTIM      WAIGTGKVATPEQAQEVHLLLRKWVSENIGTDVAAKLRILYGGSVNAANAATLYAKPDIN 230
          * : * * * * * . * * * * * : * * . : : * * * * * . . . * : :

GITIM      GFLVGGASLKP-EFMTMIDILTKTRT 257
HuTIM      GFLVGGASLKP-EFVDIINAKQ---- 249
EhTIM      GFLVGGASLDAAKFKTIINSVSEKF- 261
TbTIM      GFLVGGASLKP-EFVDIIKATQ---- 250
TcTIM      GFLVGGASLKP-EFVEIIEATK---- 251
LmTIM      GFLVGGASLKP-EFRDIIDATR---- 251

```

Figura 6. Alineamiento de la secuencia primaria de las TIM de *G. lamblia*, *E. histolytica*, humano, *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. mexicana*. Las Cys se muestran en gris sombreado.

Como se advierte en la Figura 6, la C14 esta presente también en la GITIM; excepto en humano todas las demás TIM alineadas la contienen. La C126 ó C127 esta presente en todas las secuencias conocidas de las TIM reportadas, en cambio la GITIM tiene además las C202, C222 y C228. El alineamiento muestra que la C222 esta presente en las TIM de *E. histolytica* y humano, en cambio las C202 y C228 se presentan sólo en la GITIM. Hasta antes de este trabajo no existían reportes en *G. lamblia* donde se abordara el estudio de la reactividad de sus residuos de Cys hacia agentes sulfhidrilo.



3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la contribución de los residuos de Cys de la triosafosfato isomerasa de *Giardia lamblia* (GITIM), en la inactivación por agentes sulfhidriilo.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la reactividad de la GITIM a agentes sulfhidriilo derivatizantes de Cys (DTNB, MTSCE y MMTS), midiendo la actividad residual de la enzima después de incubarse con distintas concentraciones del derivatizante.
- Determinar el número de Cys derivatizadas en la GITIM con DTNB, MTSCE y MMTS. mediante el método de Ellman.
- Realizar doble marcaje con DTNB y MMTS. Esto con la finalidad de evaluar si los residuos de Cys alquilados con DTNB son distintos a los modificados con MMTS. Lo anterior se llevará al cabo determinando la actividad residual de la enzima y el número de Cys derivatizadas.
- Generar mediante mutagénesis dirigida por PCR, mutantes sencillas de Cys por Ala para cada una de las cinco Cys presentes en la GITIM.
- Determinar las actividades residuales de las mutantes derivatizadas con los reactivos DTNB, MTSCE y MMTS.
- Determinar el estado oligomérico y la actividad residual de la GITIM silvestre, incubada con los derivatizantes a distintas relaciones estequiométricas.
- Determinar los posibles cambios estructurales producidos por la derivatización. Esto se realizará a través de medir la fluorescencia intrínseca de la GITIM derivatizada.
- Generar un método alternativo para seguir la derivatización de Cys. Lo anterior se realizará haciendo geles nativos con la GITIM derivatizada.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para los experimentos se utilizó la GITIM recombinante, previamente caracterizada (López-Velázquez *et al.*, 2004). El procedimiento de purificación se menciona más adelante.

4.1 REACTIVIDAD DE LA GITIM A AGENTES DERIVATIZANTES DE CYS.

Debido a la capacidad de la GITIM para formar especies oligoméricas mayores al dímero, a través de la formación de puentes disulfuro (López-Velázquez *et al.*, 2004), se decidió tratar previamente a la enzima con 500 mM de DTT a 4°C toda la noche, con el propósito de trabajar sólo con la fracción dimérica. Posteriormente, la enzima se aplicó a una columna de filtración como se describe más adelante. Todos los experimentos que a continuación se mencionan se realizaron por triplicado, con enzima previamente reducida y en atmósfera de nitrógeno. Lo anterior se hizo para mantenerla durante el mayor tiempo en su forma dimérica. Los agentes derivatizantes de Cys que se emplearon fueron el DTNB, MTSCE y MMTS. El protocolo para determinar el efecto de tales derivatizantes sobre la actividad de la GITIM fue similar para todos los casos. A continuación se describe la técnica de manera general.

La enzima se incubó a una concentración de 50 µg/mL en buffer de TE (Trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7.4) en atmósfera de nitrógeno, con diferentes concentraciones de los derivatizantes (0 a 500 µM de MMTS, 0 a 60 µM de DTNB, y 0 a 100 µM de MTSCE). Después de incubarla durante 2 y 24 h a 25°C, se tomó una alícuota de cada muestra y se diluyó 10,000 veces con la finalidad de detener la inactivación. La actividad residual de la GITIM se midió inmediatamente después de diluirla, como a continuación se menciona.

4.1.1 Determinación de la actividad enzimática.

La actividad se determinó mediante un ensayo acoplado en la dirección gliceraldehído 3-fosfato (GAP) hacia dihidroxiacetona fosfato (DHAP). La reacción se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contenía: 100 mM de trietanolamina, 10 mM de EDTA, pH 7.4, 1 mM de GAP, 0.2 mM de NADH y 0.9 U de α -glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (α GDH)



(Gómez-Puyou, *et al.*, 1995). La actividad se monitoreó espectrofotométricamente, siguiendo la disminución de la absorbancia del NADH a 340 nm, a una temperatura de 25°C. La concentración de la GITIM que se utilizó para los ensayos fue de 5 ng/mL. La Figura 7 muestra los pasos de la reacción acoplada:

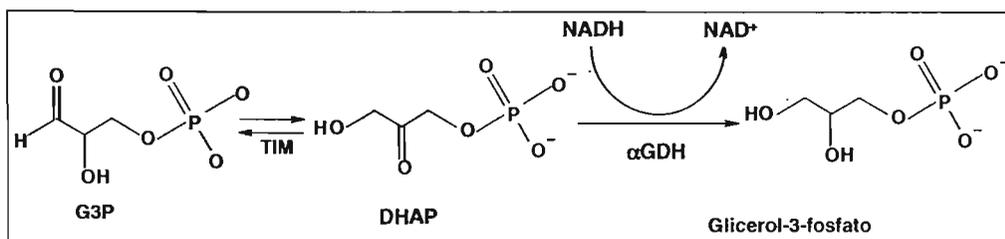


Figura 7. Reacción acoplada en dirección GAP a DHAP. La reacción es monitoreada por el decaimiento en la absorbancia del NADH.

En la transformación de GAP a DHAP por parte de la GITIM, se acopla la reducción del DHAP hacia Glicerol-3-Pi catalizada por la α -GDH. La segunda reacción implica la oxidación de una molécula de NADH hacia NAD⁺, este último no absorbe a 340 nm por lo que se observará una disminución en la absorbancia. Así, por cada GAP transformado, se oxida un NADH. El Δ D.O. min^{-1} que se obtiene es posteriormente transformado a μmol de DHAP formado/min X mg GITIM, utilizando un coeficiente de extinción molar a 340 nm (ϵ_{340}) de $6,220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el NADH. Los resultados se expresan como el porcentaje de actividad residual vs concentración del derivatizante. El 100 % de actividad esta dado por la enzima incubada en las mismas condiciones pero en ausencia de derivatizante.

4.2 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CYS DERIVATIZADAS.

Para determinar el número de Cys derivatizadas con los reactivos disulfuro, se incubaron 300 μg de la enzima con exceso del derivatizante (500 μM de MMTS ó 100 μM de MTSCE), en buffer TE durante 2 ó 24 h a 25°C en atmósfera de nitrógeno. Al término de la incubación la enzima se filtró a través de una columna (Penefsky, 1977) con el propósito de eliminar el derivatizante que no reaccionó con la enzima. Para preparar esta columna se empleó resina Sephadex G-25 fina (Amersham-Pharmacia), la cuál se empacó en jeringas de 1 mL. Las columnas se equilibraron con buffer TE, y se centrifugaron a 2,000 rpm durante 2 minutos para compactarlas y secarlas. Las muestras de las enzimas disueltas en



un volumen cercano a los 150 μL se añadieron a la columna, y se centrifugaron durante 110 segundos a 3000 rpm. Es importante hacer notar que hay pérdida de enzima en este paso ($\cong 30\%$), por lo que es necesario estimar la concentración de la misma después de la filtración.

Para el caso de la titulación de Cys después de incubar la enzima con 60 μM de DTNB durante 2 y 24 h a 25°C, no hubo necesidad de filtrarse por columna, siendo directamente procesada como más adelante se describe.

El método de titulación de Cys consiste en hacer reaccionar el DTNB con los grupos sulfhidrilos de estos residuos, lo que genera una molécula de TNB libre. Este compuesto tiene un máximo de absorbancia a 412 nm y puede seguirse espectrofotométricamente (Ellman, 1958). La estequiometría indica que por cada molécula de TNB que se forme habrá una Cys derivatizada, como se muestra en la Figura 8.

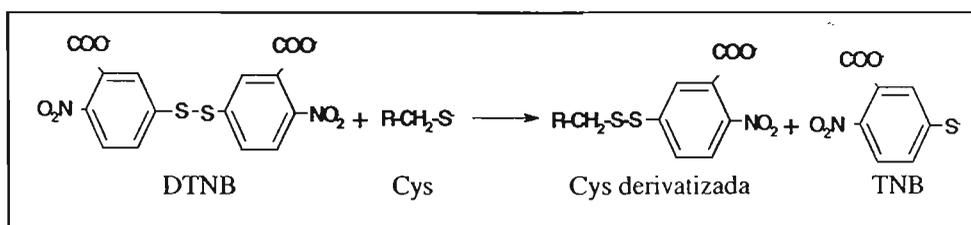


Figura 8. Reacción del DTNB con un grupo sulfhidrilo de una Cys.

Así, el TNB se puede usar como un indicador de las Cys libres. Las enzimas derivatizadas y el control (sin derivatizar) se añadieron a una mezcla con SDS al 5% (p/V) y DTNB 1 mM. El SDS desnatura las proteínas y expone las Cys originalmente inaccesibles, con las que el DTNB reaccionará (grupos sulfhidrilo libres de estas Cys), generando moléculas de TNB. El contenido de Cys, se calculó utilizando un $\epsilon_{412} = 13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ del TNB generado (Eyera *et al.*, 2003), considerándose además el cambio de absorbancia producido por la adición de la proteína a la mezcla SDS-DTNB (blanco).

4.3 DOBLE MARCAJE CON MMTS, DTNB Y DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CYS.

Los datos obtenidos de la inactivación por parte del MMTS y del DTNB (ver resultados), nos permitieron realizar experimentos de doble marcaje y establecer indirectamente si las



Cys que derivatizó el MMTS son las mismas que derivatizó el DTNB. En estos experimentos se utilizaron 200 μg de la enzima que se incubaron con exceso de MMTS (500 μM) durante 2 y 24 h a 25°C. Posteriormente el MMTS que no reaccionó se eliminó mediante columnas de Penefsky, se midió la concentración de enzima y se determinó la actividad residual. Enseguida se incubaron 50 $\mu\text{g/mL}$ de esta enzima, con distintas concentraciones de DTNB durante 2 y 24 h a 25°C, al término de este tiempo se tomó una alícuota y se midió la actividad de la enzima. Los resultados se muestran como el porcentaje de actividad residual a diferentes concentraciones de DTNB.

Lo siguiente fue conocer el número de Cys derivatizadas al incubar con los dos reactivos. Después de incubar 200 μg de la enzima con exceso de MMTS, se pasó por columna de Penefsky, se determinó su concentración y se incubó con exceso de DTNB durante 2 y 24 h a 25°C. Al término de este tiempo se cuantificó el número de Cys con el método de SDS-DTNB.

4.3.1 Determinación de la concentración de proteína.

La concentración de la enzima se midió por su absorbancia a 280 nm. Se consideró un $\epsilon_{280} = 26,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, el cual fue calculado de acuerdo a Pace y colaboradores (1995).

4.4 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA POR PCR.

Mediante mutagénesis dirigida por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se construyeron en la GITIM, mutantes sencillas de Cys sustituidas por Ala.

