



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE S-ADENOSILMETIONINA  
DESCARBOXILASA Y ESPERMIDINA SINTASA  
RECOMBINANTES DE *Trypanosoma cruzi***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**



**ANA MARÍA RAYAS REGALADO.**

**MÉXICO D.F., 2012**



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	BERTHA RESENDIZ VAZQUEZ
VOCAL	JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE
SECRETARIO	EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA
1er SUPLENTE	FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
2do. SUPLENTE	JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

El trabajo se desarrolló en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

Asesora: Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira

Asesor Técnico: Dra. Viridiana Olin Sandoval

Sustentante: Ana María Rayas Regalado

## AGRADECIMIENTOS.

Doy gracias a Dios y a la vida misma por haberme permitido lograr mis sueños, pues su sabiduría jamás se equivoca pues hoy me doy cuenta que “este momento” a pesar del tiempo resulto ser mucho más gratificante que de haberlo logrado años atrás ya que no solo me permitió conocer a seres maravillosos como VIRI, ZABDI, ERICKA y RUSS que con su enorme paciencia, corazón y sabiduría me hicieron crecer en mente y espíritu.... sino porque además lo puede compartir con mis dos más grandes amores mis hijas KARLA y CAROL a quienes no solo les dedico con todo mi amor este maravilloso esfuerzo sino les agradezco su infinita bondad, pues me demostraron con su paciencia y esfuerzo la virtud de su gran corazón.

Doy mil gracias a la Dra Emma Saavedra y de nuevo a ti VIRI por su confianza y apoyo por demostrarme que en la vida uno no solo se topa con metas y sueños sino también con personas maravillosas como ustedes que te ayudan a alcanzarlos. De todo corazón mil gracias. Nunca olvidare lo que hoy hicieron por mí.

A todos los chic@s del laboratorio pero en especial al Dr. Moreno, al Dr. Jasso y al Dr. Quezada, porque este trabajo no solo es mío sino de todos ustedes, pues en el laboratorio aprendí a no caminar sola sino en equipo, mil gracias de verdad

A mi mami, a mis abuelitos y a todos mis tíos por su incondicional amor y por enseñarme con su ejemplo a luchar por lo que quieres y a nunca darme por vencida. Los amo, al igual que te amo a ti CARLOS .

## RESUMEN.

*Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la tripanosomiasis americana, mejor conocida como enfermedad de Chagas, la cual es considerada endémica del continente americano y afecta a más de 18,000,000 de personas en toda América Latina. A un siglo de la descripción oficial de la enfermedad, solamente se cuenta con dos fármacos antichagásicos, el nifurtimox y el benznidazol, los cuales producen graves efectos tóxicos en los pacientes debido a su tratamiento prolongado, además de ser costosos y poco disponibles comercialmente, aunado a la aparición de resistencia en los parásitos. Estos hechos enfatizan la importancia de buscar nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad.

Durante su ciclo de vida los parásitos se encuentran expuestos a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) derivados de su propio metabolismo, de la respuesta inmune del hospedero y por los fármacos que se utilizan para el tratamiento de la enfermedad. La defensa antioxidante de *T. cruzi* recae en el tripanotión [T(SH)<sub>2</sub>] el cual es un conjugado de dos moléculas de glutatión (GSH) con una de espermidina (Spd). El T(SH)<sub>2</sub>, junto con la tripanotión reductasa (TryR) y una gran variedad de enzimas antioxidantes dependientes del T(SH)<sub>2</sub>, reemplazan las funciones antioxidantes que el sistema GSH/GSH-reductasa realiza en las células humanas.

En el laboratorio se ha hecho la caracterización cinética de las enzimas de la vía de la síntesis de GSH, del T(SH)<sub>2</sub>, de las enzimas antioxidantes dependientes de T(SH)<sub>2</sub> y la TryR con el objetivo de identificar a través de modelado metabólico a las enzimas con el mayor potencial terapéutico. Sin embargo, existe poca información acerca de la síntesis *de novo* de Spd en la cual están involucradas la espermidina sintasa (SpdS), la cual se encarga de sintetizar Spd a partir de putrescina y S-adenosilmetionina descarboxilada (dAdoMet). A su vez la dAdoMet se sintetiza a partir de la descarboxilación de la S-adenosilmetionina (AdoMet) por la S-adenosilmetionina descarboxilasa (AdoMetDC).

Mi tesis de licenciatura se enfocó en clonar a los genes, sobre-expresar, purificar y caracterizar cinéticamente a la AdoMetDC y SpdS de *T. cruzi* de la cepa Ninoa. Los análisis cinéticos se realizaron en condiciones de pH y temperatura que asemejan las condiciones intracelulares del parásito con el objetivo de poder comparar sus propiedades catalíticas con las enzimas de todo el resto del metabolismo del T(SH)<sub>2</sub> que ya se caracterizaron en el laboratorio.

Se pudieron obtener ambas enzimas en su forma recombinante con porcentajes altos de pureza. Se pudo establecer una metodología para determinar la actividad enzimática de la AdoMetDC la cual demostró que la enzima obtenida es activa. Sin embargo debido a su baja capacidad catalítica, no se pudo utilizar esta enzima para poder determinar la actividad de la SpdS al utilizarla en un ensayo acoplante.

Los avances obtenidos en esta tesis permitirán en un futuro poder caracterizar a las enzimas de la síntesis *de novo* de Spd en *T. cruzi*.

## ÍNDICE.

1. INTRODUCCIÓN
  - 1.1 Características del parásito
  - 1.2 Ciclo de vida del parásito
  - 1.3 Características del insecto transmisor y los hospederos mamíferos
  - 1.4 Vías de transmisión del parásito
  - 1.5 Epidemiología de la enfermedad de Chagas
  - 1.6 Enfermedad de Chagas
  - 1.7 Etapas y sintomatología de la enfermedad
  - 1.8 Tratamiento de la enfermedad
  - 1.9 Metabolismo antioxidante en *Trypanosoma cruzi*
  - 1.10 Características de las poliaminas
  - 1.11 Características cinéticas de la enzimas involucradas en la síntesis de Spd
  - 1.12 Características cinéticas y estructurales de la AdoMetDC
  - 1.13 Características cinéticas y estructurales de la SpdS
2. JUSTIFICACIÓN
3. HIPÓTESIS
4. OBJETIVO GENERAL
5. OBJETIVOS PARTICULARES
6. METODOLOGÍA
  - 6.1 Análisis del DNA y diseño de los cebadores
  - 6.2 Amplificación de los genes de AdoMetDC y SpdS
    - 6.2.1 Fundamento del Método de Reacción en Cadena de la Polimerasa
    - 6.2.2. Protocolo experimental
  - 6.3 Análisis del DNA amplificado por electroforesis en gel de agarosa
    - 6.3.1 Fundamento de la técnica
    - 6.3.2 Protocolo experimental
    - 6.3.3 Purificación de los fragmentos de DNA de la agarosa
  - 6.4 Clonación del DNA amplificado en un plásmido para productos de PCR
    - 6.4.1 Fundamento de la clonación
    - 6.4.2 Protocolo experimental
  - 6.5 Transformación bacteriana y selección de células competentes
    - 6.5.1 Fundamento
    - 6.5.2 Protocolo experimental
  - 6.6 Purificación del DNA plasmídico por el método de Miniprep
  - 6.7 Confirmación de la clonación del gen deseado
  - 6.8 Clonación de genes en el vector de sobreexpresión
    - 6.8.1 Fundamento del sistema de expresión heteróloga pET
    - 6.8.2 Clonación en el vector de expresión
    - 6.8.3 Sobreexpresión de las enzimas en las bacterias
    - 6.8.4 Purificación de las proteínas recombinantes
  - 6.9 Cuantificación de las proteínas por el método de Lowry
    - 6.9.1 Fundamento de la técnica
    - 6.9.2 Protocolo experimental

- 6.10 Caracterización cinética de las enzimas por espectrofotometría
  - 6.10.1 Protocolo experimental
- 6.11 Caracterización cinética de AdoMetDC por cromatografía de gases
  - 6.11.1 Fundamento de la Cromatografía de gases
  - 6.11.2 Protocolo de la medición de la actividad de AdoMetDC

## 7. RESULTADOS

- 7.1 Amplificación de los genes de AdoMetDC y SpdS
- 7.2 Clonación del DNA amplificado en un vector para productos de PCR
- 7.3 Digestión del DNA plasmídico
- 7.4 Secuenciación
- 7.5 Clonación, expresión y purificación de las proteínas recombinantes
- 7.6 Caracterización cinética de AdoMetDC y SpdS por espectrofotometría
- 7.7 Caracterización cinética de AdoMetDC por cromatografía de Gases

## 8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

## 9 CONCLUSIONES

## 10 PERSPECTIVAS

## 11 BIBLIOGRAFÍA

## ABREVIATURAS.

AdoMet	S-adenosilmetionina
AdoMetDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
cat	catalasa
cys	cisteína
dAdoMet	S- adenosilmetionina descarboxilada
$\gamma$ -ECS	gama-glutamilcisteína sintetasa
Glu	glutamato
Gly	glicina
GPxA	glutación peroxidasa A
GPXB	glutación peroxidasa B
GSH	glutación
GPx	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMAC	cromatografía de afinidad a metales pesados inmovilizados
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido
<i>K<sub>m</sub></i>	constante de Michaelis-Menten
LB	medio Luria- Bertani
NAD <sup>+</sup>	dinucleótido de nicotinamida en su forma oxidada
NADH	dinucleótido de nicotinamida en su forma reducida
NFX	nifurtimox
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
Pfu	DNA polimerasa de <i>Pyrococcus furiosus</i>
Put	putrescina
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (electrophoresis de proteínas en gel de poliacrilamida)

Spm	espermina
SOD	superóxido dismutasa
Spd	espermidina
SpdS	espermidina sintasa
TryR	triptanotión reductasa
TryS	triptanotión sintetasa
Trx	tioredoxina
TrxR	tioredoxina reductasa
TS <sub>2</sub>	disulfuro de tripanotión
T(SH <sub>2</sub> )	triptanotión
TXN	triparedoxina
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. Características del parásito

*Trypanosoma cruzi* es un parásito protozoario intracelular perteneciente a la Clase *Zoomastigophora*, Orden *trypanosomatida*, Familia *Trypanosomatidae* el cual es el causante de la Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana.

Dentro de esta misma familia podemos enumerar a otros parásitos causantes de distintas enfermedades relevantes tales como *Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma brucei rhodesiense* que causan la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana; *Leishmania sp.*, causante de la leishmaniasis visceral y tegumentaria (Stuart *et al.*, 2008 y Barrett *et al.*, 2003) y *Crythidia sp.*, parásito de los insectos el cual se transmite de un hospedero a otro a través de sus heces.

Los tripanosomátidos son organismos eucariontes que cuentan con un cuerpo alargado que llega a medir entre 15 y 20  $\mu\text{m}$ , una única mitocondria denominada cinetoplasto que contiene DNA mitocondrial y un solo flagelo que le confiere la característica de ser móviles en algunas etapas de su ciclo de vida. Son parásitos que se dividen por fisión binaria y son transmitidos al hombre a través de un insecto vector (Barret *et al.*, 2003).

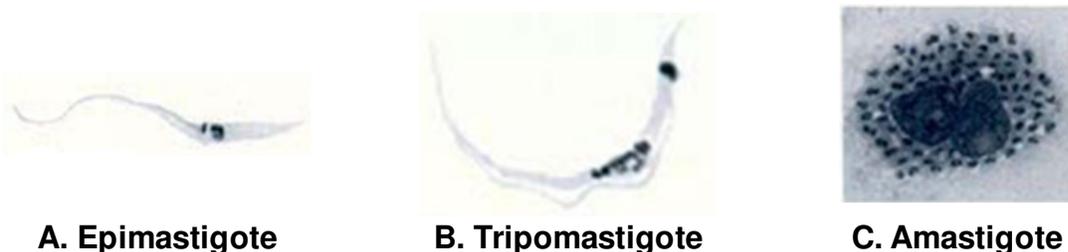
*T. cruzi* puede presentarse en cuatro estadios (Fig. 1) en los cuales la localización del flagelo, el núcleo y su mitocondria además de su presencia en los hospederos varían en cada uno de ellos (Tay-Zavala *et al.*, 2002 y Guzman-Marín *et al.*, 1999). Estos estadios se conocen con el nombre de:

a) epimastigote (Fig. 1A): forma proliferativa del hospedero insecto. Cuentan con un flagelo localizado en la parte media de la célula, un núcleo central y un cinetoplasto anterior a este último. Se reproducen por fisión binaria de manera abundante. Es la forma biológica de elección para la mayor parte de los experimentos que se realizan en este parásito ya que se puede cultivar *in vitro*.

b) tripomastigote sanguíneo (Fig. 1B): forma flagelada no proliferativa que se encuentra circulando en la sangre del hospedero mamífero y permanece ahí por muy poco tiempo ya que tiene la capacidad de invadir e infectar otras células. El núcleo se localiza en el centro y separado de éste se haya el cinetoplasto de gran tamaño localizado ahora en la parte posterior de la célula. En este estadio el flagelo es tan grande que se encuentra formando una membrana ondulante a lo largo de todo su cuerpo.

c) amastigote (Fig. 1C): también conocidos como esferomastigotes, carecen de flagelo libre y por consecuencia no tiene movimiento propio. Esta forma es capaz de replicarse por fisión binaria dentro de las células del hospedero mamífero. Su núcleo es muy grande y se localiza en el centro de su cuerpo alargado y en forma ovalada mientras que el cinetoplasto se haya justo a un lado de este.

d) tripomastigote metacíclico: Es la forma infectiva flagelada que se encuentra en el vector; una vez que se depositan junto con sus heces tienen la capacidad de penetrar en las células del hospedero e infectarlas. Cuentan con un cuerpo alargado que llega a medir entre 20-25 micras de longitud, el flagelo se localiza a lo largo de todo su cuerpo formando una enorme membrana ondulante además de tener un gran núcleo central y el cinetoplasto localizado posterior a este.



**A. Epimastigote**

**B. Tripomastigote**

**C. Amastigote**

**Fig 1. Estadios de desarrollo de *Trypanosoma cruzi*.** La identificación de los estadios de desarrollo depende de la forma así como de la ubicación del cinetoplasto. Parásitos teñidos con Giemsa (tinción de núcleos y cinetoplasto). Modificado de De Souza, 2002.

## 1.2 Ciclo de vida del parásito.

*T. cruzi* tiene un ciclo de vida característico que involucra a vertebrados mamíferos e invertebrados (Fig. 2). Los estadios b y c descritos anteriormente se encuentran en los hospederos mamíferos y los estados a y d en el insecto vector ((Tay-Zavala *et al.*, 2002 y Guzman-Marín *et al.*,1999).

El ciclo de vida del parásito comienza cuando una chinche hematófaga portadora de *T. cruzi* se alimenta succionando la sangre de un mamífero mientras este duerme o ignora su presencia. Al saciarse, defeca junto con sus heces al parásito en su forma infectiva de tripomastigote metacíclico. Esta forma del parásito entra al mamífero cuando se produce una lesión en la superficie de la piel al momento de rascarse o por contacto con mucosas. Una vez dentro del organismo, los tripomastigotes metacíclicos invaden células epiteliales, endoteliales o musculares (Moran-Utrera *et al.*,2010), a las que son capaces de llegar ayudados por su único flagelo.



Fig. 2 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

**ETAPAS EN EL HUMANO.** El ciclo se inicia cuando un insecto hematófago se alimenta de la sangre de un mamífero y defeca en su piel. Los tripomastigotes entran al organismo a través de la herida que se produce al rascarse o por las mucosas e infectan las células. Dentro de las células del mamífero se transforman en amastigotes y proliferan activamente formando nidos de amastigotes los cuales posteriormente pasan a ser tripomastigotes. Después de un tiempo, la célula se rompe liberándose al torrente sanguíneo los tripomastigotes sanguíneos e infectando células nuevas de otros órganos o ser ingeridos por un nuevo insecto.