La técnica de PCR permite amplificar una región específica de DNA, que se localice entre dos regiones de una secuencia genética conocida. La amplificación se realiza usando oligonucleótidos ó “*primers*” (generalmente de 20-30 bases) que sean complementarios a los extremos de la secuencia del DNA templado. A partir de los “*primers*” se inicia el proceso de extensión catalizado por una DNA polimerasa termoestable, sobre la hebra de cadena sencilla del DNA desnaturalizado y en presencia de deoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's). El resultado es la síntesis de nuevas hebras de DNA complementarias a la hebra templado.

La síntesis de nuevas hebras puede repetirse mediante la desnaturalización por calor de la doble cadena de DNA, el realineamiento de “*primers*” por disminución de la temperatura y



una extensión por la DNA polimerasa a temperatura estable para la reacción enzimática, completando un ciclo. Cada hebra sintetizada puede ser un templado para los siguientes ciclos de amplificación, enriqueciendo selectivamente a una secuencia blanco después de cada ciclo (Newton y Graham, 1997). Una desventaja importante de este método es la posibilidad de que la DNA polimerasa incorpore nucleótidos erróneamente. Por tanto, es necesario conocer la secuencia del producto amplificado para corroborar su fidelidad.

Una aplicación de esta técnica es la introducción de mutaciones puntuales, para lograr esto es necesario realizar tres reacciones de PCR por separado que se describen en la Figura 9.

- 1) La primera reacción amplifica la región del gen flanqueado por el “*primer*” directo externo y el “*primer*” mutagénico reverso.
- 2) La segunda reacción amplifica el extremo contrario del gen con un “*primer*” reverso externo y el “*primer*” mutagénico directo.
- 3) La tercera reacción involucra los productos de PCR 1 y 2 ya que estos son exactamente complementarios en uno de sus extremos, además se utilizan los “*primers*” directo y reverso externos.

Para la fabricación de las mutantes sencillas de la GITIM, se utilizaron “*primers*” mutagénicos de 17 a 20 bases. Se decidió sustituir Cys por Ala, debido a que en un trabajo previo por Hernández-Alcántara y colaboradores (2002), demostraron que este tipo de sustituciones no afecta significativamente la cinética y la estabilidad de mutantes de TbTIM. Los “*primers*” mutagénicos que se diseñaron para sustituir las Cys previamente mencionadas se basaron en la secuencia genética de la GITIM reportada en el GeneBank (No. de acceso L02120) (Mowat *et al.*, 1994). El codón de la Ala sustituyente que se utilizó en los “*primers*” mutagénicos es el más frecuentemente usado en *Escherichia coli*, organismo donde se expresaron las enzimas. Para flanquear al gen de la GITIM se utilizaron los “*primers*” universales T7 promoter y T7 reverse. Estos contienen un sitio de restricción NdeI y BamHI en la posición 5’ respectivamente. La Tabla 3 muestra su secuencia.

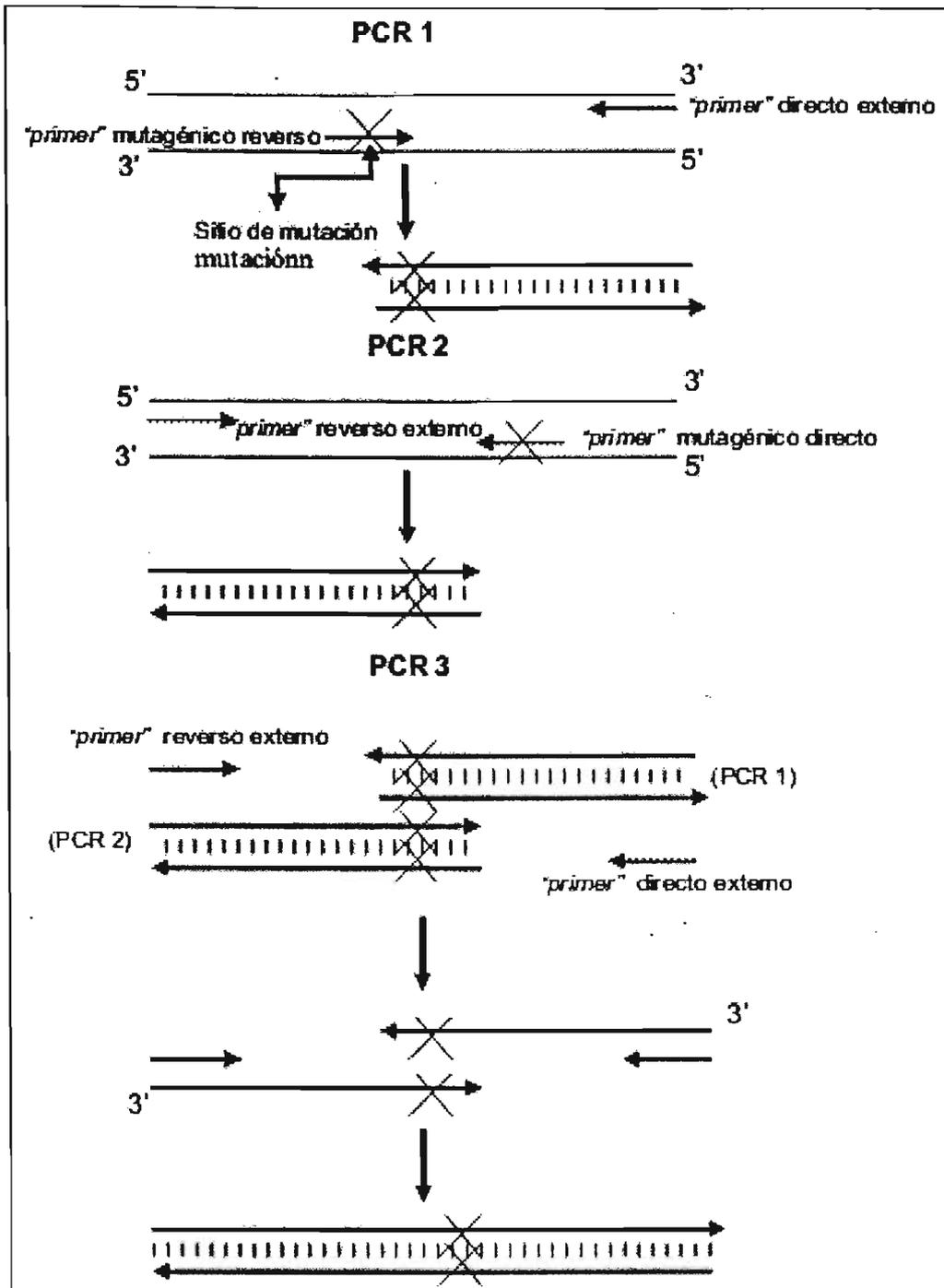


Figura 9. Pasos de PCR necesarios para generar sustituciones de nucleótidos en un fragmento de DNA conocido. La cruz indica el lugar de la mutación, una vez generados los productos de PCR 1 y 2 con la mutación correspondiente, se mezclan estos junto con los "primers" externos directo y reverso. El producto final es el fragmento de DNA con la mutación deseada.



Secuencia de "Primers" universales		
Forward (T7 promoter)	Reverse (T7 terminator)	
5' AATAACATATGCCTGCTCGTC 3'	5' CCAGGATCCTATGTACGGG 3'	
Secuencia de "Primers" mutagénicos		Aminoácido sustituido
Forward (directo)	Reverse (reverso)	Cys
5' GTAAC <u>TTCAAGGCTAACGGC</u> 3'	5' GCCGTT <u>AGCCTTGAAGTTAC</u> 3'	14
5' GGT <u>CATCTTCGCTGTCGG</u> 3'	5' CCGAC <u>AGCGAAGATGACC</u> 3'	127
5' GGAGAAGGTT <u>GCTGCCG</u> 3'	5' CGGC <u>AGCAACCTTCTCC</u> 3'	202
5' GGAAGCAAC <u>GCTGAGAAGC</u> 3'	5' GCTTCTC <u>AGCGTTGCTTCC</u> 3'	222
5' CCAG <u>GCTCCGAATATTGAC</u> 3'	5' GTCAATATTCGG <u>AGCCTGG</u> 3'	228

Tabla 3. "Primers" utilizados y su secuencia. Las bases subrayadas indican el triplete que fue sustituido.

Con el fin de obtener una amplificación eficiente, se probaron diversas temperaturas de alineamiento. La Tabla 4 muestra los tiempos y temperaturas que se utilizaron como condición final.

Pasos	Ciclos	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1°	1	4	94
2°	25	1	94
		1	53-55
		1	72
3°	1	10	72

Tabla 4. Condiciones de PCR. La temperatura de alineamiento (53-55 °C) varió según la Tm del "primer" usado.

Los experimentos de PCR se realizaron con el kit de Boehringer ExpandTM High Fidelity PCR System. La mezcla de reacción consistió en: 200 ng de DNA, 200 ng de primers F y R, 0.8 mM de dNTP's, buffer para PCR 1 x, 2 mM de MgCl₂ y 2.5 U de Taq polimerasa. Al término de la amplificación, los productos de PCR obtenidos se corrieron en geles de agarosa (0.9 %). Para visualizar el DNA, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 µg/mL) y se detectaron con luz ultravioleta. Las bandas correspondientes se aislaron del



gel para extraer el DNA con el kit de purificación Concert Rapid Gel Extraction, Gibco. Al obtener el gen de la GITIM con la mutación incorporada, el siguiente paso fue su inserción en un vector de sobre-expresión.

4.4.1 Clonación del gen mutado en el vector de sobre-expresión.

Los genes con la mutación fueron insertados en el vector de sobre-expresión pET3a (Novagen), que funciona como un sistema de clonación y expresión de proteínas recombinantes en células de *E. coli*. La expresión del gen clonado se haya bajo el control del promotor del bacteriofago T7. Este promotor puede inducirse selectivamente para asegurar que aproximadamente un 50 % de la producción de proteínas corresponda a la recombinante (Voet, 1995).

Tanto los genes obtenidos como el vector pET3a, fueron tratados con las enzimas de restricción NdeI y BamHI a 37°C durante 1 h generando extremos cohesivos. Las digestiones se corrieron en geles de agarosa al 0.9 % que permite la separación por peso molecular, y enseguida se purificó el DNA empleando un kit comercial (Gibco). Después de este paso, las muestras se sometieron a defosforilación con fosfatasa alcalina.

Los fragmentos de la GITIM digeridos se insertaron al vector (en relación 7:1 respectivamente) mediante ligación con la enzima T4 DNA ligasa (4 U/ μ L) en presencia de ATP, incubándolos a 16°C toda la noche. Con los productos de la ligación se transformaron las células competentes *E. Coli* TOP 10, estas células permiten la incorporación de DNA mediante un choque térmico (Coeddel, 1998). Para permitir la incorporación del plásmido, las células competentes y el plásmido ligado se incubaron en hielo durante 30 minutos en condiciones de esterilidad. Posteriormente, la muestra se introdujo en un baño maría a 42°C (choque térmico) durante 40 segundos. Al término de la incubación la muestra se añadió a un medio que contenía LB (Luria-Bertani), incubándose durante 1 h a 37°C en agitación constante. Con este tratamiento se permitió la recuperación de las células ante su transformación y posterior choque térmico. Enseguida, las células se centrifugaron y el botón resultante se resuspendió en 100 μ L de LB, se plaqueó en cajas de Petri con agar LB más ampicilina (100 μ g/mL), y se incubaron a 37°C toda la noche.

Cada clona resultante se cultivó en medio LB (5 mL) con ampicilina, a 37°C con agitación durante 12 h. Del cultivo obtenido, se extrajo el plásmido utilizando un kit comercial



(Gibco). Una vez purificado el plásmido, se comprobó la presencia del gen insertado mediante la digestión con las enzimas NdeI y BamHI. Las muestras digeridas se corrieron en geles de agarosa al 0.9 % y se visualizaron con bromuro de etidio.

Las muestras se secuenciaron utilizando el método descrito por Sanger y colaboradores (1997) para comprobar la presencia del gen de la GITIM con la mutación adecuada y descartar la posibilidad de mutaciones no deseadas.

Una vez confirmada la fidelidad del gen, se transformaron células competentes de *E. coli* de la cepa BL21(DE3)pLys. Estas células contienen el gen que codifica para la T7 RNA polimerasa, necesaria para la expresión de la enzima recombinante (Coeddel, 1998), las clonas positivas se usaron en los ensayos posteriores.

4.4.2 Expresión y purificación de las enzimas recombinantes de la GITIM.

Para expresar las proteínas recombinantes se realizó un precultivo de células de *E.coli* BL21(DE3)pLys que contienen el plásmido más el gen de la TIM, en 5 mL de medio líquido LB con 100 µg/mL de ampicilina, incubadas toda la noche a 37°C. Posteriormente se centrifugaron y el botón se resuspendió en medio nuevo. Se tomó una alícuota del precultivo y se añadió a 500 mL de medio LB con A_{600} nm de 0.1, se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una A_{600} nm de 0.8-1.0. Esto permite tener un cultivo que se encuentra en la fase logarítmica de crecimiento para lograr una mayor inducción.

Para la inducción se agregó 0.4 mM IPTG y se, incubaron toda la noche a 30°C. Posteriormente las células se centrifugaron a 5,000 rpm/10 min a 4°C. Enseguida el botón resultante se resuspendió en 40 mL de un amortiguador que contenía 50 mM de Tris, 1 mM de EDTA, 0.2 mM de PMSF, 100 mM de H_2PO_4 , a un pH de 7.9. Una vez resuspendidas en el buffer, las células se lisaron por sonicación en frío (cinco ciclos de 45 seg con descansos de 75 seg) y se centrifugaron a 45,000 rpm/1 h a 4°C.

El sobrenadante de la ultracentrifugación se precipitó con sulfato de amonio hasta el 45 % de saturación y se incubó 3 h a 4°C. Esta suspensión se centrifugó a 9,000 rpm/30 min a 4°C, al término el sobrenadante fue precipitado con sulfato de amonio hasta el 75 % a 4°C toda la noche. Después se centrifugó a 9,000 rpm/30 min a 4°C, el botón se resuspendió en 10 mL de un amortiguador que contenía 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, a pH 8.7.



El extracto se dializó extensivamente contra ese mismo buffer a 4°C, y bajo atmósfera de nitrógeno (N₂). La muestra se concentró a un volumen de 2 mL y se pasó a través de filtros de 0.45 µm de diámetro de poro, una vez filtrado se aplicó a una columna Q-Sepharosa (1.5 X 12 cm) equilibrada con el mismo buffer. Las enzimas se eluyeron con un gradiente de NaCl de 0 a 100 mM, con una velocidad de flujo de 3 mL/min. Se colectaron fracciones de 2.5 mL y se midió la actividad como previamente se mencionó.

Las fracciones con actividad se juntaron, se les añadió 100 mM de H₂PO₄, 10 mM de Tris pH 7, y se concentraron. La solución se filtró y se aplicó en una columna Superdex-75 (1.6 X 60 cm), equilibrada con un buffer que contenía 100 mM de NaCl, 0.01 % de NaN₃, 150 mM de H₂PO₄ a pH 8. La velocidad de flujo fue de 1 mL/min, y el volumen de las fracciones fue de 1.25 mL. Las fracciones enriquecidas en actividad de TIM se juntaron, concentraron y se almacenaron a 4°C bajo atmósfera de N₂ hasta su uso.

4.5 EXPERIMENTOS REALIZADOS CON LAS MUTANTES CONSTRUIDAS.

Los ensayos que se generaron con las enzimas purificadas, se basaron en los experimentos previamente detallados:

1. Reactividad de las mutantes de la GITIM a los reactivos de sulfhidrilo (DTNB, MTSCE y MMTS).
2. Determinación del número de Cys derivatizadas.

Los experimentos que a continuación se describen se realizaron con el propósito de contar con datos estructurales de la GITIM, que nos permitan sugerir posibles perturbaciones de la enzima al ser expuesta a los distintos derivatizantes.

4.6 EFECTOS DE UN AGENTE REDUCTOR EN LA GITIM INCUBADA CON DTNB Y MMTS.

Con el propósito de establecer si hay reversibilidad en la inactivación vista en la GITIM con los derivatizantes, 10 µg/mL de la proteína se incubaron con 200 µM de DTNB a 25°C en distintos tiempos, posteriormente se tomaron varias alícuotas a distintos tiempos y a cada una se les adicionó 15 mM de DTT, inmediatamente se tomó una alícuota para determinar la actividad. En otro experimento se incubaron 10 µg/mL de la GITIM silvestre



con 10 μ M de MMTS a 25°C, después se añadieron 15 mM de DTT y a distintos tiempos se tomó una alícuota y se determinó la actividad.

4.7 DETERMINACIÓN DEL ESTADO OLIGOMERICO Y ACTIVIDAD EN LA GITIM SILVESTRE, INCUBADA CON LOS DERIVATIZANTES A DISTINTAS RELACIONES ESTEQUIOMÉTRICAS.

La determinación del estado oligomérico se hizo con el propósito de conocer la condición de la estructura tridimensional de la GITIM silvestre, al ser incubada con los derivatizantes. Para estos experimentos se incubaron 5 nmoles de la GITIM silvestre con 5, 10, 20 y 100 nmoles de DTNB (la relación estequiométrica DTNB/monómero de la GITIM fue 1:1, 2:1, 4:1 y 20:1 respectivamente), en buffer de TE pH 7.4 a 25°C. Estas relaciones estequiométricas se realizaron con el propósito de derivatizar a cortos tiempos cada una de las Cys presentes por monómero de la GITIM y explorar el estado oligomérico. Las relaciones estequiométricas de 4:1 y 20:1 tuvieron como objetivo una rápida derivatización para evitar el recambio del TNB de un residuo de Cys a otro. La absorbancia se monitoreó a 412 nm.

Una vez que se derivatizó la primera Cys, se tomaron 20 μ g de proteína y se pasaron inmediatamente por una columna de exclusión molecular (300SW 7.5 X 300 mm) y se determinó el perfil cromatográfico de la GITIM con una Cys derivatizada. Este mismo protocolo se utilizó cuando se derivatizaron 2, 3 y 4 Cys por monómero. Simultáneamente se determinó la actividad enzimática en cada uno de los experimentos, deteniendo la derivatización por dilución. Los datos se presentan como porcentaje de actividad y porcentaje de oligomerización vs Cys derivatizadas por monómero de la GITIM silvestre.

4.8 FLUORESCENCIA INTRÍNSECA.

La fluorescencia intrínseca permite caracterizar la conformación de una proteína y los posibles cambios conformacionales que esta pueda tener en algunas condiciones.

La emisión de fluorescencia se origina de electrones que han sido excitados, logrando que aumente su nivel energético, por lo que asciende a un orbital mayor y posteriormente regrese a su estado basal. Este último paso ocasiona emisión de energía que siempre es menor que la luz originalmente absorbida (Creighton, 1997). La fluorescencia de proteínas



se origina de los residuos Phe, Tyr y Trp, sin embargo en proteínas que contienen los tres aminoácidos la fluorescencia usualmente es dominada por la contribución de los residuos de Trp. Cambios en la conformación de una proteína, van generalmente acompañados con cambios de la emisión de su fluorescencia. En base a lo anterior, es posible establecer una relación entre la modificación química de la enzima que conllevaría al abatimiento en la catálisis y la posible perturbación en su estructura.

El experimento consistió en incubar 100 µg/mL de la GITIM silvestre con 100 µM de MTSCE durante 1 h a 25°C, un control de la GITIM en buffer de TE a pH 7.4 y buffer de TE (para restar el valor basal que pudiera producir el buffer). En el transcurso de este tiempo se registró la intensidad de la fluorescencia a distintas longitudes de onda excitando a 295 nm utilizando un espectrofluorometro. Este equipo cuenta con un software que permite el registro de la fluorescencia en unidades arbitrarias. Al término del experimento los datos se transfirieron a otro paquete de Windows (Excel) y posteriormente se transformaron a porcentaje de fluorescencia, tomando como un 100 % el pico máximo de fluorescencia del experimento control. Los datos se expresan como porcentaje de fluorescencia vs longitud de onda en nm.

El centro espectral de masas (CEM) se calculo de acuerdo a la siguiente formula

$$CEM = \frac{\sum \lambda I(\lambda)}{\sum I(\lambda)} \quad (1)$$

donde $I(\lambda)$ es la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda λ .

4.9 DETERMINACIÓN DEL PATRON DE CORRIMIENTO DE LA GITIM SILVESTRE INCUBADA CON MTSCE, EN GELES NATIVOS.

Para analizar el estado conformacional de la GITIM en condiciones de derivatización con MTSCE, fue necesario realizar experimentos con geles no desnaturizantes o nativos.

La velocidad de una proteína que se mueve a través de un gel en un campo eléctrico, depende tanto de la carga neta que posea, como del tamaño y forma de la misma. Una proteína en solución puede existir como una mezcla de conformaciones que se interconvierten (Creighton, 1997). Si la separación electroforetica es rápida comparada con la velocidad de interconversión hacia diferentes estados, es posible resolver los posibles



isómeros de una proteína y con esto establecer cuál o cuáles son las conformaciones que posee en diferentes condiciones experimentales.

Las condiciones de trabajo consistieron en incubar a la GITIM sola o con MTSCE con relaciones estequiometricas de: 1:1, 2:1 y 4:1 (MTSCE/monómero de GITIM), en buffer de TE pH 7.4 durante 1 h a 25°C. Al término del experimento las muestras se pasaron por columnas de Penefsky. Se cuantificó la proteína que eluyó y las muestras se corrieron en un gel nativo no desnaturizante de gradiente continuo de 4 a 16 % de acrilamida, durante 15 h a 100 Volts constantes. Posteriormente el gel se tiñó con azul de Coomasie.

4.10 DETERMINACION DEL AREA ACCESIBLE AL SOLVENTE DE LOS RESIDUOS DE Cys DE LA GITIM.

Recientemente en nuestro laboratorio se resolvió la estructura tridimensional de la mutante de la GITIM C202A. Dentro de la información que puede obtenerse de las coordenadas de la estructura, se encuentra la obtención del área accesible al solvente (ASA) de los residuos de Cys que presenta la GITIM. Considerando que un residuo más expuesto al solvente acuoso es más reactivo hacia los agentes alquilantes, es posible predecir la secuencia de derivatización para las 5 Cys de la GITIM. Esta información ayudó a interpretar los resultados obtenidos de la derivatización de la enzima silvestre y sus mutantes.

La determinación del ASA se obtuvo utilizando el programa en línea del NIH (Gerstein M., 1992), así como el software NACCESS utilizando una sonda de 1.4 Å de diámetro. Los valores se reportaron como el porcentaje de ASA, considerando el 100 % de accesibilidad a un residuo de Cys dentro de un tripéptido de Gly-Cys-Gly (Lee y Richard, 1970; Chotia, 1976).



5. RESULTADOS

5.1 INACTIVACIÓN DE LA GITIM POR DERIVATIZACIÓN DE CYS.

Los grupos sulfhidrilo de las Cys, son los residuos más reactivos en las proteínas. Estas Cys pueden ser alquiladas, aciladas, ariladas y oxidadas, tales modificaciones son capaces de afectar la estructura y la función enzimática (Kenyon y Bruice, 1977). Por ejemplo, la exposición de algunas proteínas con los agentes alquilantes DTNB, MTSCE o MMTS promueve su inactivación (Gómez-Puyou, *et al.*, 1995; Garza-Ramos *et al.*, 1996; Garza-Ramos *et al.*, 1998). Con el propósito de conocer el efecto de estos reactivos sobre la actividad de GITIM, se realizaron estudios de derivatización utilizando concentraciones crecientes de los compuestos. Previamente se mencionó que la enzima presenta 5 residuos de Cys en su estructura primaria, localizados en las posiciones 14, 127, 202, 222 y 228. Por tanto es posible evaluar el efecto de estos compuestos sobre la actividad de la enzima.

La Figura 10 muestra que el DTNB fue capaz de inactivarla de manera dependiente de concentración hasta llegar al 92 % a partir de 20 μM . Al aumentar las concentraciones de este compuesto, el porcentaje de actividad residual fluctuó entre un 5 a 8 %.