**ETAPAS EN EL INSECTO.** Cuando una chinche que no tiene a *T. cruzi* se alimenta de la sangre del mamífero infectado, algunos tripomastigotes pasan a él a través de la sangre y en el intestino del insecto se transforman en epimastigotes, los cuales se multiplican activamente. Al transitar por el recto, se transforman en tripomastigotes metacíclicos. Después de una alimentación los parásitos se depositan junto con las heces para iniciar el ciclo.  
Tomado de [www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm)

Dentro de la célula, los tripomastigotes se diferencian en amastigotes los cuales se reproducen por fisión binaria formando nidos de amastigotes intracelulares. Al cabo de un promedio de cinco días se transforman en tripomastigotes y promueven el estallamiento de la célula con lo cual se liberan los parásitos e infectan otras células aledañas. Aquellos que logran llegar al torrente sanguíneo se les denomina tripomastigotes sanguíneos por lo que pueden infectar células de otros órganos distantes como corazón, colón y esófago, o durante su viaje pueden ser ingeridos por otra chinche al ser succionados durante su alimentación.

Una vez en el intestino medio del insecto, los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes y se multiplican por fisión binaria. Posteriormente, continúan su tránsito hasta el recto, donde se adhieren a la pared celular de este a través de su flagelo, propiciando su transformación a tripomastigotes metacíclicos. Estos últimos se despegan de la pared y son eliminados en las heces y la orina de la chinche, para comenzar nuevamente con el ciclo (Tay-Zavala *et al.*, 2002 y Guzman-Marín *et al.*, 1999).

### **1.3 Característica del insecto transmisor y los hospederos mamíferos.**

En 1909 en Lassance, Brasil, el médico Carlos Justiniano Ribeiro Chagas (1879-1934) describió la presencia de casas infestadas con un insecto hematófago conocido como “barbeiro” (por su preferencia de picar en la cara), el cual posteriormente descubrió ser el portador y transmisor del parásito *T. cruzi* causante de la tripanosomiasis americana, es por ello que a esta patología también se le denomina Enfermedad de Chagas. En México al insecto transmisor de la enfermedad se le conoce como “chinche besucona” (por su aparato bucal alargado) mientras que en otros países de América Latina se le conoce como vinchuca, pito o chinche compostela por la forma de uva que adquiere al ingerir la sangre.

Estos insectos transmisores se clasifican dentro de la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae* y son considerados como el único vector natural de *T.cruzi* (Barret et al., 2003; Becerril y Romero, 2004). México es el país latinoamericano que cuenta con la mayor variedad de triatóminos, con siete géneros principales: *Triatoma*, *Paratriatoma*, *Rhodnius*, *Panstrongylus*, *Eratyrus*, *Dipetalogaster* y *Belminus*. De las 123 especies de la familia *Triatominae* que se han descrito en el mundo, aproximadamente 30-40 se encuentran en México y de estas más de la mitad pertenecen al género *Triatoma* consideradas como las principales portadoras de *T.cruzi* (Mandell, 2002; Dumonteil, 1999) destacando *Triatoma dimidiata*, *Triatoma barberi* y *Triatoma infestans* como las especies transmisoras más importantes del país, debido a que suelen habitar dentro de las viviendas humanas o cerca de estas ([www.unibio.unam.mx/chagmex](http://www.unibio.unam.mx/chagmex)).

Se consideran como principales hospederos de *T.cruzi* algunos mamíferos en los que se incluye el ser humano, animales domésticos como el perro, el gato, los roedores y los animales de la granja y animales silvestres como el mapache, el armadillo y los monos por mencionar algunos los cuales son infectados con *T.cruzi* debido a que los triatomas se alimenta de la sangre de estos. Varios de los hospederos no humanos no solamente sirven de reservorio y alimento para las chinches sino que pueden ser un medio de transporte para que la chinche y el parásito lleguen hasta los hogares e infecten al hombre.

#### **1.4 Vías de transmisión del parásito.**

Las vías de entrada de *T. cruzi* pueden ser varias: la directa ocasionada por la mordedura de la chinche (Becerril y Romero, 2004) así como la penetración por la conjuntiva de los ojos y las mucosas de la boca; las transfusiones sanguíneas, el transplante de órganos y la vía congénita (Teixeira, 2006). La principal vía de transmisión del parásito es la del insecto, seguida por el uso de hemoderivados humanos ya que *T. cruzi*, es capaz de sobrevivir en sangre total mantenida a 4°C por períodos prolongados de hasta 18 días o por

250 días a temperatura ambiente almacenada en presencia de citrato (Rosa *et al.*, 2001). Cuando la vía de transmisión es congénita (de la madre al hijo) el parásito puede infectar al feto durante el embarazo y/o el parto. También se reportan casos de inoculación accidental en el laboratorio y hospitales. La vía oral es muy común en el ciclo silvestre, ya que algunos marsupiales y mamíferos suelen alimentarse de chinches, mientras que algunos gatos o perros, además de comer a los triatóminos, pueden comer roedores infectados con estos (Organización Mundial de la Salud WHO, 2002).

### **1.5 Epidemiología de la enfermedad de Chagas.**

A más de 100 años de su descripción formal por Carlos Chagas, en América Latina la tripanosomiasis americana ocupa el primer lugar en prevalencia (Imbert, 2005), y el sexto en mortalidad entre las enfermedades tropicales (Hotez *et al.*, 2006 y Martins-Melo *et al.*, 2012) así como el tercero entre las enfermedades transmisibles después del SIDA y la tuberculosis (Sierra-Johnson *et al.*, 2005). Un reporte del 2007 de la Organización Mundial de la Salud (OMS-WHO, 2007) estima que 12,500 personas mueren anualmente por causa de esta enfermedad en 21 países endémicos que van desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina y Chile. En esta región el número de personas afectadas por esta parasitosis es de 18 millones de personas mientras que aproximadamente otros 28 millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir la enfermedad (Prata, 2001;WHO, 2007). Aunque la enfermedad de Chagas es considerada como una patología endémica de América Latina ya se han detectado casos clínicos de la enfermedad en otros continentes como en Europa y Australia debido a los fenómenos de migración de personas de países latinoamericanos que buscan mejores condiciones de vida (Coura,2010).

La enfermedad de Chagas afecta principalmente a personas de escasos recursos que habitan viviendas rurales. La mayoría de las personas infectadas adquieren al parásito al ser mordidos por una chinche dentro de su hogar (Coura y Junqueira, 2012), ya que a estos insectos les gusta esconderse en lugares

oscuros como lo son los techos de paja, láminas de cartón, asbesto, zinc, tejamanil o madera, así como en grietas o fisuras de paredes de casas hechas con adobe y pisos de tierra. El lugar y el clima en que se desarrolla la chinche es variado ya que podemos encontrarlas tanto en zonas con vegetación abundante, hasta en selvas secas, húmedas y manglares y climas que van desde húmedos, cálidos, hasta muy áridos, por lo que esto influye para que la enfermedad tenga una gran distribución territorial.

## **1.6 Enfermedad de Chagas.**

### **1.6.1 Etapas y sintomatología de la enfermedad**

La enfermedad se puede dividir en tres fases: la aguda, la de latencia y la crónica. La **fase aguda** se inicia una vez que *T. cruzi* infecta las células del hospedero y comienza a multiplicarse en ellas, lo cual ocurre de 5 a 10 días después de que la persona fue inoculada con el parásito. En esta etapa, los malestares pueden confundirse con los de un resfriado gripal ya que puede haber fiebre, sudoración, falta de apetito y malestar general (Dumonteil, 1999; Teixeira *et al.*, 2006). Existen dos signos que pueden ser característicos de esta etapa, el primero conocido como signo de Romaña en el que se presenta edema en el párpado del ojo o la comisura de los labios, y viene acompañado de comezón y enrojecimiento del área; el segundo se conoce como chagoma, cuando la inoculación se ha dado en cualquier otra parte del cuerpo. Este último es más difícil identificarlo, ya que puede confundirse con la picadura o mordedura de cualquier otro insecto piógeno y a diferencia del síndrome de Romaña suele ser indoloro. El chagoma de inoculación desaparece a los 30 o 60 días después de la infección pero el parásito continúa en la sangre. La identificación de la enfermedad en la fase aguda se centra en la búsqueda del parásito en la sangre o mediante pruebas serológicas (Prata, 1995).

La **fase de latencia** generalmente ocurre sin que se presenten síntomas evidentes y puede durar entre 10 y 30 años (Maya, 2010). Existen reportes de personas en las que se encontró la presencia del parásito cuando se les hacen exámenes clínicos para otras sintomatologías. Por lo tanto, las personas pueden permanecer infectadas por el resto de su vida y representar un alto índice de peligro de transmisión de la enfermedad por transfusión sanguínea o donación de órganos.

La **fase crónica** se presenta cuando la enfermedad tiene sintomatología evidente que puede afectar principalmente al sistema nervioso, al sistema digestivo (colon y esófago) y al corazón. Se le conoce como fase “mega”, ya que se presenta agrandamiento de estos órganos (Maya, 2010). Se reporta que después de pasar varios años en un estado asintomático, 20 a 30% de los infectados desarrollan daños cardíacos, 10% presentan daños digestivos y un 5% presentan trastornos del sistema nervioso periférico. La mayoría de las defunciones causadas por la enfermedad se deben a miocardiopatías (Gascon *et al.*, 2007).

Se han propuesto diversas teorías para explicar la causa del proceso inflamatorio tan severo que ocasiona *T. cruzi* en los órganos que infecta. La teoría de la persistencia del parásito (teoría del daño directo), postula que la inflamación podría ser una consecuencia directa de la destrucción de la célula huésped al ser invadida por los parásitos (Becerril y Romero, 2004). La teoría autoinmune atribuye las lesiones chagásicas a la producción de autoanticuerpos reactivos dirigidos contra estos tejidos (Rodríguez Coura y de Castro, 2002) y la teoría neurogénica asume que el daño causado por el parásito se observa principalmente en las células que controlan los actos involuntarios como la digestión, la relajación, la contracción, etc. las cuales al parecer dejan de realizar dichas funciones en los órganos afectados ocasionando el proceso inflamatorio (Teixeira, *et al.*, 2006; Maya *et al.*, 2010).

## 1.6.2 Tratamiento de la enfermedad

Desde su descripción formal en 1910 hasta nuestros días, los nitrofuranos y los nitroimidazoles son los fármacos por elección destinados al tratamiento de la enfermedad de Chagas. Existen únicamente dos drogas nitro-heterocíclicas, consideradas como antichagásicas conocidas comercialmente como nifurtimox (NFX) y benznidazol (BNZ) (Fig. 3) (Rodrigues Coura y de Castro, 2002).

El NFX ([N-(3 metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinn-4-il)-1-(5-nitro-2-furil)]) comercializado por los laboratorios Bayer como Lampit® es un compuesto lipofílico, ingerible y eficaz para erradicar tripomastigotes circulantes y amastigotes en la etapa aguda de la infección con *T. cruzi*. La acción tripanocida del NFX se debe a un proceso de nitroreducción intracelular seguida de un ciclo redox monoelectrónico para regenerar el compuesto, lo que conlleva a la

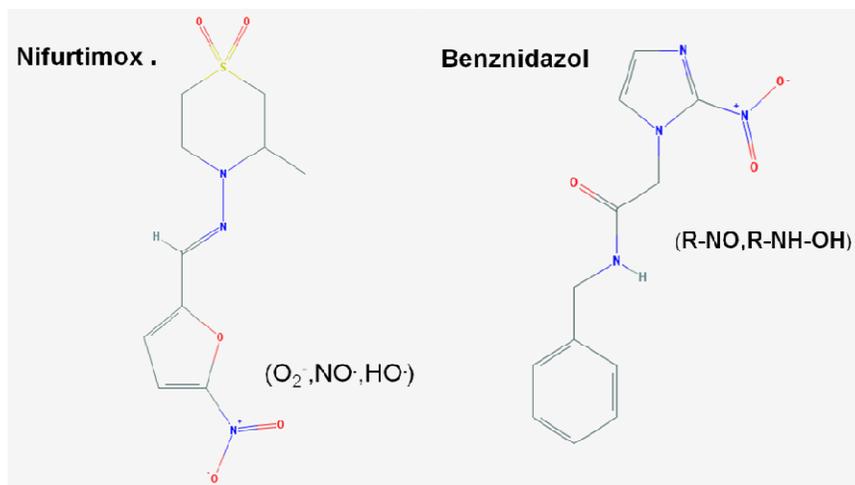


Figura 3. Estructura química de los fármacos antichagásicos. En las estructuras se puede observar el grupo nitro, el cual se reduce por la acción de nitroreductasas y produce radicales libres y compuestos electrofílicos (indicados en paréntesis) que dañan la estructura del DNA, proteínas y lípidos. Tomados de <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) como el superóxido ( $O_2\cdot^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ). Estas EROs pueden formar especies reactivas intermedias que pueden unirse a varias macromoléculas como el DNA, lípidos y proteínas (Maya *et al.*, 2007). El

tratamiento con el fármaco es por un periodo de 60 días en dosis de 8 mg/kg/día para adultos y de 10 mg/Kg/día para niños (Coura, 2009). La frecuencia del empleo del tratamiento con NFX es baja debido a que el fabricante ha dejado de producir comercialmente el compuesto y solamente lo sintetiza por causas humanitarias.

El BNZ ([N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida]) comercializado por los laboratorios Roche como Rochagan® o Radanil® es un 5'-nitroimidazol que se dio a conocer en la década de los 70s. A diferencia del NFX no estimula la generación de radicales libres de oxígeno sino que su activación intracelular lleva a la formación de metabolitos electrofílicos (R-NO, R-NH-OH) que pueden unirse a macromoléculas, dando como resultado daño directo al DNA, lípidos y proteínas (Maya *et al.*, 2007). Este fármaco se prescribe durante 60 días en dosis de 5 mg/Kg/día en adultos (Coura, 2009) y 5 a 10 mg/Kg/día en niños de hasta 40 Kg. En los lactantes la dosis recomendada es de 10 mg/Kg/día. Así como ocurre con el NFX, el BNZ lo sintetizan en pocas cantidades y solamente por causas humanitarias a través de peticiones tramitadas por la OMS.

El tratamiento con estos fármacos tiene efectos colaterales adversos muy severos que incluyen anorexia, pérdida de peso, náuseas, vómitos, excitación nerviosa, insomnio, depresión, vértigo, dolor de cabeza, somnolencia, pérdida del equilibrio, desorientación, falta de memoria, fenómenos acústicos, daños al sistema nervioso central y periférico, edema, intolerancia hepática, entre otros (Castro y Díaz, 1988). Además, debido a que el tratamiento es largo, muchos pacientes suelen abandonarlo. Aunado a esto, los fármacos son poco eficientes durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Es por estas razones que el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos se ha convertido en una problemática de carácter urgente para la comunidad científica (Barrett *et al.*, 2003).

Se han buscado sitios de intervención terapéutica en varias vías metabólicas de este parásito tales como la glicólisis, la vía de salvamento de purinas y pirimidinas, el transporte de nucleósidos, la biosíntesis de esterol, y la

síntesis y degradación de proteínas, entre otras dentro de las cuales también se encuentra el metabolismo antioxidante del parásito en el que se hayan enzimas importantes que sintetizan, utilizan o reciclan tripanotión consideradas también como potenciales blancos terapéuticos (Olin-Sandoval *et al.*, 2010).

### **1.7. Metabolismo antioxidante en *Trypanosoma cruzi*.**

Todos los organismos vivos se encuentran día a día expuestos a EROs y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) tales como el óxido nítrico (NO•) y el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (Hansberg, 2002). Las EROs y ERNs ocasionan daño a las membranas celulares, al DNA, a las proteínas y lípidos causando la muerte celular o apoptosis.

Para contender ambos tipos de especies reactivas, las células de los mamíferos poseen mecanismos de defensa enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de los enzimáticos podemos encontrar a la catalasa (Cat), las superóxidos dismutasas (SODs), el sistema glutatión/glutatión reductasa (GSH/GR), el sistema tioredoxina reductasa /tioredoxina (TrxR/Trx) así como la glutatión peroxidasa (GPX). Dentro de los no enzimáticos se encuentran compuestos reductores como el GSH, el  $\alpha$ -tocoferol, el ácido ascórbico y los  $\beta$ -carotenos. En la mayoría de los organismos el GSH es el tiol no proteico más abundante dentro de las células (1-10 mM) y cumple con varias funciones en la célula viva, por ejemplo está involucrado en el manejo del estrés oxidante, en la desintoxicación de xenobióticos y en el caso de plantas y algunas levaduras participa en la inactivación de metales pesados tóxicos ( Hansberg, 2002).

*T. cruzi* cuenta con mecanismos de defensa enzimáticos y no enzimáticos ante el estrés el cual depende del tripanotión [T(SH)<sub>2</sub>] (Fig. 4) ( Krauth, 2008; Olin-Sandoval *et al.*, 2010).

El T(SH)<sub>2</sub> es un conjugado de dos moléculas de GSH y una molécula de espermidina (Spd) el cual es característico de los tripanosomátidos y que junto con la enzima tripanotión reductasa (TryR) constituye el mejor mecanismo de defensa protector de *T.cruzi* ya que los tripanosomátidos no tienen glutatión reductasa. El T(SH)<sub>2</sub> posee ciertas propiedades químicas que son mejores que el GSH. El potencial redox del par T(SH)<sub>2</sub>/TS<sub>2</sub> es -0.242 V el cual es ligeramente más electronegativo que el par GSH/GSSG (-0.25 V) lo que le confiere un poder reductor mayor; además, la oxidación intramolecular de los dos grupos tioles presentes en el T(SH)<sub>2</sub> se ve más favorecida que la oxidación intermolecular de 2 moléculas de GSH. La presencia de una carga positiva en el metabolito debido a la Spd hace que el valor de pKa del T(SH)<sub>2</sub> sea de 7.4 que coincide con el pH fisiológico de la célula a diferencia del pKa que tiene el grupo tiol del GSH que es de 8.66.

El metabolismo del tripanotión se encuentra constituido por dos bloques: el de su síntesis y el de su consumo y regeneración (Fig. 4). El primero, involucra la formación de sus dos precursores el GSH y la Spd y la síntesis directa del metabolito y el segundo involucra el flujo de electrones desde el NADPH proveniente de la rama oxidativa de la vía de las Pentosas Fosfato hasta la reducción de los hidroperóxidos.

El GSH se sintetiza a partir de cisteína (Cys) y glutamato (Glu), por acción de la gama-glutamil cisteína sintetasa ( $\gamma$ -ECS), la cual forma gama-glutamilcisteína ( $\gamma$ -EC). A esta molécula, la glutatión sintetasa (GS) le adiciona una glicina (Gly) para formar el GSH. Por otro lado, la Spd necesaria para la síntesis de T(SH)<sub>2</sub>, puede transportarse del medio extracelular a través de un transportador de Spd de alta afinidad o bien se puede sintetizar por la acción de la espermidina sintasa (SpdS) a partir de putrescina (Put) y S-adenosilmetionina descarboxilada (S-adenosil-5-3-metilpropilamina; dAdomet)l. La Put se transporta del medio extracelular mientras que la dAdomet se obtiene a partir de S-adenosilmetionina (AdoMet) a través de una reacción de descarboxilación catalizada por la S-adenosilmetionina descarboxilasa (AdoMetDC) (Fig. 4). La

unión de 2 moléculas de GSH y una de Spd catalizada por la tripanotión sintetasa (TryS) conlleva a la síntesis de T(SH)<sub>2</sub>.

El T(SH)<sub>2</sub> se utiliza para reducir EROs y ERNs ya sea directamente o a través de un sistema antioxidante enzimático dependiente únicamente del T(SH)<sub>2</sub>. En este sistema, el metabolito cede sus electrones a la triparedoxina (TXN) y ésta a su vez a una triparedoxina peroxidasa y a una glutatión peroxidasa no dependiente de selenio las cuales utilizan estos equivalentes reductores para reducir los hidroperóxidos. Cabe mencionar que la catalasa, la tioredoxina reductasa, la glutatión reductasa y algunas glutatión peroxidases dependientes de selenio, las cuales conforman el sistema antioxidante de células de humano, no están presentes en el metabolismo de *T. cruzi*. El tripanotión oxidado (TS<sub>2</sub>) es reducido por la TryR obteniendo los electrones a partir del NADPH.

A continuación se describe en detalle el metabolismo de las poliaminas en donde se ubican las enzimas que se estudian en esta tesis (figura 4).

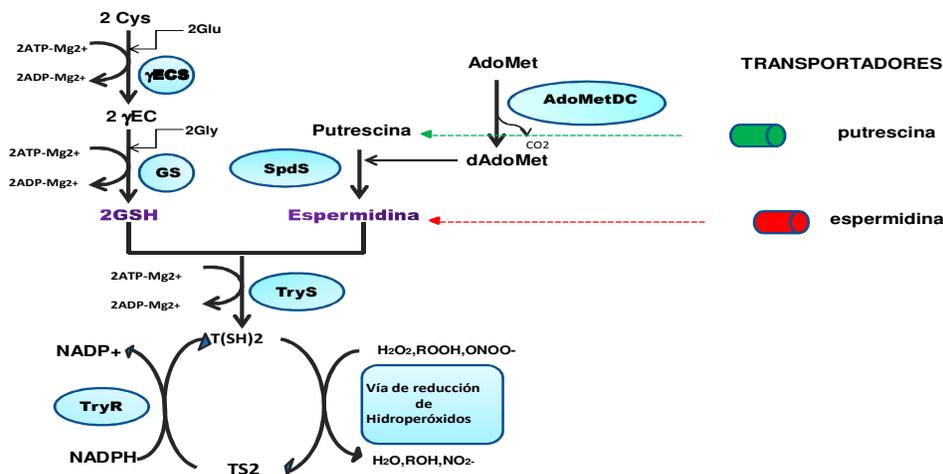


Figura 4. Metabolismo del T(SH)<sub>2</sub> de *Trypanosoma cruzi*. En la parte superior podemos observar las vías de síntesis de GSH a partir de Cys, Glu y Gly y la vía de síntesis de Spd por acción de las enzimas AdoMetDC y SpdS; así como los transportadores de Put,y Spd . En la parte inferior se puede ver la participación de un conjunto de enzimas antioxidantes que se encargan de reducir a los hidroperóxidos a su forma inocua. Del lado izquierdo la TryR regenera al T(SH)<sub>2</sub>.

## 1.8 Metabolismo de las poliaminas.

### 1.8.1 Características de las poliaminas

Las poliaminas son compuestos alifáticos que tienen grupos amino en su estructura lo que hace que en condiciones fisiológicas de pH se encuentren cargadas positivamente. Las poliaminas más abundantes en los organismos superiores son la Put, Spd y espermina (Spm) (Figura 5), las cuales poseen 2, 3 y 4 grupos amino respectivamente (Janne *et al.*,1991).

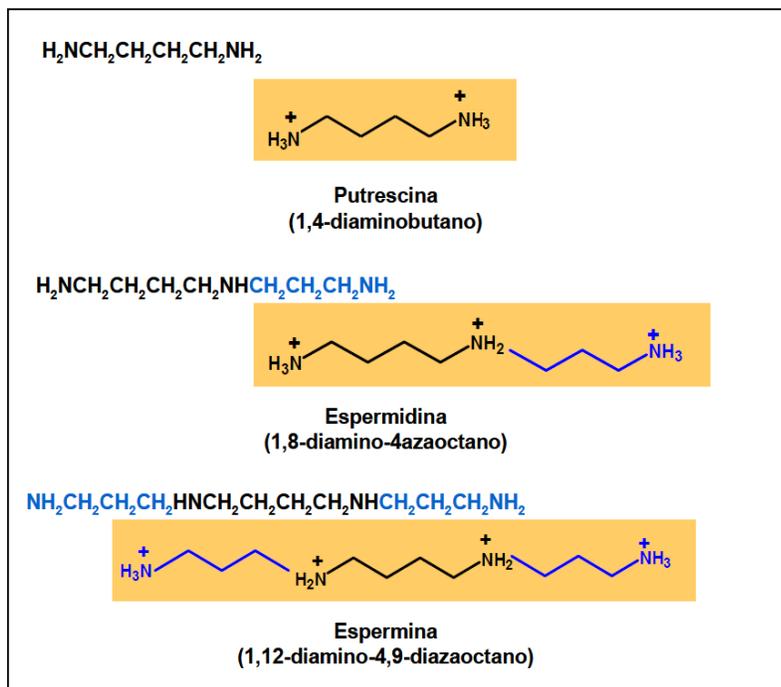


Figura 5. Estructura química de las poliaminas Put, Spd y Spm. La poliamina principal es la Put, a la cual se le agrega un grupo propilamino para formar la Spd o dos grupos propilamino (uno de cada lado) para formar la espermina. El número de cargas positivas es proporcional al número de grupos amino presente en su estructura. López,2008.

La Put (1,4-diaminobutano) es la amina más pequeña de las tres y normalmente suele ser la precursora de la Spd (1,8-diamino-4-azaoctano) y Spm (1,12-diamino-4,9-diazaoctano). También se han encontrado otras poliaminas en menor cantidad como el diaminopropano, la cadaverina o la agmatina tanto en células procariotas como en eucariotas (Andey *et al.*,2000).

Las cargas positivas de las poliaminas les permiten interactuar de manera electrostática con diversos componentes celulares cargados negativamente como el DNA, el RNA, las proteínas, los fosfolípidos, partículas ribosomales y membranas (Tabor y Tabor, 1984 ; Persson, 1990; Kusano, 2008), por lo que se estima que la proporción de poliaminas en forma libre (no unidas a ningún componente celular) en las células y los tejidos es menor al 10% (Watanabe, 1991).

En general los tejidos con poco crecimiento poseen niveles bajos de poliaminas mientras que aquellos con gran potencial proliferativo poseen una mayor concentración de poliaminas. Además de la función que ejercen las poliaminas sobre la tasa de crecimiento celular, diversos experimentos han demostrado que estas moléculas también están implicadas en diversos procesos celulares (Kusano, 2008) tales como:

1. Regulación y expresión de genes
2. Regulación de la Transcripción y Traducción
3. Modulación de actividades enzimáticas
4. Estabilización de la proliferación celular
5. Modulación celular y de membrana
6. Modulación de la actividad de ciertos canales de iones
7. Respuesta al estrés y apoptosis

### **1.9. Características cinéticas de las enzimas involucradas en la síntesis de Spd.**

La Put se sintetiza por la acción de la ornitina descarboxilasa (ODC) que cataliza la descarboxilación de la ornitina, un aminoácido celular. Aunque la ODC está presente en otros tripanosomátidos como *T. brucei* y *Leishmania*, esta enzima no está presente en *T. cruzi*. Debido a lo anterior este parásito ha desarrollado transportadores de Put de alta afinidad por lo que el suministro de la Put para la síntesis de Spd necesaria para sintetizar el T(SH)<sub>2</sub> proviene del medio extracelular. Por ello a continuación solamente se va a dar información

acerca de la AdoMetDC que sintetiza la dAdomet el otro precursor aparte de Put para la síntesis de la Spd catalizada por la SpdS.

### 1.9.1. Características cinéticas y estructurales de la AdoMetDC.

La AdoMetDC es una enzima esencial en la biosíntesis de las poliaminas que cataliza la conversión de la Adomet a dAdoMet y liberando al S-metil-5-tioadenosilo. La dAdoMet es el metabolito que dona los grupos propilamino a la Put para la síntesis de Spd (catalizada por la SpdS) mientras que el S-metil-5-tioadenosilo es el precursor para regenerar a la metionina (Met) (Fig. 6).

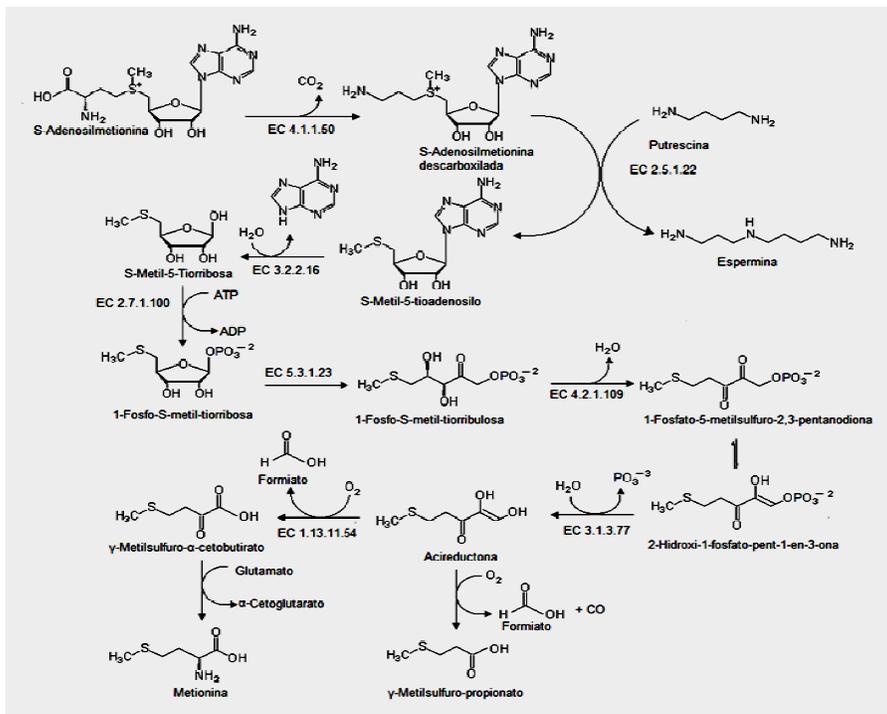


Figura 6. Vía de síntesis de dAdoMet y regeneración de Met.

La AdoMetDC (EC 4.1.1.50) cataliza la reacción de descarboxilación del AdoMet. La dAdoMet es el donador de grupos propilamino a la Put para formar la Spd por la acción de la SpdS (E.C. 2.5.1.22) en la cual también se genera el S-metil-5-tioadenosilo. Este último es el precursor para la síntesis de Met a partir de una serie de reacciones catalizadas por las enzimas: metiltioadenosina nucleosidasa (EC 3.2.2.16); S-metil-5-tiorribosa quinasa (EC 2.7.1.100), S-metil-5-tiorribosa-1-fosfato isomerasa (EC 5.3.1.23); metiltiorribulosa 1-fosfato deshidratasa (E.C. 4.2.1.109); acirreductona sintasa (EC 3.1.3.77); acirreductona dioxigenasa dependiente de hierro (II) (EC 1.13.11.54). Tomado de [http://gl.wikipedia.org/wiki/ficheiro:Ruta\\_de\\_salvamento\\_de\\_la\\_metionina](http://gl.wikipedia.org/wiki/ficheiro:Ruta_de_salvamento_de_la_metionina)

La AdoMetDC de células de mamífero se expresa como una proenzima inactiva que requiere un mecanismo de autoprocesamiento para su activación el cual consiste en una reacción de serinólisis (Figura 7). La serina 68 ataca al carbono carbonilo del glutamato 67 para generar un intermediario oxioxazolidina (un anillo de 5 miembros), el cual se re-arregla para formar un éster intermediario. Posteriormente la His 243 sustrae un protón del carbono de la serina 68 dando como resultado la ruptura del éster intermediario y por lo tanto de la cadena polipeptídica. De esta manera se generan dos subunidades, una subunidad pequeña denominada  $\beta$  de 9 a 10 KDa aproximadamente, en la cual queda contenida el extremo amino terminal de la cadena de origen y una subunidad más grande denominada  $\alpha$  de un tamaño aproximado de 32 a 33 KDa que contiene el extremo carboxilo terminal. Debido a la ruptura del enlace peptídico de la cadena peptídica original, en el extremo amino de la cadena  $\alpha$  queda expuesta una dehidroalanina, la cual se tautomeriza para formar una imina intermediaria, que finalmente se hidroliza para dar como resultado un grupo piruvoil, el cual constituye la parte más importante de la enzima, ya que es el residuo donde se une el sustrato AdoMet (Shridhar y Steven, 2010).

Generalmente, la mayoría de las reacciones enzimáticas de descarboxilación dependen del piridoxal-5'-fosfato o pirofosfato de tiamina el cual actúa como cofactor durante la catálisis; sin embargo la AdoMetDC pertenece a un pequeño grupo de enzimas dentro del cual se encuentran la aspartato descarboxilasa, la histidina descarboxilasa y la arginina descarboxilasa que dependen de un grupo piruvoil como cofactor para que se produzca el proceso de descarboxilación. La AdoMetDC también se encarga de metilar al DNA (Shridhar y Steven 2010).