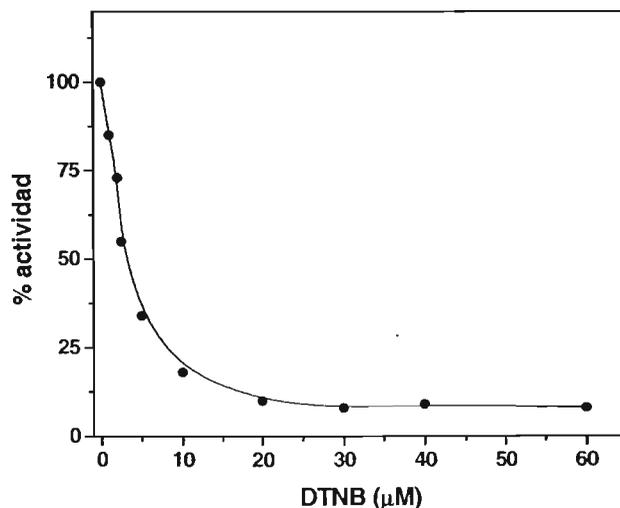


Figura 10. Inactivación de la GITIM en función de la concentración de DTNB. Se incubaron 50 $\mu\text{g/mL}$ de la enzima en buffer de TE a pH 7.4 con diferentes concentraciones de DTNB. Después de incubar 2 h a 25°C, se tomaron alícuotas para determinar la actividad residual.

Así, este resultado sugiere que la inactivación de la GITIM por el DTNB puede deberse a una perturbación en el sitio activo o en la estructura general de la enzima, promovido por la



adición de un grupo voluminoso y con carga neta negativa denominado TNB (Tabla 5). Considerando el resultado anterior, se trató de establecer cuál propiedad afecta principalmente a la actividad: el volumen o la carga conferida por el derivatizante. Se evaluó el efecto del MTSCE que al reaccionar con Cys, genera un producto denominado carboxietil sulfuro, el cuál está cargado negativamente y exhibe un volumen molecular 1.7 veces menor que el TNB (Tabla 5). Si el volumen es la condicionante principal para la inactivación, entonces al incubar la enzima con MTSCE se esperaría una menor perturbación en la estructura y la actividad. Por el contrario si la carga negativa es el factor que promueve mayoritariamente la perturbación, entonces se esperaría una inactivación similar a la obtenida con el DTNB. La Figura 11 muestra los resultados obtenidos.

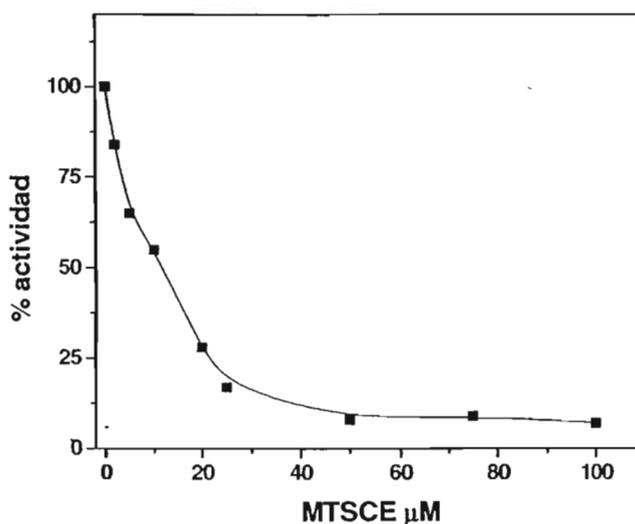


Figura 11. Inactivación de la GITIM incubada con MTSCE. Después de incubar 50 $\mu\text{g/mL}$ de GITIM en buffer de TE, pH 7.4 2 h a 25°C con distintas concentraciones del derivatizante, al final del ensayo se tomaron alícuotas y se determinó la actividad residual.

El MTSCE inactivó a la enzima de forma similar a como lo hizo el DTNB. Conforme se incrementaron las concentraciones del compuesto, la actividad disminuyó progresivamente hasta llegar a un 5 % con 50 μM de DTNB.

Los resultados sugieren que la carga negativa conferida a la Cys derivatizada es un factor importante para lograr inactivar a la GITIM. Sin embargo, para obtener el 50 % de inactivación con MTSCE (cerca de 6 μM) se requirió dos veces la concentración del DTNB, por lo que el tiosulfonato fue menos eficiente. Así, a pesar de que estas diferencias son marginales, fueron reproducibles a lo largo del estudio, sugiriendo la existencia de otro



factor que contribuye a la inactivación de la enzima. Este factor podría ser la diferencia en volumen, del producto generado por cada compuesto al derivatizar Cys. Para abordar esta última idea, se evaluó a la GITIM con MMTS, un derivatizante cuyo aducto sin carga es 3.5 veces menos voluminoso que el DTNB (Tabla 5). Por tanto si el volumen del derivatizante es importante, se esperaría que la derivatización con MMTS provoque un menor grado de inactivación. Como se muestra en la Figura 12, la actividad de la GITIM disminuyó $\approx 50\%$ con $5\ \mu\text{M}$ de MMTS, sin embargo el uso de concentraciones mayores no modificó más la actividad.

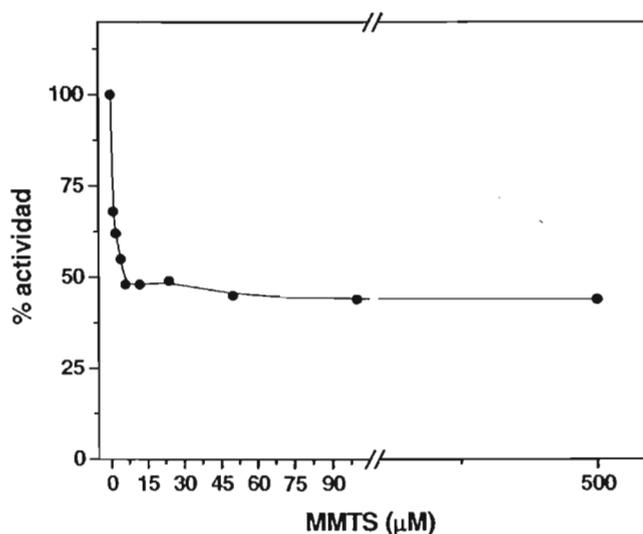


Figura 12. Inactivación de la GITIM con distintas concentraciones de MMTS. Se utilizaron $50\ \mu\text{g/mL}$ de la enzima en buffer de TE pH 7.4, después de incubarla 2 h a 25°C se tomaron alícuotas y se determinó la actividad residual.

Así, considerando los resultados en conjunto, se sugiere que es necesario derivatizar las Cys de la GITIM con un grupo voluminoso y con carga para obtener su completa inactivación. Por otra parte, a pesar de que sólo se consiguió el 50% de inactivación máxima con MMTS, es notable el efecto que se obtuvo a bajas concentraciones. Así, con $1\ \mu\text{M}$ se observó una disminución de la actividad del 30% , en contraste con el 15% que se registró utilizando DTNB o MTSCE a la misma concentración. Dado que el MMTS es un compuesto neutro, capaz de acceder eficientemente al interior de la enzima, el resultado sugiere la existencia de Cys ocultas al solvente que al modificarse, perturban significativamente la actividad.



Aunque la idea de requerir un grupo voluminoso y con carga para la inactivación es sugestiva, cabe aclarar que la cantidad de Cys que cada compuesto derivatiza podría también influir el comportamiento diferencial de estos compuestos. Tal posibilidad se evaluó en el siguiente apartado.

Reacciones de los derivatizantes con la Cys		van der Waals (Å ³)
DTNB		138
MTSCE		80
MMTS		38
$\left. \begin{array}{l} \text{DTNB} \\ \text{MTSCE} \\ \text{MMTS} \end{array} \right\} + \text{R-CH}_2\text{-S-} \begin{array}{l} \text{Cys} \\ \text{Cys} \\ \text{derivatizada} \end{array} \rightarrow \text{R-CH}_2\text{-S-X} \begin{array}{l} \text{Cys} \\ \text{derivatizada} \end{array}$		

Tabla 5. Reacciones de los derivatizantes con Cys. El área de van der Waals es un estimado basado en valores reportados para algunos aminoácidos (Creighton, 1993). El área sombreada en los derivatizantes corresponde a lo que se adiciona al grupo tiolato de la Cys. La X sombreada en la Cys derivatizada representa dicha adición.

5.2 CUANTIFICACIÓN DE CYS Y DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD EN LA GITIM SILVESTRE.

Esta técnica nos permitió evaluar las Cys participantes en la inactivación enzimática promovida por los derivatizantes. La cuantificación se basó en el método de Ellman previamente descrito. La Tabla 6 muestra los resultados obtenidos con cada uno de los derivatizantes.

Derivatizante	Cys Derivatizadas/ monómero	Porcentaje de actividad
--	0	100
DTNB	3.9 ± 0.2	10 ± 3
MTSCE	3.8 ± 0.3	5 ± 2
MMTS	3.3 ± 0.3	50 ± 6

Tabla 6. Número de Cys por monómero de la GITIM que derivatizó cada compuesto, previa incubación de 2 h a 25°C. El porcentaje de actividad es la máxima inactivación observada.

Tanto el DTNB como el MTSCE derivatizaron 4 Cys/monómero, con una inactivación mayor al 90 %. En cambio el MMTS derivatizó 3 Cys/monómero y la inactivación máxima fue ≈ 50 %. Cabe señalar que para cuantificar la quinta Cys fue necesario desnaturar la proteína, lo que indica que ésta es completamente inaccesible a los agentes químicos. El



hecho de que el MMTS haya modificado menor número de Cys, apoya la idea de que se induce la menor alteración estructural con este compuesto. En este mismo orden de ideas, el DTNB y el MTSCE aportarían más volumen y carga negativa, generando así “nuevos accesos” que exponen a otras Cys al solvente, originalmente menos accesibles. Los datos obtenidos parecen indicar que se requieren derivatizar 4 Cys/monómero para inactivar la GITIM. Sin embargo, como se describe más adelante, los resultados de doble marcaje sugieren que sólo se requieren de tres Cys modificadas para lograr dicho efecto.

5.3 DOBLE MARCAJE CON MMTS Y DTNB, MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD Y DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CYS EN LA GITIM.

Debido a que el MMTS inactiva a la GITIM al 50 % derivatizando 3 Cys/monómero, fue posible aprovechar tal condición con el propósito de evaluar si las Cys que reaccionan con este compuesto son las mismas que modifica el DTNB. Esto se realizó a través del método de doble marcaje. Una posibilidad sería que la enzima pretratada con MMTS no se inactivará con la adición del DTNB. Lo que significaría que las Cys que reaccionaron con el MMTS son las mismas que modifica el DTNB y que participan en la total inactivación total de la enzima. Por el contrario si la actividad cae más del 50 %, entonces las Cys que derivatiza el MMTS son distintas a las que modifica el DTNB.

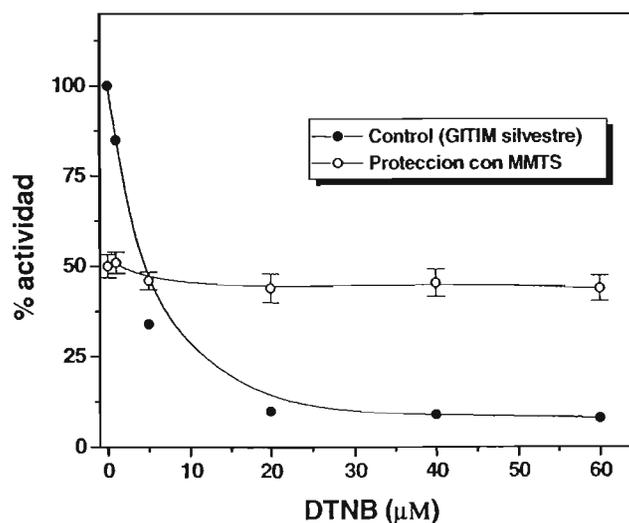


Figura 13. Doble marcaje con MMTS y DTNB. La enzima se incubó previamente con un exceso de MMTS y posteriormente con DTNB 2 h a 25°C (círculos abiertos). El control consistió en GITIM incubada sólo con DTNB (círculos cerrados).



Los resultados ilustrados en la Figura 13 demuestran que la GITIM pretratada con MMTS fue insensible al DTNB, mientras que el control se inactivó más del 90 %. Es claro que el MMTS protegió a la enzima de la inactivación con DTNB. Esto sugiere que las Cys responsables de la inactivación máxima estaban previamente ocupadas con el aducto del MMTS. Además de determinar el intervalo de inactivación en la doble derivatización, se cuantificó el número de Cys modificadas con el propósito de establecer si el DTNB accedió a otras Cys que el MMTS no afectó, la Tabla 7 muestra estos resultados.

MMTS	DTNB	Cys Derivatizadas/ monómero	Porcentaje de actividad
--	--	0	100
✓	✓ (2 h)	3.3 ± 0.3	50 ± 6
✓	✓ (24 h)	4.1 ± 0.2	50 ± 6

Tabla 7. Número de Cys por monómero de la GITIM obtenidas con el doble marcaje. La enzima se incubó con DTNB durante 2 y 24 h a 25 °C.

A las 2 h se derivatizaron 3 Cys/monómero, mientras que a las 24 h de incubación se modificaron 4 Cys/monómero. Estos resultados muestran que aunque el DTNB accedió a una Cys más, no se comprometió la actividad, y sugieren que 3 Cys son las probables responsables de la máxima inactivación registrada.

5.4 REACTIVIDAD DE LAS MUTANTES DE LA GITIM A LOS AGENTES DERIVATIZANTES DE Cys DTNB, MTSCE Y MMTS.

Los reactivos de sulfhidrilo utilizados en la GITIM silvestre revelaron su magnitud de inactivación, así como el número de Cys que derivatizó cada uno. Sin embargo, aunque los datos sugieren que se necesitan derivatizar tres de estos residuos por subunidad para inactivar a la enzima, no es posible definir cuales Cys participan en este proceso. Esta pregunta se abordó sustituyendo cada Cys por Ala en la GITIM, y determinar en cada mutante la actividad residual al exponerla a los reactivos de sulfhidrilo. Después de que las mutantes se aislaron con una pureza mayor al 95 %, se les determinaron sus parámetros cinéticos. Como se muestra en la Tabla 8, los valores de K_m de las enzimas silvestre y mutantes fueron similares. De igual forma la k_{cat} fue muy cercana entre las mutantes y la enzima silvestre, excepto en la C228A que fue aproximadamente de la mitad. La similitud



de dichos valores indica que las sustituciones por si mismas no afectaron de manera significativa la función de las enzimas. Así, este estudio se consideró como parámetro de confianza para comparar los resultados obtenidos de la derivatización entre las mutantes y la silvestre.

GITIM	K_m (mM)	k_{cat} (10^5 min^{-1})
Silvestre	0.78 ± 0.06	4.6 ± 0.16
C14A	0.4 ± 0.06	5 ± 0.16
C127A	0.36 ± 0.06	3.5 ± 0.1
C202A	0.8 ± 0.09	2.9 ± 0.14
C222A	1.8 ± 0.3	5 ± 0.4
C228A	0.25 ± 0.07	1.87 ± 0.19

Tabla 8. Constantes cinéticas de las mutantes construidas de la GITIM. Valores similares a lo reportado en la silvestre.

En los ensayos de inactivación, la incubación con DTNB produjo total inactivación en casi todas las enzimas. La Figura 14 muestra que las mutantes C14A, C127A, C202A y C228A tuvieron una disminución en la actividad similar a la silvestre; por arriba de $20 \mu\text{M}$ de DTNB la inactivación fue completa. En contraste, la C222A mantuvo su actividad al 100 % y fue independiente de la concentración del DTNB que se ensayó.

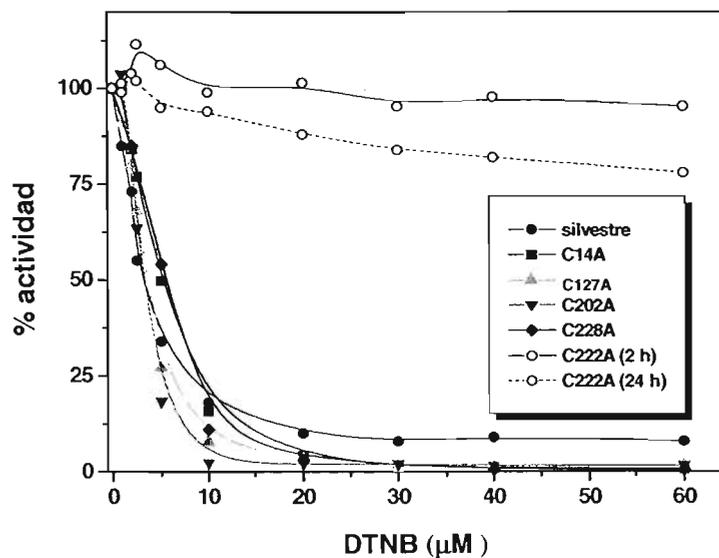


Figura 14. Porcentaje de actividad residual de la GITIM silvestre y mutantes, incubadas con DTNB por 2 h (líneas continuas) ó 24 h (línea discontinua). Se usaron $50 \mu\text{g/mL}$ de cada enzima en buffer de TE a pH 7.4 con diferentes concentraciones de DTNB.



Estos datos sugieren que la derivatización del residuo 222 es esencial para inactivar a la enzima. Con el propósito de evaluar la inactivación con DTNB a un periodo de incubación mayor, el experimento se extendió a 24 h. En la Figura 14 se muestra que a este tiempo de incubación la actividad de la C222A disminuyó un 22 %. La inactivación parcial de la C222A, sugiere que a tiempos largos se promueve la derivatización de otros residuos de Cys, que contribuyen en menor proporción a la inactivación. Para confirmar lo anterior, se cuantificó el número de Cys modificadas a las 2 y 24 h de incubación. Al primer tiempo el DTNB derivatizó 1.9 ± 0.32 Cys/monómero, mientras que a las 24 h se modificaron 3 ± 0.28 Cys/monómero, lo que sugiere que la tercera Cys modificada podría contribuir con el 22 % de inactivación. Así, este resultado prueba la posible participación de Cys distintas a la Cys222 en la pérdida de actividad.

Por otro lado también se evaluó el efecto del MTSCE sobre las enzimas mutantes (Figura 15). De forma análoga a lo demostrado con el DTNB y a excepción de la mutante C222A, el resto de las enzimas evaluadas fueron significativamente sensibles a este compuesto. Al incrementarse las concentraciones del MTSCE, la actividad disminuyó gradualmente hasta alcanzar una inactivación máxima con $60 \mu\text{M}$. Los resultados obtenidos apoyan la propuesta referente a que es necesario modificar químicamente a la Cys222 de la GITIM para inducir la pérdida de la actividad.

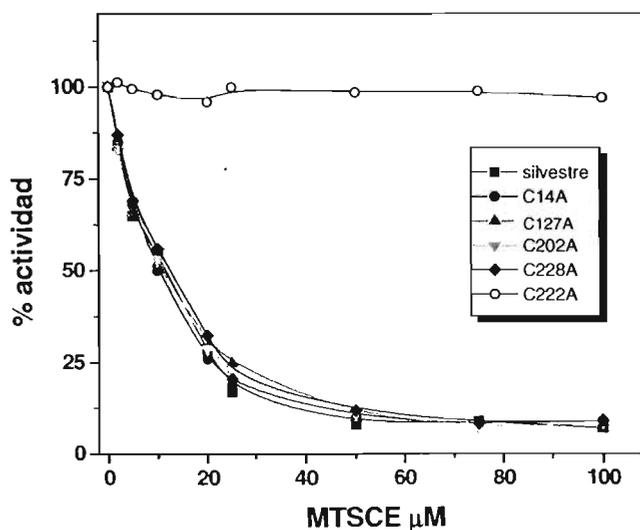


Figura 15. Porcentaje de actividad remanente de las enzimas silvestre y mutantes tratadas con concentraciones crecientes de MTSCE. Se utilizaron $50 \mu\text{g/mL}$ de cada enzima y se incubaron 2 h a 25°C en buffer de TE pH 7.4. Al final del ensayo se tomaron alícuotas de cada condición y se determinó la actividad residual.



En contraste con los anteriores derivatizantes, el MMTS inactivó diferencialmente a algunas mutantes (Figura 16). Las enzimas C202A y C228A se comportaron igual que la silvestre, alcanzando su máxima inactivación ($\approx 50\%$) con $6\ \mu\text{M}$ de MMTS. En cambio, la C127A se inactivó un 30% cuando la concentración fue de entre 5 a $50\ \mu\text{M}$; por arriba de estas concentraciones de MMTS la actividad decayó hasta un 50% . La C14A que resistió más que las mutantes ya descritas, sólo se inactivó un 30% a las concentraciones de MMTS ensayadas. Los resultados indican una probable contribución de la Cys14 en la inactivación con MMTS. Nuevamente la C222A resistió a la incubación con el derivatizante y conservó su actividad al 100% durante toda la condición experimental. Los ensayos de inactivación con MMTS se complementaron con la determinación del número de Cys derivatizadas en las mutantes C14A y C127A. Así, cuando se incubaron con $500\ \mu\text{M}$ de MMTS, el número de Cys modificadas por subunidad fue de 3 ± 0.16 y de 3.88 ± 0.2 para la C14A y C127A, respectivamente. Esto significa que para el caso de la C127A se alcanzaron a modificar sus cuatro Cys por subunidad. Tal resultado posiblemente se deba a que la sustitución de Cys por Ala en la posición 127 promueva que la estructura de la enzima se relaje, permitiendo el libre acceso del compuesto a todas las Cys.

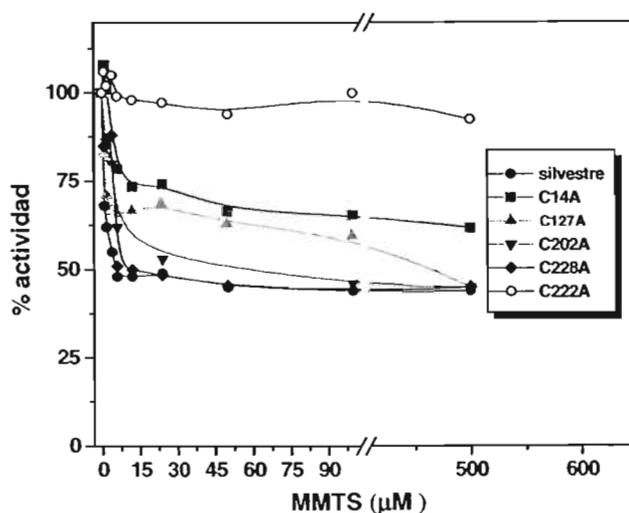


Figura 16. Porcentaje de actividad residual en las enzimas silvestre y mutantes, a distintas concentraciones de MMTS. Se utilizaron $50\ \mu\text{g/mL}$ de la enzima en buffer de TE pH 7.4, después de incubarlas 2 h a 25°C se tomaron alícuotas y se determinó la actividad residual.



5.5 EFECTO DEL DTT EN LA GITIM INCUBADA CON DTNB Y MMTS.

Una manera de evaluar indirectamente el grado de modificación en la estructura tridimensional de la GITIM por inactivación con DTNB y MMTS, es a través de estudiar la reversibilidad inducida por la adición de DTT. Se ha observado que a mayor grado de alteración estructural por los agentes derivatizantes, la capacidad de revertir la inactivación disminuye. Por ejemplo, los estudios con la TIM de tripanosomátidos tratados con MMTS mostraron sólo un 10 % de reversibilidad, coincidiendo con un grado de alteración estructural muy importante (Gómez-Puyou *et al.*, 1995).