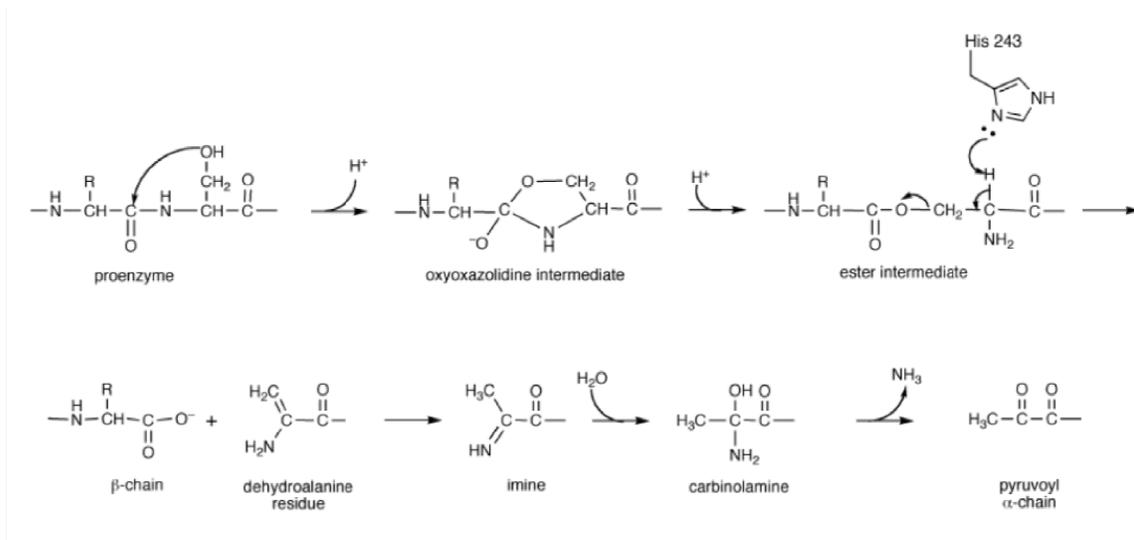


Figura 7. Mecanismo de autoprocésamiento de la AdoMetDC humana. La reacción de serinólisis se lleva a cabo entre los residuos Ser68 y Glu 67, dando como resultado dos subunidades y la formación del grupo piruvoyl en la subunidad a. Probablemente este mecanismo sea similar para los tripanosomátidos. Tomado de Shridhar and Steven, 2010.

En los tripanosomátidos la AdoMetDC tiene un peso molecular mayor (42-44 kDa) comparado con la de los mamíferos (38 kDa). De acuerdo a algunas comparaciones hechas entre las AdoMetDCs de humano y papa, con las enzimas de las bacterias *Thermotoga marítima* y *Aquifex aeolicus*, se ha propuesto que las enzimas eucariotas evolucionaron por duplicación y fusión de genes (Willert *et al.*; 2007 y Shridhar y Steven, 2010). Es importante mencionar que los residuos implicados en el procesamiento y actividad de la enzima se conservan en la escala filogenética, por lo que se sugiere que la enzima de *T. cruzi* se expresa como la proenzima inactiva y por lo tanto que lleva a cabo el mismo mecanismo de autoprocésamiento para dar lugar a la enzima activa (Willert *et al.*; 2007).

Por otro lado, además de la regulación por proteólisis limitada, se ha propuesto que tanto la expresión génica como la actividad enzimática de la AdoMetDC se relaciona con la concentración de poliaminas (Heby *et al.*, 2007). En *T. brucei*, *T. cruzi*, *Caenorhabditis elegans* y en humanos, las reacciones de autoprocésamiento y de descarboxilación de la AdoMetDC se regulan por la concentración de Put; sin embargo este efecto sobre la AdoMetDC se considera

especie-específica (Shridhar y Steven, 2010). Por ejemplo, en extractos celulares de *T.brucei* la enzima se activa al 50% de su velocidad máxima con 10 mM de putrescina mientras que la proteína recombinante se activa con 20 mM de putrescina (Kinch *et al.*; 1999). En *Neurospora crassa*, la Put es un activador esencial, pero no hay ningún efecto sobre la reacción de procesamiento (Shridhar y Steven, 2010).

Además del autoprosesamiento y de la activación por poliaminas, en los tripanosomátidos se ha descrito la presencia de una proenzima que es capaz de incrementar la actividad de la AdoMetDC. La proenzima tiene solamente un 30% de identidad comparada con la secuencia de aminoácidos de la AdoMetDC y se propone que surgió como resultado de una duplicación de genes de la AdoMetDC ancestral. La proenzima forma un complejo con la enzima incrementando su catálisis. Por ejemplo, en *T.brucei* puede llegar a estimular su eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) de 35 a  $1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Willert *et al.*, 2007). Tanto el gen de la enzima como el de la proenzima se expresan simultáneamente en *T. brucei* (Willert *et al.*, 2007).

Distintos grupos de investigación (Kinch *et al.*, 1999 ; Willert *et al.*, 2007 y Persson *et al.*, 1998), reportaron la caracterización de la AdoMetDC de *T. cruzi* en condiciones cercanas no fisiológicas (pH 8.0/37°C y pH 7.4/25°C muy probablemente obteniendo los siguientes parámetros (Tabla1).

**Tabla 1. Característica cinéticas reportadas de la AdoMetDC recombinantes en Trypanosomátidos**

Referencia	Kinch et al.,1999 <i>T.cruzi</i>	Persson et al.,1998 <i>T.cruzi</i>	Willert et al., 2007 <i>T.brucei</i>	Nasizadeh S,2003 <i>Crithidia fasciculata</i>
<b>Condiciones experimentales</b>	pH 8.0/ 37°C + 20 mM de Put	pH 7.4./ 25°C Purificada en presencia de AdoMet y 2.5 mM de Put	pH 8.0/ 37°C	pH 7.5 /28°C
<b>V<sub>m</sub></b>	45	1.5		
<b>k<sub>cat</sub></b>	0.063 ± 0.014		1.4 (+proenzima - Put) 1.7 (+ proenzima + 5 mM Put) 0.0082 (+ 5 mM Put) 0.0013 (- Put)	
<b>K<sub>m</sub><sup>AdoMet</sup></b>	0.11 ± 0.033	0.21 ± 0.04	0.11( +proenzima - Put) 0.17 (+proenzima + 5 mM Put) 0.24 (+5 mM Put) 0.38 ( -Put)	0.2
<b>V<sub>m</sub> en parásitos*</b>	0.044		4000 (4 μmol/min/mg)	

V<sub>m</sub> en nmol/min\*mg; K<sub>m</sub> en mM; k<sub>cat</sub> en s<sup>-1</sup>. \* recalculado por Olin-Sandoval et al, 2010.

## 1.9.2. Características cinéticas y estructurales de la SpdS

La SpdS es una proteína de 33 kDa que sintetiza Spd cuando une covalentemente un grupo propilamino proveniente de la dAdoMet a una molécula de Put. La estructura cristalográfica de la SpdS en humanos muestra una estructura dimérica de gran similitud con la estructura de la espermina sintasa y la proenzima de la AdoMetDC (figura 8), y está formada por dos subunidades idénticas estabilizadas por interacciones entre los dominios amino terminal (Korolev et al, 2002). De acuerdo al organismo estudiado cada monómero tiene tres dominios: i) el dominio COOH terminal contiene el sitio activo, ii) el dominio central está formado por seis hojas  $\beta$  y iii) el NH-terminal tiene una alta similitud a la estructura de la proenzima de la AdoMetDC (Fig. 8). Se reportan al menos dos residuos, Asp<sup>201</sup> y Asp<sup>276</sup>, que se conservan en casi todas las aminopropil transferasas y que parecen desempeñar un papel clave en el mecanismo catalítico de la protonación.

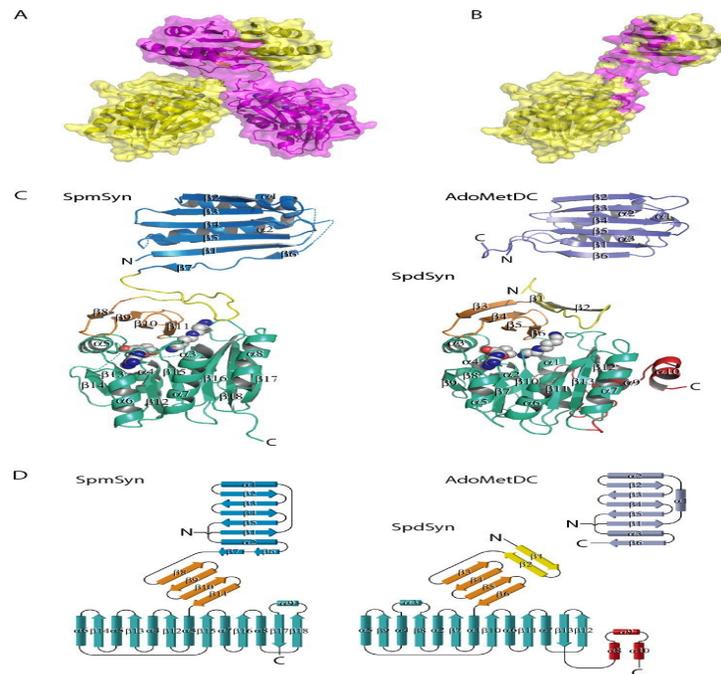


Figura 8. Similitudes entre la estructura de la SpdS y la proenzima de la AdoMetDC.

Tomado de Wu, 2008.

Únicamente se ha caracterizado la SpdS de *T. brucei* (Bitonti *et al.*, 1984; Taylor *et al.*, 2008) obteniendo los siguientes valores determinados a pH 7.5 y 7.2 y temperatura de 37°C para ambos casos (Tabla 2) .

**Tabla 2. Propiedades cinéticas de la SpdS de *T. brucei***

	<b>Bitonti <i>et al.</i>, 1984</b>	<b>Taylor <i>et al.</i>, 2008</b>
<b>K<sub>m</sub> Put</b>	200	205±65
<b>K<sub>m</sub> dAdoMet</b>	0.1	0.09 ±0.01
<b>Vmax</b>	0.6	11.9 ±1.4

*K<sub>m</sub>* en μM; *V<sub>m</sub>* en nmol/min\*mg

## 2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS.

En el laboratorio de investigación donde se realizó esta tesis se está interesado en construir modelos cinéticos matemáticos de vías metabólicas de parásitos protozoarios con el fin de validar blancos de intervención terapéutica (Saavedra *et al.*, 2007; Olin-Sandoval *et al.*, 2010). Recientemente el grupo reportó un modelo cinético del metabolismo antioxidante dependiente de T(SH)<sub>2</sub> en *T. cruzi* (Olin-Sandoval *et al.*, 2012). Para dicho modelo se consideraron dos bloques principales, el bloque productor de T(SH)<sub>2</sub> que comprende la vía de síntesis de GSH, el suministro de poliaminas (en la cual se consideró únicamente al transportador de Spd) y la síntesis de T(SH)<sub>2</sub> por la TryS; el otro bloque consistió del sistema antioxidante dependiente del metabolito y la reducción del tripanotión oxidado catalizado por la TryR (Olin-Sandoval *et al.*, 2012).

Para la construcción del modelo se determinaron los parámetros cinéticos de las enzimas recombinantes determinadas en condiciones cercanas a las fisiológicas (pH 7.4 37°C) así como las actividades de las enzimas y concentraciones de metabolitos y flujos metabólicos de la vía determinados en parásitos sometidos a condiciones control y estrés oxidante (inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Las predicciones del modelo indicaron que las enzimas que mayor controlan el metabolismo del T(SH)<sub>2</sub> en los parásitos son la  $\gamma$ ECS, la TryS y el transporte de Spd. Debido a que hasta el momento sólo se habían reportado datos cinéticos de la SpdS de *T. brucei* (Taylor *et al.*, 2008), en el modelo cinético no se pudieron incluir la vía de síntesis *de novo* de la Spd constituida por la AdoMetDC y la SpdS.

Evidencias indirectas indican que la síntesis de Spd a partir de Put y dAdoMet puede contribuir de manera importante a la síntesis de T(SH)<sub>2</sub> y no únicamente el transportador de Spd. En artículos publicados se reportó que epimastigotes de *T. cruzi* crecidos en medio de cultivo depletado de Put, las concentraciones de GSH y T(SH)<sub>2</sub> son de 2.1 mM y 0.04 mM respectivamente; sin embargo al cultivar los epimastigotes en el mismo medio pero suplementado

con Put (100  $\mu$ M), la concentración de GSH disminuyó a 0.7 mM mientras que la concentración de T(SH)<sub>2</sub> aumentó a 2.1 mM ((Ariyanayagam y Fairlamb; 2001; Ariyanayagam *et al.*, 2003). Estos datos sugieren que el GSH está siendo utilizado para la síntesis de T(SH)<sub>2</sub> a partir de la Put que se transportó del medio extracelular, mientras que la dAdomet se obtuvo por acción de la AdometDC a partir de Adomet.

Estos antecedentes indican que la síntesis *de novo* de Spd a partir de Put y dAdoMet puede contribuir de manera importante al suministro de la poliamina necesaria para sintetizar el T(SH)<sub>2</sub>. Por lo tanto, es necesario realizar una caracterización cinética de la SpdS y AdoMetDC en las mismas condiciones experimentales en las que se determinaron los parámetros cinéticos de las enzimas incluidas en el modelo cinético para realizar su actualización. El modelo nos ayudará a entender los mecanismos de control del metabolismo así como ayudar a validar a la SpdS y/o AdoMetDC como blancos de intervención terapéutica.

### **3. HIPOTÉISIS.**

Además de los transportadores de poliaminas, la vía de síntesis de *novo* de Spd en la que participan la AdoMetDC y la SpdS también contribuye a la síntesis de T(SH)<sub>2</sub> en el parásito *Trypanosoma cruzi*.

### **4. OBJETIVO GENERAL.**

Caracterizar cinéticamente a la AdoMetDC y a la SpdS recombinantes de *T. cruzi* en condiciones cercanas a las fisiológicas (pH 7.4/37 °C) y obtenidas de la misma cepa de estudio (Ninoa).

### **5. OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Clonar a los genes que codifican para la AdoMetDC y SpdS de *T. cruzi* de la cepa Ninoa.
- Sobre-expresar en bacterias y purificar a las enzimas recombinantes.
- Caracterizarlas cinéticamente en condiciones experimentales cercanas a las fisiológicas (pH 7.4/ 37 °C).

## 6. METODOLOGÍA.

El diseño experimental para la caracterización la AdoMetDC y la SpdS se divide en dos partes:

- 1) La clonación de los genes que codifican para ambas enzimas, la sobre-expresión y purificación de ambas enzimas recombinantes, y
- 2) la caracterización cinética de las mismas.

Un esquema general del flujo de trabajo se muestra en la Figura 9.



Figura 9. Estrategia experimental. El esquema muestra cada uno de los pasos a seguir para la caracterización cinética de AdoMetDC y SpdS.