El primer derivatizante que se ensayó fue el DTNB (Figura 17); utilizando 200 μM de este compuesto la inactivación máxima de la enzima se obtuvo a los 5 min (dato no mostrado). La primer alícuota que se tomó fue a los 10 min y se le añadió DTT; la actividad se recuperó de inmediato y completamente. Sin embargo, conforme se incrementó el tiempo de incubación con DTNB, el DTT fue menos eficiente para permitir recobrar la actividad enzimática, obteniéndose sólo un 27 % de recuperación a los 1400 min. Este resultado sugiere que a tiempos largos de incubación, la alteración en la estructura tridimensional de la GITIM por DTNB es mayor.

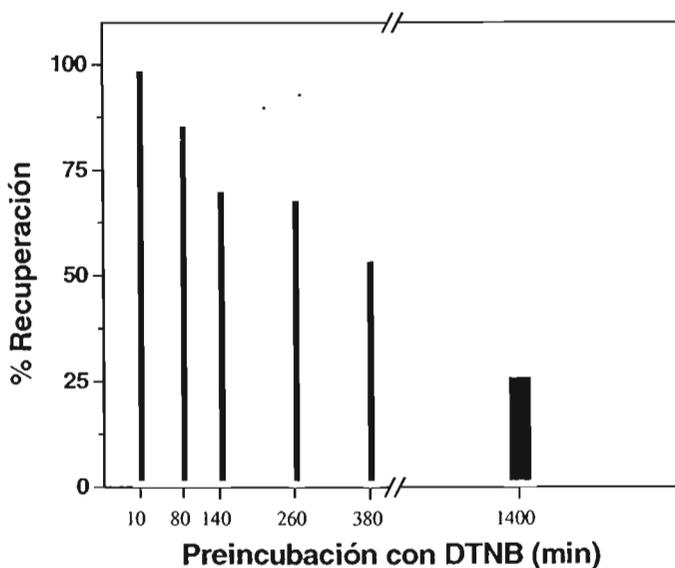


Figura 17. Recuperación de la actividad empleando DTT en la GITIM pretratada con DTNB. Se incubó GITIM a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con 200 μM de DTNB hasta inactivarla al máximo. Después se continuó la incubación y se tomaron alícuotas a los tiempos indicados y se les añadió 15 mM de DTT. Inmediatamente después se midió la actividad residual. Las barras muestran el porcentaje máximo de recuperación.



Para el caso del ensayo con MMTS se utilizó una sola adición de DTT después de incubar 120 min a la enzima con dicho derivatizante (Figura 18). En esta condición, la recuperación de la actividad fue lenta y parcial con un máximo de 25 %. A pesar de que el MMTS es neutro, pequeño y de que inactiva $\approx 50\%$, la enzima no mostró reactivación total a los tiempos evaluados. Tal resultado podría sugerir que este agente químico modifica la conformación de la zona cercana a las Cys derivatizadas. Sin embargo a pesar de que esta modificación es local, la cinética de recuperación en estas zonas hacia su estado nativo aparentemente es lenta.

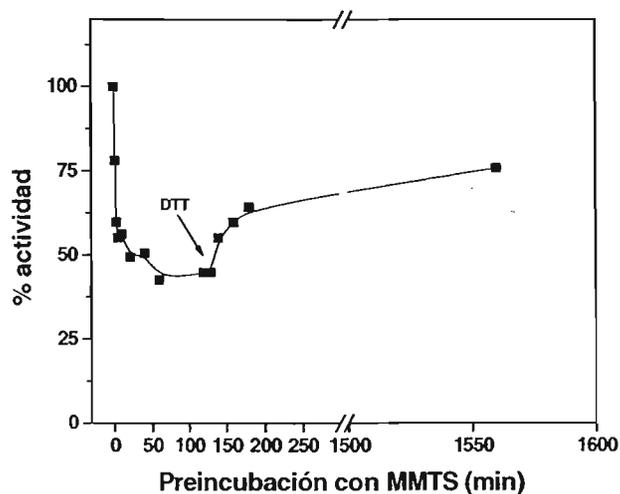


Figura 18. Reversibilidad en la inactivación de GITIM con MMTS. La enzima ($10\ \mu\text{g/mL}$) se incubó con $10\ \mu\text{M}$ de este compuesto hasta inactivarla $\approx 50\%$. A los 120 min se le adicionaron $15\ \text{mM}$ de DTT y se tomó una alícuota para medir la actividad. La flecha indica el momento de añadir el DTT.

5.6 DATOS ESTRUCTURALES.

Los datos que hasta aquí se presentaron nos ayudan a determinar probables sitios blanco en la GITIM para diseñar a largo plazo compuestos antiparasitarios. Sin embargo, es también importante contar con datos estructurales que establezcan una relación entre la inactivación y la posible desestabilización estructural en la enzima. Por lo anterior, se realizaron experimentos de cromatografía por exclusión molecular, fluorescencia intrínseca y electroforesis en geles nativos.



5.6.1 DETERMINACIÓN DEL ESTADO OLIGOMÉRICO Y PORCENTAJE DE ACTIVIDAD EN LA GITIM, INCUBADA CON LOS DERIVATIZANTES A DISTINTAS RELACIONES ESTEQUIOMÉTRICAS.

En la inactivación de la GITIM por agentes sulfhidriilo, están involucradas varias Cys, que contribuyen de manera diferencial en este proceso. Tal inactivación podría relacionarse con alteraciones en los contactos entre las subunidades, afectando su asociación en forma similar a lo observado en EhTIM (Rodríguez-Romero *et al.*, 2002).

Para identificar la contribución de cada Cys, se realizaron experimentos incubando la enzima a distintas relaciones estequiométricas con DTNB. En cada relación se tomó una alícuota y se midieron simultáneamente el número de Cys derivatizadas, la actividad residual, y el estado oligomérico mediante filtración molecular. La Figura 19 muestra los resultados obtenidos.

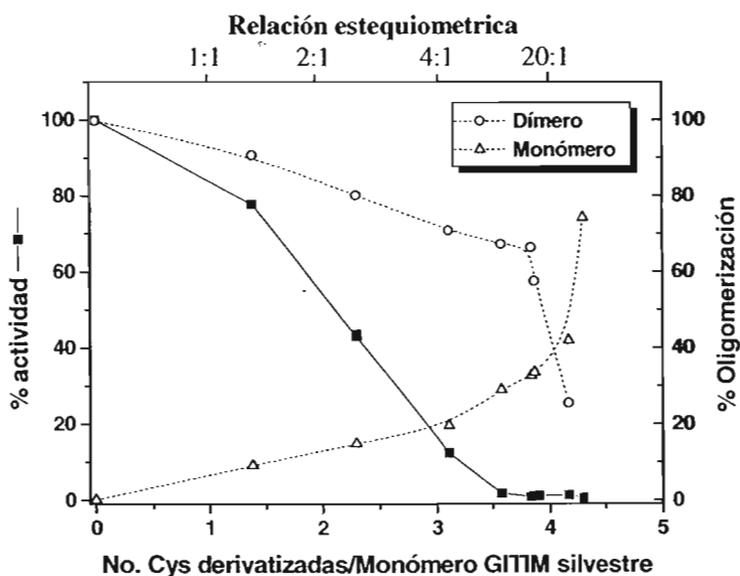


Figura 19. Relación entre el porcentaje de actividad y el estado oligomérico en la GITIM, al incubarse con DTNB a distintas relaciones estequiométricas. Las condiciones cromatográficas, así como la determinación de la actividad y número de Cys modificadas se describen en Material y Métodos.

La inactivación se inició desde que la primera Cys/subunidad fue derivatizada, obteniéndose el 90 % de la inactivación cuando se modificaron tres Cys. Con la cuarta Cys/monómero derivatizada la enzima se inactivó totalmente. Por otro lado, con la primera Cys modificada la población dimérica sólo disminuyó 10 %; con la tercer Cys modificada la cantidad de dímero presente fue del 70 %. Cuando se derivatizaron 4 Cys/monómero, la



población dimérica cayó drásticamente, enriqueciéndose con esto la fracción monomérica. Este comportamiento sugiere que al derivatizar exhaustivamente la GITIM con un grupo voluminoso y con carga, es posible lograr desestabilizar la estructura dimérica. Por tanto, el DTNB debe ser capaz de llegar hasta la Cys de interfase y monomerizar la enzima. La Tabla 9 es un resumen de algunos de los valores obtenidos para estos ensayos.

DTNB/monómero de GITIM	Cys derivatizadas/monómero	Porcentaje de actividad	Porcentaje del dímero	Porcentaje del monómero
0	0	100	100 ± 2	0
1:1	1 ± 0.4	80 ± 5	92 ± 3	10 ± 3
2:1	2.3 ± 0.2	55 ± 6	85 ± 4	15 ± 4
4:1	3 ± 0.3	10 ± 4	75 ± 4	20 ± 4
20:1	4.2 ± 0.3	2 ± 2	25 ± 5	75 ± 4

Tabla 9. Cys derivatizadas con DTNB y porcentaje de actividad residual de la GITIM determinadas a distintas relaciones estequiométricas. El porcentaje del dímero y monómero, así como de la actividad residual, se obtuvieron a partir de los valores mostrados en la Fig. 20.

A diferencia de la evaluación con DTNB, en los ensayos con MTSCE la enzima mantuvo constante su población dimérica en todas las relaciones estequiométricas que se ensayaron (Tabla 10). Al obtener una Cys/monómero modificada con MTSCE, el porcentaje de actividad disminuyó 10 %, mientras que con dos Cys modificadas la inactivación fue de un 35 %. Cuando se lograron derivatizar cerca de 4 Cys/monómero la GITIM se inactivó totalmente. En todas las relaciones estequiométricas que se ensayaron, los datos cromatográficos mostraron que el estado dimérico se conservó.

MTSCE/monómero de GITIM	Cys derivatizadas/monómero	Porcentaje de actividad	Porcentaje del dímero
0	0	100	100 ± 2
1:1	0.8 ± 0.2	92.5 ± 4	95 ± 3
2:1	2.3 ± 0.2	66.5 ± 6	99 ± 4
3:1	2.9 ± 0.3	41.5 ± 7	100 ± 2
4:1	3.8 ± 0.3	7.1 ± 4	94 ± 3

Tabla 10. Cys derivatizadas a distintas relaciones estequiométricas con MTSCE. Se muestra el porcentaje de actividad para cada Cys.



5.6.2 FLUORESCENCIA INTRÍNSECA DE LA GITIM SILVESTRE.

Con la intención de analizar los posibles cambios en la estructura de la GITIM se hicieron estudios de fluorescencia intrínseca. Para estos experimentos la enzima se incubó con 100 μM de MTSCE para asegurar su inactivación al máximo. Inmediatamente después se realizaron determinaciones de fluorescencia en un curso temporal, la Figura 20 muestra el resultado obtenido.

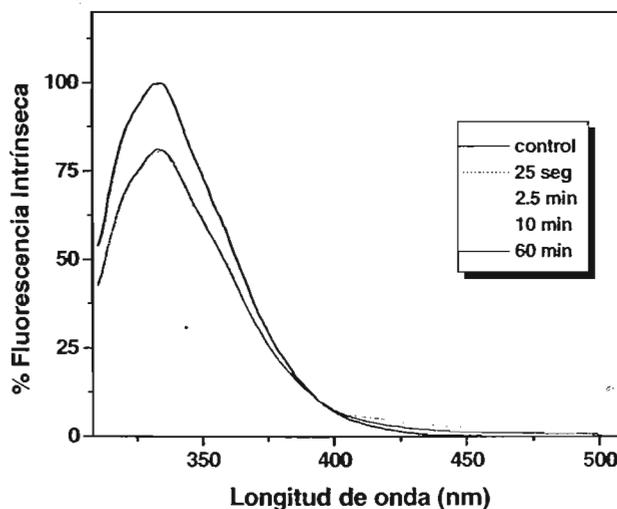


Figura 20. Espectro de emisión de fluorescencia, excitando a 295 nm. La gráfica muestra el porcentaje de fluorescencia intrínseca considerando como 100 % la enzima con MTSCE.