## 6.1 Análisis del DNA y diseño de los cebadores

Se realizó una búsqueda de los genes que codifican para la AdoMetDC y la SpdS en la base de datos del Gen Bank. Las secuencias correspondientes al genoma de *T. cruzi* cepa CL Brener se muestran a continuación:

AdoMetDC (No. de acceso AF075243).

```
ATGTTAAGCAATAAGGACCCTCTCTCTTTGATGGCGATGTGGGGTTCAGTGAAGGGCTACGACCCAA
ATCAGGGGGCCAGTTTTGAGGGGCCGAAAAACGTTTGGAGGTGATCATGCGTATTATTGACGAGACCCACT
CGGAGGGCCTCCATGCCCTTGGAGATGAGGTATGGAAAGGTGTGGTGGGCTCGTTAAATGCCCAAATTGTAT
CCAAAGAGAGTAATGAGTATATTTCGCTCTTATGTGCTAACGGAAAGCTCATTGTTTGTTCATGCGGGACCGTA
TCATCCTGATCACATGTGGCAGCAGACTCTACTTAATGCCGTTCCCTTTCGTTTTGGACGCAGTTAGTGATG
TACGAGGGGAGGTGGAATGGGTCTCTTTCATGCATAAGAACTACAGTTTTCCGTGGGAACAGAAGGGACCAC
ATCTCTCCATGGCAGAGGAATCAACACTTTAAGAACGTACTTTCATCGGGAAAGCCTTTTATATTTGGTC
CTGTCGATAGTGATCATTACTTTCTATTTGTCTATGACGACGTTATTTCGTCCATGTGAGACGGAGAACGATA
CACAGTTGAGTATGACAATGTACGGGCTAGATCGTACGCAGACGAAGCATTGGTTCTCGGATCGTTTTATCT
CAACAGGCACGGAGACGGCCGCTATCCGCAAGGCGACAAAACCTGGACAAGGTGGCAGATGACTCATGGAAGT
TGCATGATTTGCAATTTGAGCCGTGTGGGTATAGTATAAATAACAATTCGTGGTGCAGAATACCAGACGATCC
ACATAACACCAGAAGATCACTGCTCTTTTGCCTCGTATGAAACGAATACACCCGCGGTCAATTATTCGGAGC
GGATAAACACCCGTGTTGGGAGTTTTTGTCTCCAATACGTTTTTCCGTGATTGTCTTCATTGATCCTGACAGTG
ATGTTGGAAGGCTGTACCAGAAGGGACAGAACGTTGGGGTTGAAGCGGAGTATTACCCGAAGTATGAACTGC
AGAATCGTACGGTCAATGAATTTGCCCCAGGCTACGTGGTGATGAAGATGAATTACGCAAGGAGGGCGGAAG
TAACTGAGAAAGACTCCACAGATTCTGTGGAAGAG
```

SpdS (No. de acceso XP\_811725).

```
ATGCCTGGTTCCGAACTAATTTCTGGCGGCTGGTTTTCGCGAGGAAAATGATCAGTGGCCCCGGGCAAG
CCATGTGCTGAGGGTGGAGAAGGTTCTGTACGACGCCCGACAAAAGTTCCAACACCTGACCATCTTTGAGA
GCGACCCAAAGGGCCCATGGGGCACTGTATGGCGCTCGACGGCTGCATTCAAGTCACGGACTACGACGAGT
TTGTGTACCACGAGGTGCTTGGCCACACCAGTCTCTGCTCCCATCCGAAGCCAGAGAGAGTGTCTCATCATTG
GTGGTGGGGACGGCGGCGTACTGCGGGAGGTGTTGCGGCACGGCACCCGTGGAGCACTGTGATCTCGTCGACA
TTGACGGCGAGGTGATGGAACAAAGCAAGCAACACTTTCACAGATCTCCCGCTCCCTAACGGATCCTCGAG
CGACGGTCCGTGTGGATGATGGCTTGGCGTTTTGTAAGACAGACCCCAGACAACACGTATGATGTGGTCATTA
TTGACACCACGGACCCTGCTGGGCCTGCATCGGAGCTCTTTGGGGAGGCGTTCTACAAGCACGTGCTGCGTA
TCCTGAAACCGGACGGCATAATGCTGCAATCAAGGAGAGTCCATCTGGCTGAATCTTGAGCTTATTGAGAAGA
TGTCTCGTTTTCATCAGGGAGACTGGTTTTGCGTCCGTGCAGTATGCATTAATGCACGTGCCACATATCCTT
GTGGTTCAATTGGAACACTTATTTGTTCTAAGAAGGCCGGCGTGGACGTGACGAAGCCACTGCGTCTGTG
AGGATATGCCGTTTGCAGAGGATTTGAAGTACTACGACTCGGAAATGCACAAGGCCCTCCTTTGCGCTGCCTC
GCTTTGCGCGGCACATTAACAACCTCAGAATAA
```

Se diseñaron los cebadores para utilizarlos en la reacción de PCR en sus direcciones sentido y antisentido empleando los primeros 20-25 nucleótidos de los extremos 5' y 3' de las secuencias. A cada uno de los oligonucleótidos, se

les adicionó la secuencia de un sitio de reconocimiento para enzimas de restricción para facilitar la clonación de los genes.

Las secuencias de oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes se muestran a continuación en donde se subrayan los sitios de restricción.

Oligonucleótido de sentido para TcAdoMetDC

5' -CGTACATATGTTAAGCAATAAGGACCC-3'

**NdeI**

Oligonucleótido de antisentido para TcAdoMetDC

5' -GCATAAGCTTCTACTCTTCCACAGAATC-3'

**HindIII**

Oligonucleótido de sentido para TcSpdS

5' CGTAGCTAGCCCTGGTTCCGAACTAATTTCTGG-3'

**NheI**

Oligonucleótido de antisentido para TcSpdS

5' -TAGCAAGCTTTTATTCTGAGTTGTTAATGTG-3'

**HindIII**

La casa comercial SIGMA sintetizó los oligonucleótidos y se recibieron en una presentación liofilizada.

## **6.2 Amplificación de los genes**

Los genes completos que codifican para la AdoMetDC y SpdS se amplificaron mediante el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por las siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction) utilizando como templado DNA genómico de *T. cruzi* de la cepa Ninoa.

### **6.2.1 Fundamento del Método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

El método de PCR está basado principalmente en 3 pasos (Figura 10):

Primer paso: Desnaturalización. Las dos hebras del DNA genómico se separan por calentamiento a 95 °C, cada una servirá de molde para sintetizar una nueva hebra, en la cual estará contenido el fragmento que debe ser copiado.

Segundo paso: Alineamiento. En este paso se disminuye la temperatura entre los 50 y 65 °C para que los cebadores hibriden de manera complementaria a la secuencia de DNA presente en el templado de DNA.

Tercer paso: Extensión. La DNA polimerasa presente en el medio de reacción añade uno a uno los nucleótidos de manera complementaria a la hebra templado. Este paso se realiza a 72 °C, por lo que las enzimas utilizadas son termoestables.

Este proceso de tres pasos se repite unas 30 ó 40 veces y durante cada ciclo, se sintetiza exponencialmente la cantidad de fragmentos de DNA de interés.

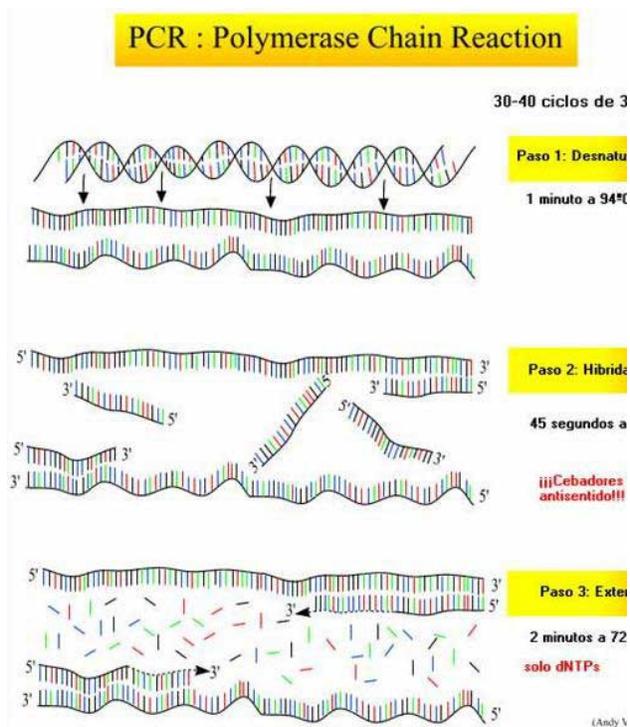


Figura 10. Pasos básicos de la PCR (Vierstracte, 1999). En el primer paso ambas hebras del DNA se separan por desnaturalización a 95°C, en el paso 2 los oligonucleótidos se alinean y se unen de manera complementaria a las hebras de DNA; en el tercer paso la DNA polimerasa adiciona los nucleótidos de manera complementaria a la hebra templado. El proceso se repite de 30 a 40 ciclos en los que se amplifica el DNA blanco de una manera exponencial.

## 6.2.2 Protocolo Experimental

La amplificación se realizó en un termociclador TGradient 96 de Biometra bajo las siguientes condiciones: 5 minutos de desnaturalización a 95°C, seguido de 30-40 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de alineamiento a 60.9°C y 1.5 min de extensión a 72°C. Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µL conteniendo 1.25 U de DNA polimerasa recombinante, 3.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 ng/µL de cada uno de los oligonucleótidos, 10 mM de una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 2% de DMSO, 10 µg de BSA y 650 ng de DNA genómico de *T. cruzi* de la cepa mexicana Ninoa. En el caso de la SpdS, la polimerasa que se utilizó fue la de *Pyrococcus furiosus* (Pfu) (Fermentas), mientras que para la AdoMetDC fue la Taq Polimerasa (Fermentas).

## **6.3 Análisis del DNA amplificado por electroforesis en gel de agarosa.**

### **6.3.1 Fundamento de la técnica**

Los genes que se amplificaron por el método de PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa con el fin de evaluar su tamaño y compararlo con los reportados. Esta técnica consiste en someter a una molécula con carga neta positiva o negativa a un campo eléctrico para que sea capaz de migrar a lo largo de un gel, hacia el polo opuesto de su carga. El DNA migrará debido a las cargas negativas de los fosfatos, por lo que es necesario mantener el pH cercano a 8 para garantizar que los grupos se encuentran ionizados. La distancia que migran se comparan con marcadores de DNA de peso molecular conocidos.

### **6.3.2. Protocolo Experimental**

Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 0.8% (p/v) en buffer TBE (45 mM Tris, 45 mM ácido bórico, 01 mM EDTA). Las muestras se sometieron a 100 voltios durante 90 minutos. Para visualizar las bandas se adicionó bromuro de etidio al gel, el cual se intercala entre el DNA y puede fluorescer cuando se hace incidir luz ultravioleta en él. Las bandas de DNA del tamaño de gen esperado se cortaron y se purificaron.

### **6.3.3 Purificación de los fragmentos del DNA de la agarosa**

Para purificar los fragmentos amplificados se utilizó el sistema de purificación DNA ZymoClean Gel DNA Recovery Kit, que consta de un buffer ADB (Agarose Dissolving Buffer) en el cual se disuelve a 55°C por 5-10 minutos el trozo de gel en el que se encuentra el fragmento de DNA. Posteriormente esta solución se transfiere a una columna contenida en el kit, en la cual se adsorberá el ADN y se centrifuga a 13,404 x g por un minuto, y se realizan 2 lavados con un buffer de lavado y el DNA purificado se eluye con 6 a 10 µL de agua milliQ.

## **6.4 Clonación del DNA amplificado en un plásmido para productos de PCR.**

### **6.4.1 Fundamento de la clonación**

El término clonación puede definirse como el proceso por el cual se consiguen copias idénticas de un organismo, célula o molécula. En nuestro caso consistió en insertar el DNA amplificado por PCR (inserto) en un plásmido apropiado (vector) mediante un proceso denominado ligación. Los vectores que se utilizaron fueron el pJET y pGEM los cuales son plásmidos linearizados y con extremos romos o cohesivos que pueden ser unidos por una DNA ligasa. El vector pGEM (Promega) cuenta con un triplete de timinas que se unen complementariamente a las adeninas adicionales por la Taq polimerasa empleada durante la amplificación del DNA. Este vector también le confiere resistencia a ampicilina a las células transformadas y es capaz de identificar a las células que contienen al vector con el inserto de aquellas que no lo tienen gracias a la adición del X-gal e IPTG al medio.

El vector pJET (Fermentas) cuenta con grupos fosforilo en su extremo 5' por lo que la fosforilación del PCR no es necesaria además el kit contiene una enzima T4 DNA ligasa que no requiere de la adición de adeninas a los extremos romos del PCR para unirse al vector. Este vector le confiere resistencia a ampicilina a las células y tiene un gen que codifica para la enzima *eco47IR*, una enzima de restricción letal, la cual se expresa sólo en caso en la que el vector se recircularize sin el inserto, por lo que las células que sean transformadas con el gen sin inserto morirán.

### **6.4.2 Protocolo Experimental**

Una vez purificado el fragmento de DNA amplificado de SpdS se ligó al vector de clonación pJET 1.2, para lo cual se empleo 5 µL de buffer de reacción 2x, 1 µL de vector de clonación pJET (50 ng/mL) y 0.5 µL de T4 DNA ligasa; la reacción se llevó a un volumen final de 20 µL y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. En el caso de la AdoMetDC, el vector al que se ligó el producto de PCR fue el pGEM-T Easy vector empleando 4 µL de buffer de

ligación rápida 2x, 0.5  $\mu\text{L}$  del vector, 4.5  $\mu\text{L}$  del producto de PCR y 1  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligasa (3U/ $\mu\text{L}$ ) en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . La mezcla se incubó 1 hora a temperatura ambiente y después a 4  $^{\circ}\text{C}$  toda la noche.

## **6.5 Transformación bacteriana y selección de células.**

### **6.5.1. Fundamento**

La transformación consiste en introducir material genético en una célula. El método se denomina así porque dicha célula es “transformada” o alterada genéticamente. La introducción de material genético externo a las células se logra haciendo orificios en las paredes celulares (hacerlas “competentes”) mediante el uso de sales como el  $\text{CaCl}_2$  y la posterior internalización del DNA favorecida por un choque de calor. Una vez realizada la transformación es necesario seleccionar a las bacterias transformantes que lograron introducir el vector con el inserto y a nuestro gen de interés.

El vector PGEM tiene el gen de la  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*) en el sitio de clonación múltiple mientras que las células transformadas codifican para la porción carboxilterminal de la  $\beta$ -galactosidasa (alpha complementación). Las bacterias que logran realizar la  $\alpha$  complementación se pueden reconocer fácilmente porque forman colonias azules en presencia del sustrato cromogénico X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido) y un inductor del gen de la lactosa como el IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido). La transformación de las bacterias con el vector con el inserto interrumpe el marco de lectura de la enzima y no logran la  $\alpha$ -complementación, por lo que las colonias de dichas bacterias serán blancas. Por otro lado el pJET que no tiene inserto no interrumpe el marco de lectura de la enzima de restricción que codifica para una proteína tóxica y por lo tanto impide el crecimiento de las bacterias transformadas.

### **6.5.2 Protocolo experimental**

Se prepararon células competentes de la siguiente manera. Se inocularon células de *E. coli* provenientes de un precultivo crecido en medio líquido Luria-

Bertani (LB; 1% extracto de levadura, 1% triptona y 0.5% NaCl) y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.4 a 0.5. Las células se cosecharon por centrifugación a 1642 x g durante 10 min a 4°C. La pastilla celular se separó del sobrenadante y se resuspendió en 33 ml de una solución 0.1 M de CaCl<sub>2</sub> estéril a una temperatura de 4°C, y se incubaron las células a la misma temperatura durante 1 h. Posteriormente, las células se cosecharon por centrifugación, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2 mL de una solución 0.1M CaCl<sub>2</sub> suplementada con 17% glicerol y se mantuvieron en congelación a -70°C hasta el momento de la transformación.

Para la transformación se emplearon 50 µL de células competentes de *E. coli* Top10 obtenidas de la manera anterior y 10 µL de la reacción de ligación del vector con el inserto. La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos, transcurrido este tiempo, se colocó en un baño a 42°C durante 40 segundos, después de los cuales se regresó al hielo y se incubó por 3 minutos más. Una vez que se sometieron las células al choque térmico, se incubaron en 1 mL de medio LB a 37 °C por 1 h con el fin de inducir su recuperación. Por último las células se cosecharon y en condiciones de esterilidad se sembraron en cajas Petri con medio LB sólido + ampicilina a 100 µg/mL. Las células de AdoMetDC que se transformaron con el vector pGEM ligado al inserto se les adicionó 0.4 mM de IPTG y 80 µg/mL de X-Gal para identificar a las células que contienen el vector con el inserto.

## **6.6 Purificación de DNA plasmídico por el método de Miniprep.**

Para la purificación del DNA plasmídico de las cepas positivas a los marcadores de selección de acuerdo al vector utilizado, se seleccionaron de 3 a 5 clonas transformantes y se cultivaron en medio líquido LB + ampicilina (100 µg/mL) a 37 °C durante toda la noche. Las células se cosecharon por centrifugación a 1642 x g y la pastilla obtenida se sometió a un proceso de extracción y purificación del DNA plasmídico utilizando el Sistema Wizard Miniprep (marca Promega). El protocolo consiste de los siguientes pasos:

1. Resuspender las células en 250  $\mu$ L de solución de resuspensión (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 100  $\mu$ g/mL RNasa A).
2. Lisar las células adicionando 250  $\mu$ L de una solución de lisis (0.2 M NaOH, 1% SDS ) y 10  $\mu$ L de una solución de proteasa alcalina.
3. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Detener la reacción adicionando 350  $\mu$ L de una solución neutralizadora (4.09 M cloruro de guanidina, 0.759 M acetato de potasio, 2.12 M ácido acético).
5. La muestra se centrifuga a 26,272 x g por 10 min.
6. El sobrenadante obtenido se pasa por una columna que permite retener al DNA. Se centrifuga 1 min a 26,272 x g.
7. El eluido se descarta y la columna se lava con 750  $\mu$ L de una solución de lavado y se centrifuga por 1 min a 26,272 x g.
8. Se realiza un segundo lavado empleando solamente 250  $\mu$ L de la solución de lavado y se centrifuga a la misma velocidad por 2 min adicionales.
9. El DNA contenido en la columna se eluye con 100  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y centrifugando 1 min.

### **6.7 Confirmación de la clonación del gen deseado.**

El DNA plasmídico obtenido por el método de Miniprep se sometió a una digestión empleando 2 enzimas de restricción, NdeI y HindIII para el caso de la AdoMetDC y NheI y HindIII para el caso de la SpdS, las cuales reconocen los sitios de restricción en los cebadores (ver diseño de oligonucleótidos). Para ello se emplearon 10  $\mu$ L de DNA plasmídico, los cuales se incubaron con 10 U de cada enzima. Las mezclas de reacción se incubaron a una temperatura de 37°C durante 2 h.

Por otro lado, con el fin de evaluar si los fragmentos contenían el gen de interés, se les realizaron restricciones con enzimas de restricción que tuvieran sitios de corte dentro del gen de interés las cuales fueron NcoI y HindIII para ambos casos. El patrón de restricción se monitoreó en un gel de agarosa al 0.8 % p/v.

Posteriormente los plásmidos positivos se sometieron a secuenciación automática de DNA en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

## **6.8 Clonación de proteínas recombinantes en el vector de sobreexpresión.**

### **6.8.1 Fundamento del sistema de expresión heteróloga pET**

En 1986, Studier y Moffatt crearon un sistema de expresión de genes heterólogos en la bacteria *E. coli*. Se utilizó bacteriófago lambda para insertar el gen que codifica para la RNA polimerasa del fago T7 en el cromosoma de la bacteria. El gen de dicha RNA polimerasa esta acoplado al promotor lac por lo que la expresión de la enzima se induce por la adición en el medio de un análogo de lactosa (Studier y col, 1986). El sistema de vectores de expresión pET se basa en este mecanismo (Fig. 11). Los vectores pET tienen promotores que son reconocidos por la T7 RNA polimerasa los cuales están acoplados a los sitios de clonación múltiple de tal manera que un gen insertado en el plásmido pET no se transcribe a menos que la T7 RNA polimerasa esté presente en la célula lo cual se logra cuando se adiciona un inductor análogo de la lactosa.

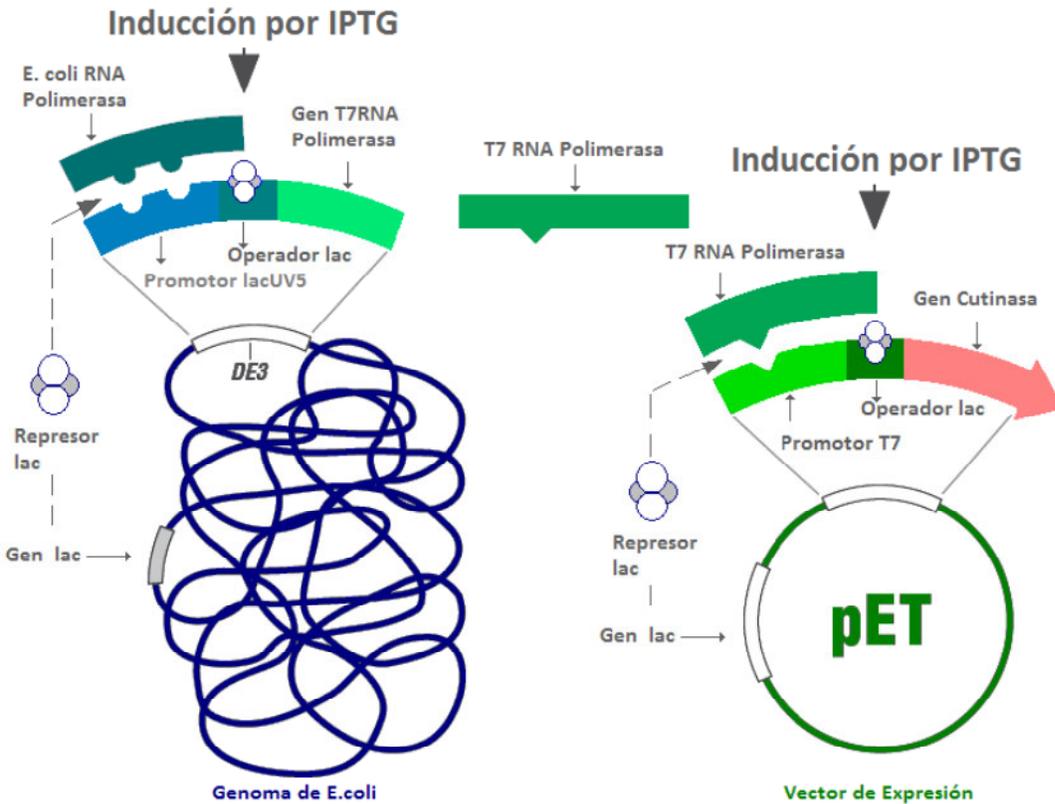


Figura 11. Funcionamiento del sistema pET. A la izquierda se puede apreciar el genoma de *E.coli* BL21DE3, las cuales pueden sintetizar la T7 RNA polimerasa en presencia del inductor IPTG . Del lado derecho se puede observar el plásmidos pET en el cual se encuentra el promotor de la T7 RNA polimerasa, el cual es inducible por IPTG, y después de este sitio, el gen que codifica para una proteína de interés; en este caso el ejemplo muestra el gen de la cutinasa en nuestro caso este representaría al gen de la AdoMetDC y/o el de la SpdS.

### 6.8.2. Clonación en el vector de expresión

Una vez confirmada por secuenciación de DNA la identidad de los genes que nos interesan, los genes se extrajeron con enzimas de restricción de los plásmidos pJET y PGEM , se separaron por electroforesis y se purificaron de la agarosa como se describió anteriormente.

Por otro lado se realizó la restricción del vector pET28, empleando las mismas enzimas para cada uno de los genes. Posteriormente se defosforiló el extremo 5' con fosfatasa alcalina y se extrajo con fenol-cloroformo, se precipitó

de la fase soluble con etanol absoluto y se lavó con etanol al 70%. Por último se dejó secar y se resuspendió en agua.

Se realizaron reacciones de ligación independientes empleando 10  $\mu$ L de los genes purificados, 5  $\mu$ L del plásmido pET28 digerido y 1  $\mu$ L de T4 DNA ligasa y la mezcla se incubó a 16°C durante toda la noche. Se utilizaron 10  $\mu$ L de la mezcla de ligación para transformar células competentes de *E.coli* BL21(DE3) obtenidas como se describió anteriormente. Las células se plaquearon en medio sólido LB suplementado con 30  $\mu$ g/mL de kanamicina y se incubaron a 37°C toda la noche. Se seleccionaron algunas colonias para extraer el DNA plasmídico el cual se digirió con enzimas de restricción para determinar aquellas que contuvieran el plásmido con el gen de interés.

### **6.8.3 Sobreexpresión de las enzimas en las bacterias**

En las bacterias que contenían el plásmido pET con el inserto, se indujo la sobreexpresión de las enzimas empleando el siguiente protocolo. Se seleccionaron de 2 a 3 colonias aisladas positivas y se prepararon cultivos de 3 mL de medio LB adicionados con 1 $\mu$ g/mL de kanamicina los cuales se incubaron a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.6-0.8. Posteriormente se adicionó 0.4 mM de IPTG para inducir la sobre-expresión y los cultivos se indujeron a 25 °C durante toda la noche. La expresión de las proteínas se monitoreo por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 15%.

De una clona que sobre-expresa la proteína de interés se escaló a un cultivo de 25 mL y se indujo la sobre-expresión bajo el mismo protocolo. Se cosecharon las células por centrifugación a 2094 x g durante 10 minutos, la pastilla celular se resuspendió en 10 mL de buffer de lisis (300 mM NaCl, 2 mM de Imidazol y 100 mM de trietanolamina a pH 7.4) y las células se rompieron por sonicación empleando 10 ciclos totales, los cuales constan de 1 min de sonicación (15% de output total) y 1 min de enfriamiento en agua con hielo. El lisado bacteriano obtenido se centrifugó a 11,952 x g durante 15 minutos, obteniéndose una fracción soluble y el precipitado. Para determinar en cuál de

estas fracciones se encontraba sobre-expresada la proteína, se monitoreó su presencia a través de electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes.

#### **6.8.4 Purificación de las proteínas recombinantes.**

Una vez que las proteínas se expresaron de manera mayoritaria en la fracción soluble de los extractos bacterianos se procedió a su purificación. Se realizaron cultivos de 250 mL de medio LB para la SpdS y de 500 mL para la AdoMetDC a 37 °C y se indujo la sobreexpresión de la manera descrita. Las células se cosecharon y se sonicaron bajo el mismo protocolo.

El sobrenadante clarificado se incubó por un lapso de 1 hora con 2 mL de una resina acoplada a cobalto (marca Clontech). Transcurrido este tiempo la mezcla se centrifugó a 2750 x g por 5 minutos y se separó el sobrenadante que representa la fracción de todo aquello que no se une a la resina (flowthrough). La resina se lavó tres veces con 10 mL de buffer de lisis. Posteriormente la resina se colocó en una columna para cromatografía la cual tiene un filtro en la parte inferior y se realizó un lavado con 10 ml de buffer de lisis con una concentración final de 10 mM de imidazol. Por último las proteínas se eluyeron con 5 mL de buffer de lisis suplementado con 100 mM de imidazol y se colectó el eluato. Las proteínas se concentraron por centrifugación a través de un filtro tipo amicon (marca Millipore) con un corte de 30 kDa. Las proteínas concentradas se les adicionó glicerol a una concentración final del 50% y se almacenaron a -20°C hasta por 2 o 3 días ya que las proteínas son muy inestables cuando se almacenan por periodos largos de tiempo.

### **6.9 Cuantificación de las proteínas por el método de Lowry.**

#### **6.9.1 Fundamento de la técnica**

El método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas el cual utiliza una solución que contiene  $\text{Cu}^{2+}$ , el cual se une a los enlaces peptídicos de las proteínas en medio alcalino

formando un complejo de color azul. Además, al estar desnaturalizada la proteína por la alcalinidad del medio se exponen los residuos fenólicos de las tirosinas o el triptófano en primer instancia o bien de la cisteína, la cistina y la histidina los cuales reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdotúngstico) el cual al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso (Fig. 12).

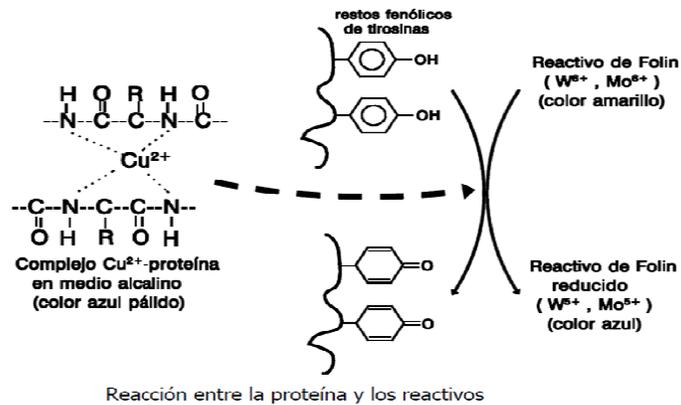


Figura 12. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry. En el primer paso el cobre presente en la solución de Lowry, reacciona con la proteína formando un complejo. los residuos fenólicos presentes en la proteína se exponen y reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Tomado [www.scribd.com/doc/46292301/cuantificacion-de-proteinas](http://www.scribd.com/doc/46292301/cuantificacion-de-proteinas)

### 6.9.2. Protocolo experimental

Las proteínas recién purificadas se cuantificaron por el método de Lowry. Debido a que el imidazol con el que se purifican las enzimas interfiere en la cuantificación por este método, es necesario primero precipitar la proteína con ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final del 13%, e incubar la reacción durante toda la noche a 4°C. Posteriormente las muestras se centrifugan durante 15 min a 20,817 g a 4°C y se deja secar la pastilla en estufa a 37°C. La proteína precipitada se resuspende en 100 µL de solución A de Lowry (1% SDS, 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.4% NaOH y 0.16% de tartrato de Na-K) y se incuba con 1 mL de solución C de Lowry (mezcla que contiene 1.0 mL de solución B de Lowry (0.4% CuSO<sub>4</sub>) por cada 50 mL de solución A) por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adiciona a cada tubo 100 µL de

reactivo de Folín- Ciocalteau (diluido 1:1), se incubó por 30 min y se mide la absorbancia a 660 nm. Las muestras se comparan con una curva patrón de albúmina bovina sérica (BSA) tratada de la misma manera que las muestras.

## 6.10 Caracterización cinética de las enzimas por espectrofotometría.

### 6.10.1 Protocolo experimental

Para poder llevar a cabo la caracterización cinética de ambas enzimas (SpdS y AdoMetDC) se empleó como primera opción un sistema reconstituido de la vía de síntesis de Spd con AdoMetDC y SpdS acoplado a la síntesis de T(SH)<sub>2</sub> (Fig. 13). El sistema acoplante consistió en monitorear la producción de Spd y sintetizando T(SH)<sub>2</sub> con GSH y TryS de *Crithidia fasciculata* (CfTryS). Como esta enzima forma ADP, éste último es utilizado por la piruvato cinasa (PYK) junto con el fosfoenolpiruvato (PEP) para regenerar el ATP y formar piruvato (Pyr). Por último, la lactato deshidrogenasa (LDH) convierte al Pyr en lactato con oxidación del NADH lo cual se puede monitorear a una longitud de onda de 340 nm en un espectrofotómetro.

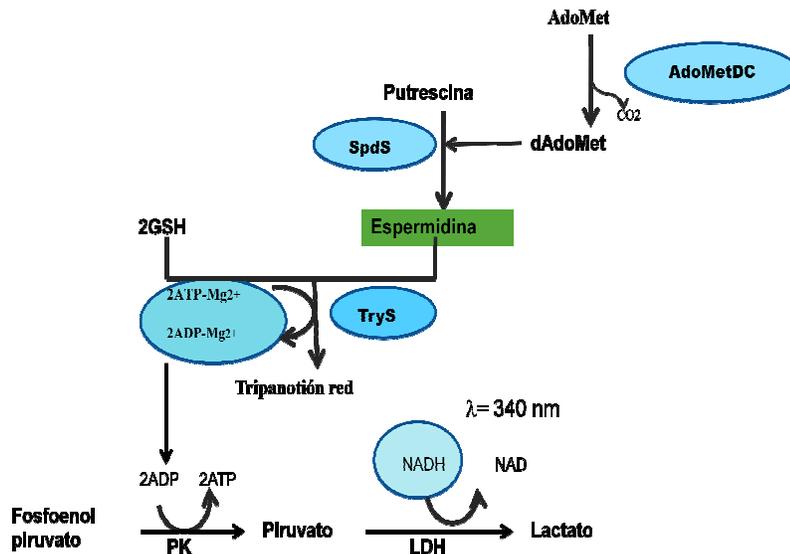


Figura 13. Esquema de ensayo para caracterizar la AdoMetDC y SpdS por espectrofotometría. La síntesis de espermidina se acopló a la síntesis T(SH)<sub>2</sub>, y finalmente a la síntesis de lactato, donde se produce la oxidación de NADH, el cual se detecta en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm.

Los ensayos se realizaron en un volumen final de 0.5 ó 1.0 mL a temperatura constante de 37 °C y pH 7.4 empleando como buffer 40 mM HEPES, 1 mM EDTA y 100 mM KCl. Las concentraciones de cada componente fueron saturantes (por lo menos 10 veces el valor de la  $K_m$  de cada sustrato). La unidades de actividad de las enzimas del sistema acoplante se adicionaron en exceso. La reacción se inició con 0.2 a 0.3 U de TryS y los sustratos se adicionaron en el orden indicado en la Tabla 3.

**Tabla 3. Concentraciones de reactivos empleados en la determinación de la actividad de SpdS y AdoMetDC por espectrofotometría.**

Los reactivos se muestran de acuerdo al orden de adición.

<b>SUSTRATOS Y ENZIMAS</b>	<b>CONCENTRACIÓN EN LA CUBETA</b>
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
PEP	5 mM
NADH	0.161 mM
DTT	5 mM
PK	0.7 U
LDH	1.11 U
ATP	1 mM
GSH	1 mM
AdoMetDC	0.1 a 0.5 mg
AdoMet	1.1 mM
Putrescina	20 mM
SpdS	0.4 a 0.8 mg
TryS	0.2 a 0.3 U

Como control se evaluó una cubeta de reacción en la que se adicionaron todos los sustratos a excepción de las enzimas AdoMetDC ó SpdS con el fin de obtener una basal que contemplara las reacciones inespecíficas que pudiera tener el sistema. La actividad obtenida de esta basal se restó a la actividad obtenida con el sistema completo, lo cual nos daría la actividad de las enzimas de interés.