Los resultados muestran 2 espectros de fluorescencia principales, el espectro superior corresponde al experimento control (sin MTSCE), con 100 % de fluorescencia en el pico máximo. En el espectro inferior están sobrepuestas las condiciones con MTSCE a todos los tiempos evaluados. El primer espectro que se obtuvo fue a los 25 seg de incubación con el compuesto, obteniéndose una disminución en la fluorescencia de un 20 %. A partir de este momento, el porcentaje de fluorescencia en el resto de los tiempos evaluados fue el mismo. Esto sugiere una rápida modificación estructural, probablemente debida a la derivatización de la Cys más expuesta (ver discusión).

El valor de CEM para el control fue de 344 nm, mientras que el resto de los tiempos de incubación con MTSCE presentaron un CEM de 347.5 nm. Este desplazamiento fue de 3.5 nm hacia longitudes de onda mayores (corrimiento hacia el rojo) lo cuál sugiere cambios en la polaridad del medioambiente inmediato a los fluoróforos.



5.6.3 DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE MIGRACIÓN EN LA GITIM MEDIANTE GEL NATIVO.

Una pregunta de interés es, si la derivatización de la GITIM puede evidenciarse por la modificación de alguna otra propiedad bioquímica. Por ejemplo, a través de conferirle carga neta detectable a la enzima. En un gel nativo la movilidad de una proteína depende principalmente de su relación carga/masa. Así, dos proteínas que posean la misma masa molecular pero diferente carga neta, tendrán distinta movilidad electroforética. En caso de los geles nativos utilizados en este trabajo, la polaridad del campo electromagnético está invertida (el cátodo en la parte inferior del gel), por lo que una proteína que posea carga neta negativa tendrá menos movilidad que aquella que no posea esta característica.

De los reactivos usados, el MTSCE añade una carga neta negativa a la Cys derivatizada (Tabla 5), sin embargo el análisis cromatográfico mostró que el complejo GITIM-MTSCE mantiene su estructura cuaternaria (Tabla 10). Por tanto, es posible detectar la adición de la carga neta negativa mediante electroforesis en geles nativos. Para abordar esta pregunta, la GITIM se incubó a distintas relaciones estequiométricas con el derivatizante. Después de eliminar el MTSCE excedente, la muestra se corrió en un gel nativo, Figura 21.

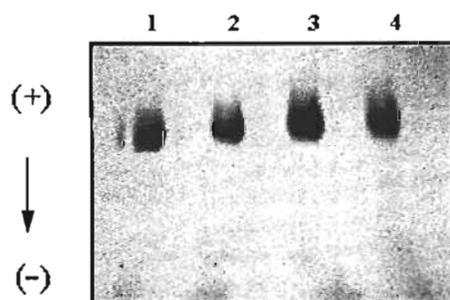


Figura 21. Gel nativo de la GITIM incubada 1h a 25°C con distintas relaciones estequiométricas MTSCE:monómero. Carril 1, GITIM sin MTSCE; carril 2, relación 1:1; carril 3, relación 2:1; carril 4, relación 4:1.

La migración de la enzima control (carril 1) fue mayor que las modificadas por el MTSCE (carriles 2 a 4). Además las enzimas de los carriles 2, 3 y 4 mostraron diferencias de migración muy discretas entre ellas. Estos datos sugieren que la inactivación de la GITIM inducida con el MTSCE está relacionada con la adición de grupos con carga negativa sobre los residuos de Cys.



6. DISCUSIÓN

6.1 LA Cys222 DE LA GITIM ES UN SITIO BLANCO PARA LA INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA.

El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar el comportamiento de la GITIM y sus residuos de Cys, en función al tratamiento con distintos agentes derivatizantes. El propósito fue conocer si es posible considerar alguna o algunas de las Cys como regiones blanco para el diseño de moléculas inactivadoras de la enzima. Esta idea se abordó, considerando trabajos previos que centraron su atención en residuos poco conservados de proteínas homólogas. En estos, se han caracterizado grupos sulfhidrilo con reactivos específicos para dichos grupos. Los resultados obtenidos al exponer la GITIM a 3 diferentes derivatizantes, sugieren que la modificación química del residuo C222 es la principal responsable en la inactivación. Aunque el número de Cys que derivatizó cada compuesto fue de 3 ó 4, resulta complicado conocer con estos datos el orden de derivatización. Sin embargo, la obtención de un cristal en nuestro laboratorio nos permitió obtener información importante referente al ambiente que rodea a las Cys de la GITIM.

Por ejemplo, se obtuvo el porcentaje de área accesible al solvente (ASA) que exhibe cada uno de estos residuos. Esta información permite realizar una predicción del orden de derivatización en función de la accesibilidad al agua que presenta cada residuo de Cys. Por ejemplo, Maithal y colaboradores (2002) obtuvieron datos de ASA para las 4 Cys presentes en la PFTIM. El ASA de sus residuos de Cys en orden decreciente fue: C196, C217, C13 y C126, cuyos valores en porcentaje son 36.5, 2.8, 0.1 y 0, respectivamente. Los autores demostraron que el orden de derivatización fue proporcional al valor de ASA de estos residuos. Así, primero se modificó la C196, segundo la C13, y los residuos C126 y C217 se derivatizaron simultáneamente.

En el caso de la GITIM el porcentaje de ASA en orden decreciente que se calculó para cada una de las cinco Cys fue: primero la C202, segundo la C228, cuyos valores son 34 y 0.8, respectivamente. La C14 y C222 presentan el mismo valor de ASA (0.09), mientras que la C127 exhibió un valor de cero. La Figura 22 muestra la posición espacial de estos residuos.

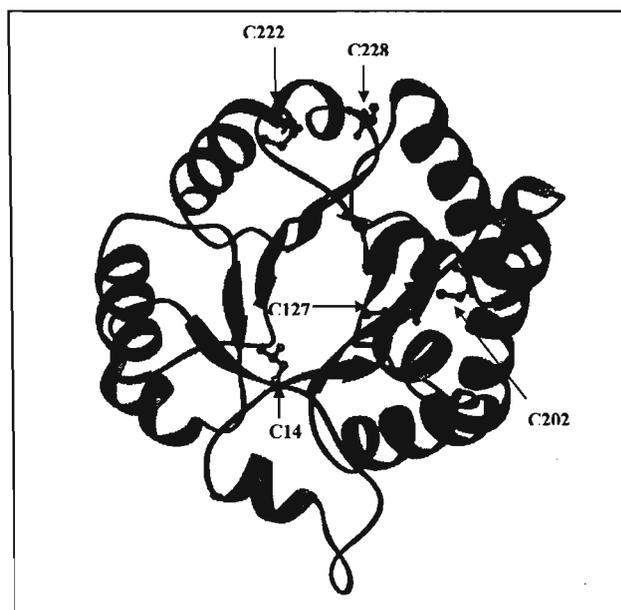


Figura 22. Estructura de una de las subunidades de la GITIM en representación de listones. Las flechas indican la posición de los residuos de Cys presentes.

Nuestros datos de ASA permiten sugerir que el orden de derivatización es: primero la C202, segundo la C228. La C14 y la C222 presentaron el mismo valor de ASA (0.09 %), por lo que la probabilidad de modificación química para ambos residuos sería equivalente. Sin embargo, los datos cromatográficos de la GITIM tratada con DTNB demuestran que se requieren 3 Cys modificadas para la inactivación, y de 4 para la disociación del dímero (Tabla 9). Debido a que la alquilación de la C222 es responsable de la mayor inactivación (ver Figs. 14 a 16), proponemos que éste es el tercer residuo en derivatizarse. Así, el cuarto residuo que se modificaría es la C14; esta propuesta se apoya además con los estudios de derivatización en la EhtIM, donde se demostró que la modificación de la C14 induce la disociación de la enzima (Rodríguez-Romero *et al.*, 2002). La quinta Cys sólo puede cuantificarse desnaturalizando a la proteína con SDS, esta Cys posiblemente sea la C127. Datos obtenidos en PftIM indican que el residuo equivalente a la C127 en GITIM tiene poca accesibilidad al solvente, así como la resistencia a ser derivatizado por el ácido iodoacético (Maithal *et al.*, 2002). Por otra parte, los experimentos de cromatografía de filtración molecular realizados en la GITIM tratada con MTSCE muestran que la fracción dimerica permanece constante. En contraste, la actividad disminuye gradualmente conforme se derivatizan Cys (ver Tabla 10). Por tanto, para la GITIM, es importante considerar no solo la carga del derivatizante, sino además las dimensiones del mismo, para



lograr un efecto inhibitorio y de disociación de la enzima. Al respecto, debe recordarse que a pesar de que el MTSCE y el DTNB presentan carga neta negativa, éste último es 1.7 veces más voluminoso (Tabla 5).

Los datos de doble marcaje (ver Fig. 13) indican que el MMTS protege contra la inactivación producida con el DTNB en la GITIM. Esto sugiere que ambos agentes químicos derivatizan las mismas Cys. Así mismo, un dato interesante que adicionalmente se obtuvo es que, aunque el DTNB logra alquilar una Cys más de la GITIM previamente tratada con MMTS, la actividad no se modificó. Estos resultados apoyan fuertemente que la inactivación completa de la GITIM se obtiene utilizando un agente químico cargado y voluminoso. La relevancia de modificar Cys con un grupo grande y con carga neta negativa, ha sido también sugerida por Garza-Ramos y colaboradores (1996). Este grupo investigó el efecto de algunos derivatizantes sobre la TIM de *S. Pombe* (SpTIM). Por ejemplo, al exponer a la enzima con MMTS la actividad disminuyó aproximadamente un 50 %. Por otra parte, si la enzima se trataba con PTTS (ver Fig. 5) se obtenía un 90 % de inactivación. En cambio, cuando la enzima se incubó primero con MMTS y posteriormente con PTTS, la actividad sólo disminuyó un 50 % (producido únicamente por el MMTS), logrando proteger a la enzima contra el efecto del PTTS. De sus análisis de derivatización de las dos Cys que la SpTIM contiene (C126 y C217) concluyeron que la inactivación podría deberse a la modificación química de la C217, que es homóloga en posición a la C222 de la GITIM. Así, los resultados descritos anteriormente en conjunto con los antecedentes mencionados, sugieren que la disminución de la catálisis de la GITIM se debe principalmente a la modificación química de la C222. Este dato se confirmó con los estudios de mutagénesis dirigida, mostrando que la mutante C222A es completamente resistente al tratamiento con derivatizantes (Ver Figs. 14 a 16).

6.2 LA DISOCIACIÓN DEL DIMERO NO ES REPONSABLE DE LA INACTIVACIÓN EN LA GITIM.

Los datos reportados del estado oligomérico de la GITIM al incubarla con MTSCE ó DTNB fueron contrastantes. Mientras que con el primer compuesto se mantuvo una población dimérica, con el segundo se obtuvo una disminución gradual de la fracción dimérica (Tabla 10 y Fig. 19). De esta forma, al alcanzar un número de 4 Cys derivatizadas



con DTNB, la fracción dimérica disminuyó drásticamente, incrementándose simultáneamente la población monomérica. Sin embargo, es importante subrayar que el porcentaje de actividad llegó a su nivel más bajo desde la tercer Cys derivatizada. Así, estos datos sugieren que la monomerización no es responsable de la caída más importante de la actividad enzimática en GITIM mediante la derivatización de Cys.

Por otra parte, observamos que la disociación de la GITIM al tratarla con DTNB no presentó agregación. Este comportamiento es similar a lo que reportó para la EhTIM tratada con MMTS, y para la PftTIM tratada con ácido iodoacético en donde estos compuestos disociaron a las enzimas sin agregarlas. En contraste la modificación química en las TIM de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. mexicana* muestran una clara tendencia a la agregación (Garza-Ramos *et al.*, 1998).

6.3 ANALISIS DE LA GITIM DERIVATIZADA CON MTSCE.

En experimentos subsecuentes se investigó la posible perturbación estructural de la GITIM al incubarse con MTSCE. La modificación química produjo una disminución del 20 % en la fluorescencia intrínseca. En cambio, el pico de máxima emisión de fluorescencia así como el CEM tuvo un corrimiento hacia el rojo de 4 nm.