## **6.11. Caracterización cinética de la AdoMetDC por cromatografía de gases.**

### **6. 11.1 Fundamento de la cromatografía de gases**

La cromatografía de gases es una técnica de separación de moléculas, en la que un gas se eluye gracias a una fase móvil, la cual consta de un gas inerte. Por otro lado, se utiliza una fase estacionaria, la cual es un líquido sobre una superficie sólida inerte, en la cual las moléculas del gas se retendrán (Fig. 14).

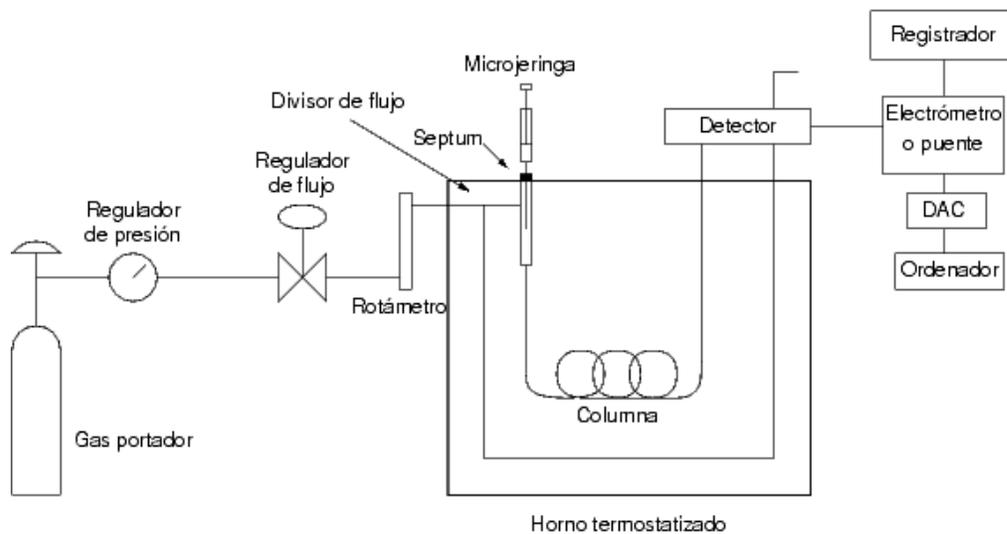


Figura 14. Diagrama de un cromatógrafo de gases.

### 6.11.2 Protocolo de medición de la actividad de AdoMetDC

Para determinar la actividad específica de la AdometDC se prepararon frascos viales de 10 mL los cuales contenían 5 mM DTT, 20 mM Put, buffer 40 mM HEPES a pH 7.4 o buffer 10 mM MOPS pH 6.5 y 0.3, 0.6 ó 1.2 mg de AdoMetDC en un volumen total de 1 mL. Los frascos se cerraron herméticamente con un tapón de goma como se muestra en la Fig. 15. Los frascos se preincubaron a 37 °C y se inició la reacción adicionando AdoMet a una concentración final de 100  $\mu$ M. La liberación de CO<sub>2</sub> se monitoreó a distintos tiempos en un cromatógrafo de gases GC 2010 (marca Shimadzu) tomando muestras del gas en el frasco introduciendo una microjeringa Hamilton a través de una septa insertada en el tapón de goma. Se tomaron 5  $\mu$ L al tiempo cero (antes de adicionar la AdoMet), y a 1.5, 3, 5, 15 y 20 min después de que se inicio la reacción con AdoMetDC.



Figura 15. Sistema empleado para medir la actividad de AdoMetDC. Frasco vial de 10 mL cerrado herméticamente, incluye un septo para muestrear el CO<sub>2</sub> producido y una jeringa por la cual se inyecta el sustrato AdoMet con el que se inicia la reacción.

Para determinar la concentración de CO<sub>2</sub> liberado por la actividad de la AdoMetDC se realizó una curva patrón de CO<sub>2</sub>. Se prepararon 7 frascos viales de 100 mL de la siguiente manera. A cada frasco vial cerrado herméticamente con un tapón de corcho y una rosca de aluminio, se le insertaron 2 agujas de jeringa de 3 ó 5 mL. Se gaseó N<sub>2</sub> por un lapso de 5 min para asegurar de que todo el aire contenido en el frasco se drenara por la otra aguja. Transcurrido este tiempo se retiró la aguja de escape y se continuó adicionando gas N<sub>2</sub> por un lapso de 3 min más. Para asegurar que el volumen dentro del frasco tuviera 100 mL del gas, se liberó la presión introduciendo una jeringa hasta que las presiones se igualaran. Uno de los frascos se gaseó con CO<sub>2</sub> durante 5 min para asegurar que todo el volumen del frasco contuviera 100% de CO<sub>2</sub> el cual nos sirve como el stock de este gas. Para obtener los frascos con distintas concentraciones de CO<sub>2</sub> se tomaron con una jeringa 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2 mL del N<sub>2</sub> contenido en los frascos y se inyectó el mismo volumen de CO<sub>2</sub>. Finalmente se tomaron 5 µL de cada una de las mezclas con diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> y se inyectaron en el cromatógrafo de gases.

De los cromatogramas se obtuvieron las áreas bajo la curva de los picos que corresponden al CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y vapor de agua (H<sub>2</sub>O). Debido a que en cada inyección existe un grado de variabilidad en el volumen de inyección, los datos de área bajo la curva de CO<sub>2</sub> se normalizan con respecto al N<sub>2</sub> al tiempo cero, donde se tiene mayor certeza en el volumen de inyección.

Los cálculos para obtener la concentración de CO<sub>2</sub> se describen a continuación.

Primero se normalizan las áreas bajo la curva del CO<sub>2</sub> producido. Se toman el promedio de los valores del área bajo la curva del N<sub>2</sub> al tiempo cero de dos inyecciones el cual se toma como el 100% de gas nitrógeno. Posteriormente, se toma el promedio de las áreas bajo la curva de dos inyecciones de las muestras con diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> y se normalizan con respecto al 100% de N<sub>2</sub>. Los datos normalizados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4 Áreas bajo la curva normalizadas para las diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> de la curva patrón.

Concentración de CO <sub>2</sub> (%)	Área bajo la curva de CO <sub>2</sub> normalizado
0	0
0.1	29
0.25	63
0.5	124
1	247
2	487

Con los datos de la Tabla 4 se construyó la curva estándar de CO<sub>2</sub> (Fig. 16).

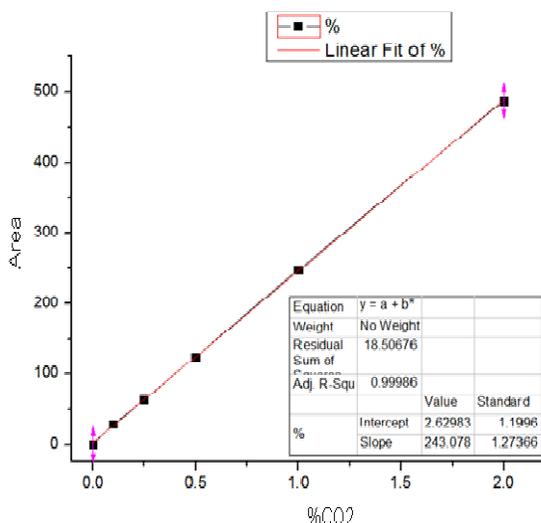


Figura 16. Curva estándar de CO<sub>2</sub>. La gráfica representa el promedio de dos ensayos realizados bajo las mismas condiciones, los valores de  $m=243.078$  y  $b=2.6$  se utilizan para obtener los micromoles de CO<sub>2</sub> de las muestras problema.

Posteriormente se midió la producción CO<sub>2</sub> del ensayo enzimático de la AdoMetDC en la cual se varió la concentración de proteína. Las áreas bajo la curva de CO<sub>2</sub> para cada tiempo se normalizaron de la manera que se describió en el párrafo anterior. A estos valores de áreas bajo la curva se les restó el valor del  $t=0$  en ausencia del sustrato. Los valores de áreas bajo la curva de las muestras problema se interpolaron en la curva patrón para obtener los valores de porcentaje de CO<sub>2</sub> liberado en el volumen de 10 ml de la reacción enzimática. Por ejemplo, si el valor fue de 0.59% significa que 59  $\mu$ l de CO<sub>2</sub> se liberaron en 10 ml del volumen total de la reacción enzimática.

Para transformar los volúmenes de CO<sub>2</sub> liberado en  $\mu$ moles de CO<sub>2</sub> se utiliza la ley general de los gases  $PV=nRT$ ; donde  $P= 0.77$  atm,  $n= \mu$ moles de CO<sub>2</sub>,  $R= 0.082$  atm\*L/mol\*K y  $T = 37^{\circ}\text{C} + 273\text{K} = 310\text{K}$ . Despejando  $n$  y sustituyendo en  $V$  los valores en L de CO<sub>2</sub> producido en la reacción se pueden obtener los  $\mu$ moles de CO<sub>2</sub> producidos. Se grafican los  $\mu$ moles de CO<sub>2</sub> liberado en cada tiempo de incubación y a cada concentración de proteína para calcular las velocidades iniciales de la reacción.

## 7. RESULTADOS.

### 7.1 Amplificación de los genes de AdoMetDC y SpdS.

La secuencia de los genes que codifican para la AdoMetDC (número de acceso al Gen Bank AF075243) y SpdS (número de acceso al Gen Bank XP\_811725) reportados para *T. cruzi* de la cepa CL Brener se utilizaron para diseñar los cebadores para amplificar los respectivos genes en nuestra cepa de estudio *T. cruzi* Ninoa. Los genes se amplificaron por PCR, empleando DNA genómico como template. Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis de DNA en geles de agarosa y revelando las bandas por tinción con bromuro de etidio y a través de un transiluminador. En la Fig. 17 se observa un fragmento de DNA amplificado con un tamaño aproximado de 1110 pb para la AdoMetDC y de 891 para la SpdS, los cuales se compararon con un marcador de peso molecular.

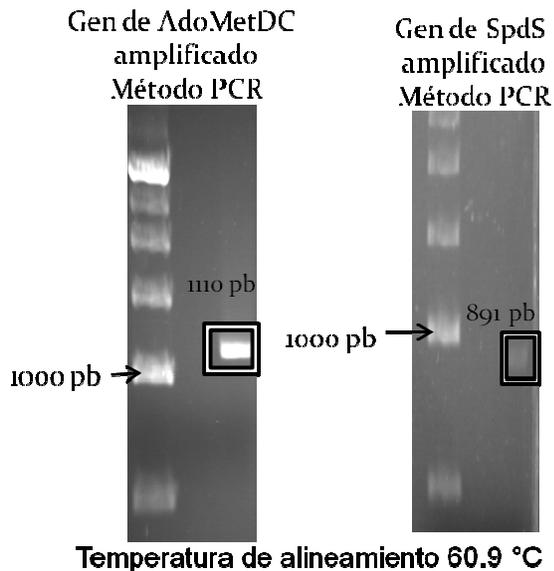


Figura 17. Geles de agarosa al 0.8% mostrando los fragmentos del tamaño esperado para los genes de la SpdS y la AdoMetDC amplificados por PCR.

### 7.2 Clonación del DNA amplificado en un vector para productos de PCR.

Las bandas de DNA del tamaño esperado se cortaron del gen, se purificaron y se clonaron en el vector pGEM T-easy (para el caso de la AdoMetDC) o en pJET (en el caso de la SpdS). Ambos vectores le confieren a

las células resistencia a ampicilina, por lo que sólo aquellas células que lograron incorporar dicho vector fueron capaces de crecer en medio LB con dicho antibiótico. En el caso de la AdometDC (clonación en pGEMT-easy), para diferenciar entre las transformantes del plásmido se utilizó la capacidad de romper el sustrato cromogénico X-Gal de tal manera que las células que llevan el inserto no pueden romperlo y carecen de coloración mientras que aquellas que llevan el plásmido con el inserto son de color azul. En el caso de la SpdS (clonación en pJET1.2/blunt), las células que contienen al vector sin inserto mueren debido a la expresión de una proteína tóxica, mientras que aquellas células que contienen el vector con el inserto pueden sobrevivir.

### 7.3 Digestión del DNA plasmídico.

Se seleccionaron 5 colonias de células transformantes, y se purificó el DNA plasmídico por el método de Miniprep. El plásmido obtenido se digirió con *NdeI* y *HindIII* para el caso de la AdoMetDC y con *NheI* y *HindIII* en el caso de la SpdS y la reacción de restricción se separó en un gel de agarosa al 0.8%. En la figura 18 se pueden visualizar dos bandas en cada caso, una correspondiente al gen (1110 pb en el caso de la AdometDC y de 891 pb para la SpdS) y otra que corresponde a cada vector (3015 pb para el pGEM y 2974 pb para el pJET), las cuales se compararon con un marcador de peso molecular.

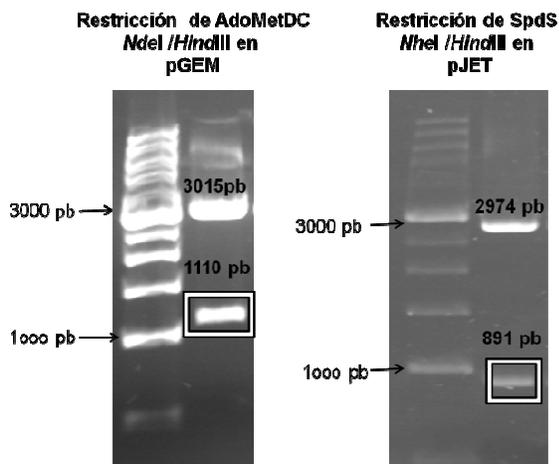


Figura 18. Análisis de restricción de los plásmidos que contienen los fragmentos amplificados para AdoMetDC y SpdS. En ambos gels se pueden observar dos bandas una que corresponde al gen (encerrados en los recuadros) y la otra al vector de clonación, el tamaño de ambas bandas se comparó con un marcador de peso molecular de DNA.

#### 7.4 Secuenciación.

Ambos genes clonados en los vectores para productos de PCR se secuenciaron en el Instituto de Fisiología de la UNAM. Se realizó un análisis de las secuencias de nucleótidos traducidas alineándolas con la secuencia de aminoácidos de los genes de *T.cruzi* de la cepa CL Brener, empleando el programa CLUSTALW 2.1, obteniéndose una identidad igual o mayor al 99.5 % para ambas enzimas.