Interesantemente el MTSCE modificó 4 Cys en la GITIM y posiblemente una de ellas sea la C14, sin embargo la enzima no mostró disociación (Tabla 10). Los datos de fluorescencia sugieren una alteración parcial en su estructura como consecuencia de la modificación química. Esta alteración se encuentra probablemente en el ambiente cercano a lo(s) fluoróforo(s). Además, el obtener pequeñas diferencias en el CEM sugiere que la polaridad del ambiente inmediato a los fluoróforos no cambió significativamente. Así, la enzima no parece sufrir modificaciones importantes en el área accesible al solvente por la derivatización con MTSCE. Este dato contrasta con lo reportado para la derivatización de la TbTIM, donde se observó que la fluorescencia intrínseca disminuyó un 42 % (Gómez-Puyou *et al.*, 1995). Por último, el análisis de la movilidad electroforética de la GITIM tratada con MTSCE en geles nativos, confirmó que este compuesto confiere carga neta a la enzima, modificando con esto su movilidad electroforética. Concluimos por tanto que la carga del derivatizante es importante para inactivar la enzima. El resultado obtenido del gel también sugiere que este compuesto no desestabiliza a la GITIM.



7. CONCLUSIONES

La inactivación de la GITIM con los derivatizantes permitió explorar regiones de la enzima como posibles sitios importantes para considerar en el diseño de antiparasitarios.

La máxima inactivación de la enzima se obtiene derivatizando con un compuesto que aporte un grupo relativamente grande y con carga neta negativa a la Cys.

La modificación química de la Cys222 es fundamental para inducir la inactivación de la enzima, sugiriendo ser un blanco muy promisorio en el diseño de alguna molécula que inactive selectivamente a la TIM de *G. lamblia*. Otro(s) residuos de Cys también pudieran estar contribuyendo a la inactivación, por lo que también podrían ser considerados como un blanco secundario o en sinergia con el residuo C222.

Los resultados descritos en este trabajo enfatizan la idea de considerar residuos distintos a lo clásicamente reportado (C14) como blanco para diseñar antiparasitarios. De esta forma, se abren posibilidades de explorar regiones poco contempladas en dichas enzimas.



8. REFERENCIAS

- Adam, R., D. (2001) Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. **14**: 447-475.
- Ahmad, N., Battah, S., Karachalias, N., Babaei-Jadidi, R., Horanyi, M., Baroti, K., Hollan, S., Thornalley, P., J. (2003) Increased formation of methylglyoxal and protein glycation, oxidation and nitrosation in triosephosphate isomerase deficiency. Biochim. Biophys. Acta. **1639**:121-132.
- Banner, D., W., Boomer, A., C., Petsko, G., A., Phillips, D., C., Pogson, C., I., Wilson, I., A., Corran, P., H., Furt, A., J., Milman, J., D., Offord, R., D., Priddle, J., D., Waley, S., G. (1975) Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5Å resolution using aminoacid sequence data. Nature. **255**: 609-614.
- Beaucamp, N., Hofman, A., Keller, B., Jaenicke, R. (1997) Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: design and characterization of the separate triosephosphate isomerase. Protein Sci. **6**:2159-2165.
- Casal, J., I., Ahern, T., J., Davenport, R., C., Petsko, G., A., Klivanov, A., M. (1987) Subunit interface of triosephosphate isomerase: site-directed mutagenesis and characterization of the altered enzyme. Biochemistry. **26**:1258-1264.
- Chotia, C. (1976) The nature of the accessible and buried surfaces in proteins. J. Mol. Biol. **105**:1-12.
- Coeddel, V., D. (1998) Methods in enzymology vol. 185. Press New York. p 60-85.
- Compagno, C., Barmbila, L., Capitanio, D., Boschi, F., Ranzi, B., M., Porro, D. (2001) Alterations of the glucose metabolism in a triosephosphate isomerase-negative *Saccharomyces cerevisiae* mutant. Yeast. **18**:663-670.
- Creighton, T. E.. (1993). Proteins: *structures and molecular properties*. W. H. Freeman and Company. New York NY. Pag 4.
- Creighton, T., E. (1997) Proteins: Structure and Molecular Properties, 2nd ed., W. H. Freeman, New York. Pags. 153-161.
- Darbon, A., A. Portal, L. Girier, J. Pantin, and C. Leclaire. (1962) Traitement de la giardiase (lambliaise) par le me´tronidazole. Presse Med. **70**:15– 16.



- Durel, P., Roiron, V., Sibloulet, A., Borel L. J. (1959) Essai d'un antitrichomonas dérivé de l'imidazole (8823 R. P.). C. R. Soc. Fr. Gynecol. **29**:36–45.
- Edwards, D. I. (1986) Reduction of nitroimidazoles *in vitro* and DNA damage. Biochem. Pharmacol. **35**:53–58.
- Edwards, R. M., Schofield, J. P., O'Sullivan, J. W., Costello, M. (1992) Arginine metabolism during culture of *Giardia intestinalis*. Mol. Biochem. Parasitol. **53**:97-104.
- Eisenthal, R., Cornish-Bowden, A. (1998) Prospects for antiparasitic drugs. The case of *Trypanosoma brucei*, the causative agent of African sleeping sickness. J. Biol. Chem. **273**:5500-5505.
- Ellman, G., L. (1958) A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. Arch Biochem Biophys. **74**:443-450.
- Eyera, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V., Reinerc, E. (2003) Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. Analytical Biochemistry **312**:224–227.
- Richards, F.M. (1974) *The interpretation of protein structures: Total volume, group volume distributions and packing density*. J. Mol. Biol. **82**:1-14 (1974).
- Garza-Ramos, G., Pérez—Montfort, R., Rojo-Domínguez, A., de Gómez-Puyou, M. T., Gómez-Puyou, A. (1996) Species-specific inhibition of homologous enzymes by modification of nonconserved amino acids residues. The cysteine residues of triosephosphate isomerase. Eur. J. Biochem. **241**:114-120.
- Garza-Ramos, G., Cabrera, N., Saavedra-Lira, E., Tuena de Gómez-Puyou, M., Ostoa-Saloma, P., Pérez-Montfort, R., Gómez-Puyou, A. (1998) Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. Eur J Biochem. **253**:684-691.
- Gerstein, M. (1992) "A resolution-sensitive procedure for comparing protein surfaces and its application to the comparison of antigen-combining sites". Acta Cryst. **A48**:271-276.
- Gómez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R. A., Rojo-Domínguez, A., Pérez-Montfort, R. (1995) Using evolutionary changes to achieve species-specific



- inhibition of enzyme action--studies with triosephosphate isomerase. *Chem Biol.* **2**:847-855.
- Hernández-Alcántara, G., Garza-Ramos, G., Mendoza, H., G., Gómez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R. (2002) Catalysis and stability of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface. Characterization of a catalytically competent monomeric enzyme. *Biochem.* **41**: 4230-4238.
- Hoyne, G. F., Boreham, P. F. L., Parsons, P. G., Ward, C., Biggs, B. (1989) The effect of drugs on the cell cycle of *Giardia intestinalis*. *Parasitology.* **99**:333–339.
- Ish-Horowics, M, I., Korman, S.H., Shapiro M., Even, V.H. (1989) Asymptomatic Giardiasis in Children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **8**:773-779.
- Kenyon, G., L., y Bruce, T., W. (1977) Chemical modification. Novel sulfhydryl reagents. *Methods in Enzymology.* Academic press. New York. **47**: 407-430.
- Kohlhoff M, Dahm A, Hensel R. (1996) Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea. *FEBS Lett.* **383**:245-250.
- Lee, B., Richard M., F. (1970) The interpretation of protein structures: Estimation of static accesibility. *J. Mol. Biol.* **55**:379-400.
- Legator, M. S., Connor, T. H., Stoekel, M. (1975) Detection of mutagenic activity of metronidazole and niridazole in body fluids of humans and mice. *Science.* **188**:1118–1119.
- Levine, N., D., Corlis, J., O., Cox, F. (1980) A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozol.*; **27**:37-58.
- Lloyd, D., Pedersen, J. Z. (1985) Metronidazole radical-anion generation *in vivo* in *Trichomonas vaginalis* oxygen quenching is enhanced in the drug resistant strain. *J. Gen. Microbiol.* **131**:87–92.
- Lopez-Nigro, M. M., Palermo, A. M., Mudry M .D., Carballo M. A. (2003) Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. *Toxicology in Vitro.* **17**:35-40.
- López-Velázquez, G., Molina-Ortiz, D., Cabrera, N., Hernández-Alcantara, G., Peon-Peralta, G., Yépez-Mulia, L., Pérez-Montfort, R., Reyes-Vivas, H. (2004) An unusual triosephosphate isomerase from the early divergent eukaryote *Giardia lamblia*. *Proteins: Structure Function, and Bioinformatics.* **55**:824–834.



- Maithal, K., Ravindra, G., Balaram, H., Balaram, P. (2002) Inhibition of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase by chemical modification of an interphase cysteine. *J. Biol. Chem.* **277**:25106-25114.
- Moya-Camarena, Sotelo, N., Valencia, M., E. (2002) Effects of asymptomatic *Giardia intestinalis* infection on carbohydrate absorption in well nourished Mexican children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**:255-259.
- Mowatt, M., R., Weinbach, E., C., Howard, T., C., Nash, T., E. (1994) Complementation of an *Escherichia coli* glycolysis mutant by *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase. *Exp. Parasitol.* **78**:85-92.
- Muller, M. (1983) Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. *Surgery* **93**:165-171.
- Newton, C., R., Graham, A. (1997) PCR. Ed. Springer. 183 pp.
- Pace, C., N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**:2411-2423.
- Paget, T. A., Jarroll, E. L., Manning, P., Lindmark, D. G., Lloyd, D. (1989) Respiration in the cyst and trophozoite forms of *Giardia muris*. *J. Gen. Microbiol.* **135**:145-154.
- Penefsky, H., S. (1977) Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **252**:2891-2899.
- Rodríguez-García, R., Aburto-Bandala, M., Sánchez-Maldonado, M. I. (1996) Eficacia del Albendazol en el Tratamiento de la Giardiasis en Niños. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **53**:173-177.
- Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., Yauner, P., L., Kornhauser, A., Fernández-Velasco, A. (2002) Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.* **322**:669-675.
- Sanger, F. (1988) Sequences sequences and sequences. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:1-28.
- Sogin, M., L., Gunderson, J., H., Elwood, H., J., Alonso, R., A., Peattie, D., A., (1989) Phylogenetic meaning of the kingdom concept: An unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science.* **243**:75-77.
- Stroppolo, M., E., Falconi, M., Caccuri, A., M., Desideri, A. (2001) Superefficient enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**:1451-1460.



- Tovar, J., Fairlamb, A., N. (1996) Extrachromosomal, homologous expression of trypanothione reductase and its complementary mRNA in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Research*. **24**:2942-2949.
- Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L., B., Sutak, R., Tachez, J., Van der Giezen, M., Hernández, M., Muller, M., Lucocq, J., M. (2003) Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*. **426**:172–176.
- Upcroft, J., Upcroft, P., (1998) My favorite cell: *Giardia*. *BioEssays*. **20**:256-263.
- Voet, D., Voet, G., J. (1995) *Biochemistry*. John Wiley & sons, Inc. New York, NY. 1261 pp.
- Waley, S., G. (1973) Refolding of triosephosphate isomerase. *Biochem. J.* **135**:165-172.
- Walden, H., Taylor, G., Lilie, H., Knura, T., Hensel, R. (2004) Triosephosphate isomerase of the hyperthermophile *Thermoproteus tenax*: thermostability is not everything. *Biochem Soc Trans.* **32**:305.
- Walterspiel, J. N., Morrow, A. L., Lourdes, G. M., Pickering, L. K. (1994) Secretory Anti-*Giardia lamblia*. Antibodies in Human Milk: Protective effect against diarrhea. *Pediatrics*. **93**:28-31.
- Wierenga, R., K., Noble, M., E., Davenport, R., C. (1992) Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* **224**:1115-1126.
- Wright, J. M., Dunn, L. A., Upcroft, P., Upcroft, J. A. (2003) Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert. Opin. Drug. Saf.* **2**:529-541.
- Zubillaga, A., Ruy-Pérez, M., Gómez-Puyou, A. (1994) Differential inactivation of rabbit and yeast triosephosphate isomerase: Effect of oxidations produced by chloramine-T. *Archives of biochemistry and biophysics*. **313**:328-336.