En el caso de la secuencia obtenida para la AdoMetDC (Figura 19), se pudo observar que los residuos importantes para el procesamiento de la enzima (Glu<sup>85</sup> y Ser<sup>86</sup>), así como los sitios para la actividad (Glu<sup>29</sup>, Glu<sup>32</sup>, Cys<sup>100</sup>, Glu<sup>149</sup>) y los sitios de activación de putrescina (Asp<sup>190</sup>, Ser<sup>194</sup> y Glu<sup>276</sup>) (Kinch, *et al* 1999) se conservaron. También se puede observar que la enzima presenta dos cambios en los aminoácidos 292 y 352. Sin embargo hasta ahora no es posible dilucidar qué tanto pueden comprometer la actividad de la enzima.

```

Bren1      MLSNKDPLSLMAMWGSVKGYDPNQGASFEEGPEEKRLEVIMRIIDETHSEGLHALGDEVWKG 60
Bren2      MLSNKDPLSLMAMWGSVKGYDPNQGASFEEGPEEKRLEVIMRIIDETHSEGLHALGDGVWKG 60
Ninoa      MLSNKDPLSLMAMWGSVKGYDPNQGASFEEGPEEKRLEVIMRIIDETHSEGLHALGDEVWKG 60
*****
Bren1      VVGSLNAQIVSKESNEYIRSYVLTESSLFVMRDRIILITCGTTTLLNAVPFVLDAVSDVR 120
Bren2      VVGSLNAQIVSKESNEYIRSYVLTESSLFVMRDRIILITCGTTTLLNAVPFVLEAVSDVR 120
Ninoa      VVGSLNAQIVSKESNEYIRSYVLTESSLFVMRDRIILITCGTTTLLNAVPFVLEAVSDVR 120
*****
Bren1      GEVEWVSFMHKNYSFPWEQKGPLHSMAEEFNTLRTYFPSGKPFIFGPVSDHYFLFVYDD 180
Bren2      GEVEWVSFMHKNYSFPWEQKGPLHSMAEEFNTLRTYFPSGKPFIFGPVSDHYFLFVYDD 180
Ninoa      GEVEWVSFMHKNYSFPWEQKGPLHSMAEEFNTLRTYFPSGKPFIFGPVSDHYFLFVYDD 180
*****
Bren1      VIRPCETENDTQLSMTMYGLDRTQTKHWFSDRFISTGTETAAIRKATKLDKVADDSSWKLH 240
Bren2      VIRPCETENDTQLSMTMYGLDRTQTKHWFSDRFISTGTETAAIRKATKLKNVADDSSWKLH 240
Ninoa      VIRPCETENDTQLSMTMYGLDRTQTKHWFSDRFISTGTETAAIRKATKLDKVADDSSWKLH 240
*****
Bren1      DLQFEPCGYSINTIRGAEYQTIHITPEDHCSFASYETNTPAVNYSERINTVLGVFAPIRF 300
Bren2      DLQFEPCGYSINTIRGAEYQTIHITPEDHCSFASYETNTPAVNYSERINTVLGVFAPIRF 300
Ninoa      DLQFEPCGYSINTIRGAEYQTIHITPEDHCSFASYETNTPAVNYSERINTVLGVFAPIRF 300
*****
Bren1      SVIVFIDPDSVDVGRLYQKGQNVGVEAEYYPKYELQNRTVNEFAPGYVVMKMNYARRAEVT 360
Bren2      SVIVFIDPDSVDVGRLYQKGQNVGVEAEYYPKYELQNRTVNEFAPGYVVMKMNYAMRAEVA 360
Ninoa      SVIVFIDPDSVDVGRLYQKGQNVGVEAEYYPKYELQNRTVNEFAPGYVVMKMNYARRAEVA 360
*****
Bren1      EKDSTDSVEE- 370
Bren2      EKDSTDPVEE- 370
*****

```

Figura 19. Análisis de las secuencias de AdoMetDC con el programa Clustal W. La secuencia que se obtuvo muestra un 99.5% de identidad comparada con la secuencia de la cepa CLBrener. En azul se muestran los sitios de procesamiento de la enzima, en verde los sitios importantes para la actividad de la enzima, en magenta los sitios importantes para la activación por Put y en rojo se muestran los aminoácidos que cambiaron.

En el alineamiento de las secuencias de SpdS (Fig. 20) se pudo observar que se conservaron los sitios de unión de la dAdoMet (His<sup>74</sup>, Asp<sup>98</sup>, Asp<sup>118</sup>, Asp<sup>149</sup>, Gly<sup>150</sup>, Asp<sup>168</sup> y Pro<sup>175</sup>) así como los residuos de unión de la Put (Trp<sup>19</sup>, Gln<sup>64</sup>, Tyr<sup>73</sup>, Asp<sup>168</sup>, Thr<sup>169</sup>, Asp<sup>171</sup>, Glu<sup>203</sup>, Leu<sup>207</sup>, Asn<sup>208</sup>, Gln<sup>209</sup>, Tyr<sup>238</sup> y Pro<sup>239</sup>) (Taylor *et al*, 2008). La secuencia tiene 99.6% de identidad comparada con la secuencia de la cepa CLBrener, con un cambio en el aminoácido 136.

```

CLBrener1  MPGSELI SGGW FREENDQ WPGQAMSLRVEKVLYDAPTKFQHLTIFESDPK 50
CLBrener2  MPGSELI SGGW FREENDQ WPGQAMSLRVEKVLYDAPTKFQHLTIFESDPK 50
CLBrener3  MPGSELI SGGW FREENDQ WPGQAMSLRVEKVLYDAPTKFQHLTIFESDPK 50
CLBrener4  MPGSELI SGGW FREENDQ WPGQAMSLRVEKVLYDAPTKFQHLTIFESDPK 50
Ninoa      MASPGSELI SGGW FREENDQ WPGQAMSLRVEKVLYDAPTKFQHLTIFESDPK
*****
CLBrener1  GPWGTVMALDGCIOVTDYDEFVYHEVLGHTSLCSHPKPERVLIIGGGDGG 100
CLBrener2  GPWGTVMALDGCIOVTDYDEFVYHEVLGHTSLCSHPKPERVLIIGGGDGG 100
CLBrener3  GPWGTVMALDGCIOVTDYDEFVYHEVLGHTSLCSHPKPERVLIIGGGDGG 100
CLBrener4  GPWGTVMALDGCIOVTDYDEFVYHEVLGHTSLCSHPKPERVLIIGGGDGG 100
Ninoa      GPWGTVMALDGCIOVTDYDEFVYHEVLGHTSLCSHPKPERVLIIGGGDGG
*****
CLBrener1  VLREVLRHGTVEHCDLVDIDGEVMEQSKQHFPQISRSLTDP RATVRVGDG 150
CLBrener2  VLREVLRHGTVEHCDLVDIDGEVMEQSKQHFPQISRSLADPRATVRVGDG 150
CLBrener3  VLREVLRHGTVEHCDLVDIDGEVMEQSKQHFPQISRSLTDP RATVRVDDG 150
CLBrener4  VLREVLRHGTVEHCDLVDIDGEVMEQSKQHFPQISRSLTDP RATVRVEDG 150
Ninoa      VLREVLRHGTVEHCDLVDIDGEVMEQSKQHFPQISRSLTDP RATVRVGDG
*****.***.*****.***
CLBrener1  LAFVRQTPDNTYDVVVIDTTPDAGPASKLFGEAFYKDVLRILKPDGICCN 200
CLBrener2  LAFVRQTPDNTYDVVVIDTTPDAGPASKLFGEAFYKDVLRILKPDGICCN 200
CLBrener3  LAFVRQTPDNTYDVVVIDTTPDAGPASELFGAEFYKHLRILKPDGICCN 200
CLBrener4  LAFVRQTPDNTYDVVVIDTTPDAGPASELFGAEFYKHLRILKPDGICCN 200
Ninoa      LAFVRQTPDNTYDVVVIDTTPDAGPASELFGAEFYKDVLRILKPDGICCN
*****.***.*****.*****
CLBrener1  QGESIWLNLLELIERMSRFIRETGFASVQYALMHVPTYPCGSI GTLVCSKK 250
CLBrener2  QGESIWLNLLELIEKMSRFIRETGFASVQYALMHVPTYPCGSI GTLVCSKK 250
CLBrener3  QGESIWLNLLELIEKMSRFIRETGFASVQYALMHVPTYPCGSI GTLICSKK 250
CLBrener4  QGESIWLNLLELIEKMSRFIRETGFASVQYALMHVPTYPCGSI GTLICSKK 250
Ninoa      QGESIWLNLLELIEKMSRFIRETGFASVQYALMHVPTYPCGSI GTLVCSKK
*****.*:***.*****.*****.*****
CLBrener1  AGVDVTKPLRPVEDMPFAKDLKYYDSEMHKASFALPRFARHINNSE- 296
CLBrener2  AGVDVTKPLRPVEDMPFAKDLKYYDSEMHKASFALPRFARHINNSE- 296
CLBrener3  AGVDVTKPLRPVEDMPFAKDLKYYDSEMHKASFALPRFARHINNSE- 296
CLBrener4  AGVDVTKPLRPVEDMPFAKDLKYYDSEMHKASFALPRFARHINNSE- 296
Ninoa      AGVDVTKPLRPVEDMPFAKDLKYYDSEMHKASFALPRFARHINNSE-
*****

```

Figura 20. Alineamiento de las secuencias de SpdS. La secuencia que se obtuvo muestra un 99.6% de identidad comparada con las 4 secuencias de aminoácidos reportadas para los 4 tipos de cepa CL Brener. Se conservaron los sitios de unión a la Put (magenta), los sitios de interacción con el dAdoMet (azul). Solo se encontró un cambio o mutación (rojo).

## 7.5 Clonación, expresión y purificación de las proteínas recombinantes.

Los genes se subclonaron en el vector pET28 a (+) los cuales se utilizaron para transformar células de *E. coli* BL21(DE3). Se indujo la sobreexpresión de las proteínas como se describió en la metodología. Las clonas que sobreexpresaron las proteínas se identificaron sometiendo muestras de cultivos a electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes (Fig. 21).

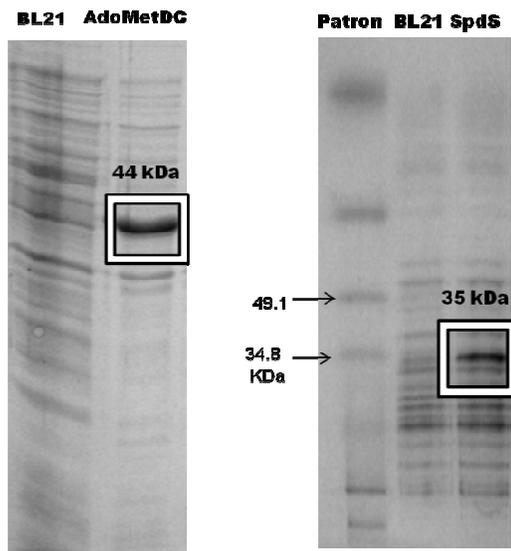


Figura 21. Las bandas de las clonas que sobre-expresan al gen de la enzima AdoMetDC (izquierda) y al gen de la SpdS (derecha) presentan el tamaño esperado incluyendo las colas de histidina. Ambas bandas se compararon con el patrón de bandas de las células BL21(DE3) y un marcador para proteínas de tamaño conocido.

Para determinar si las proteínas se expresaban de manera soluble o insoluble, las clonas que sobre-expresaron las proteínas de interés se cultivaron en mayor volumen y se indujo la expresión de las proteínas. Se cosecharon las células, se lisaron y los extractos se centrifugaron y se separaron las fracciones soluble (sobrenadante) e insoluble (precipitado) y se contrastaron con las mismas fracciones celulares obtenidas de células *E. coli* BL21(DE3) sin inducir. En la Fig. 22 se puede observar que la SpdS se sobreexpresa principalmente en el sobrenadante mientras que la AdoMetDC se sobre-expresa en mayor proporción en la fracción insoluble; sin embargo, la cantidad de proteína presente en la fracción soluble fue suficiente para purificarla.

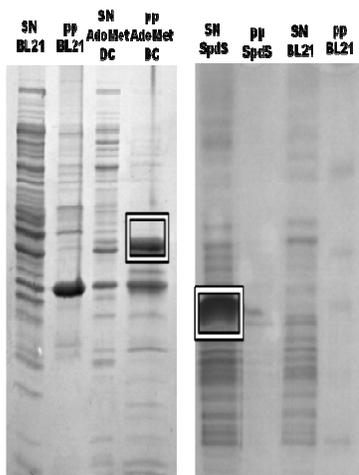


Figura 22. Clonas. de AdoMetDC y SpdS que sobre-expresan en la fracción insoluble y soluble respectivamente en un medio LB inducido con 0.4 mM de IPTG a 25°C/on.

Debido a que la sobre-expresión con el pET28 adiciona una etiqueta de seis histidinas en el extremo amino terminal de las proteínas, éstas se purificaron por cromatografía de afinidad a cobalto. La Fig 23 muestra la marcha de purificación de estas proteínas.

La AdoMetDC se expresa como una proenzima inactiva la cual lleva a cabo un mecanismo de auto-procesamiento donde la Ser<sup>68</sup> reacciona con el Glu<sup>67</sup> presentes en su estructura para formar dos subunidades (denominadas alfa y beta), así como un grupo piruvoil, el cual permite la unión del sustrato AdoMet. En la Fig. 23 se pueden observar dos bandas que corresponden a las dos subunidades de la enzima activa, cuyas masas molecular son de 32 y 10 KDa aproximadamente para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente. En la fracción del precipitado se puede observar la proteína sin procesar con un tamaño de 42 KDa. En lo que respecta a la SpdS esta cuenta con un tamaño de 33 KDa.

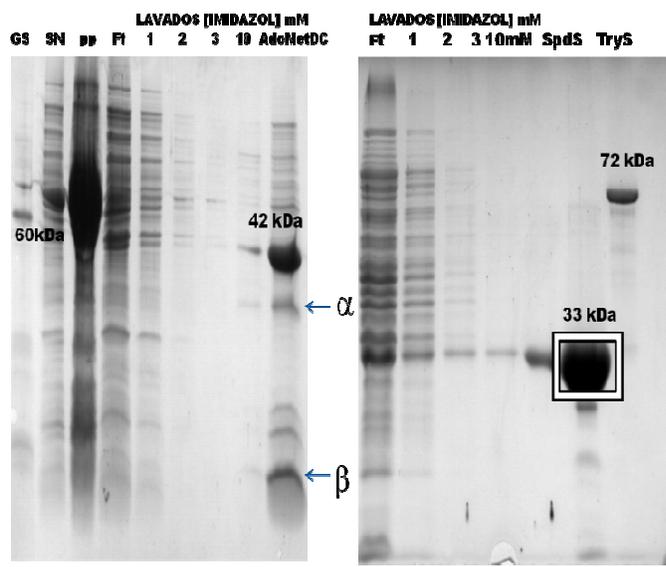


Figura 23. Marcha de purificación de la AdoMetDC (panel izquierdo) y SpdS (panel derecho). En la imagen podemos observar la fracción que no se unió a la columna (Ft), tres lavados con buffer con 2 mM imidazol, un lavado con buffer con 10 mM de imidazol y la elución de la proteína con buffer con 100 mM de imidazol. Se utilizaron las proteínas GS (60 KDa) y TryS (72 KDa) como marcadores de peso molecular.

Las proteínas se obtuvieron con una pureza mayor al 80% y se obtuvieron de 5 - 10 mg de AdoMetDC a partir de 500 mL de medio de cultivo y de 20-30 mg de SpdS por cada 250 mL de medio de cultivo. Ambas enzimas purificadas se conservaron en glicerol al 50% a -20 °C por 15 días máximo para el caso de la SpdS y de 3 días para la AdoMetDC ya que esta enzima pierde hasta el 80 a 90% de su actividad si se almacena por tiempos mayores.

## 7.6 Caracterización cinética de AdoMetDC y SpdS por espectrofotometría.

En un inicio se intentó determinar la actividad específica de la SpdS y la AdoMetDC acoplándolas a la síntesis de dAdoMet y T(SH)<sub>2</sub> con un exceso de AdoMetDC y de CfTryS y monitoreando la producción de ADP con un sistema acoplante (ver metodología). Sin embargo, este método no nos permitió medir la actividad específica de dichas enzimas ya que el sistema reconstituido presentaba reacciones inespecíficas de la TryS con Put y AdoMet, siendo la reacción más significativa con el AdoMet (Fig. 24). Por esta razón fue necesario realizar en paralelo otra reacción que trazará una línea basal que representara todas y cada una de las reacciones inespecíficas del sistema, misma que se restaría a la pendiente obtenida de la actividad de la SpdS. La reacción basal contenía todos y cada uno de los sustratos y enzimas del sistema a excepción de la AdoMetDC. Sin embargo a pesar de esta reacción control no se pudo detectar una actividad que pudiera adjudicarse a las proteínas de interés.

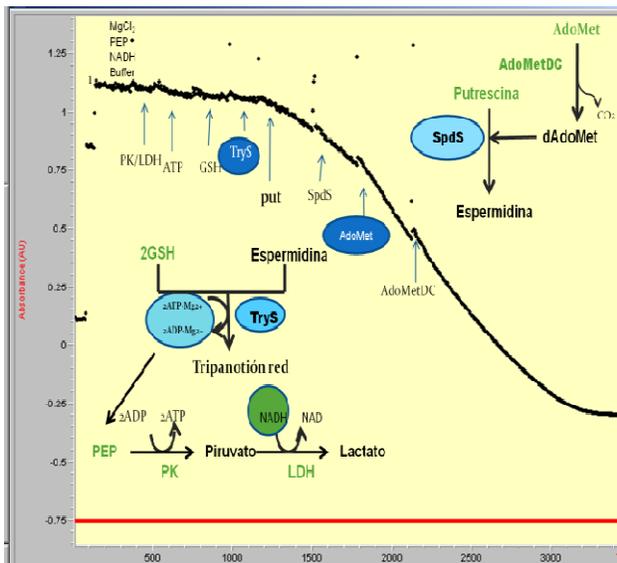


Fig. 24. Determinación de la actividad de AdoMetDC y SpdS por espectrofotometría. Los cambios de pendiente observados con la adición de Put, SpdS y AdoMet representan las reacciones inespecíficas entre estos y la TryS y no la actividad de las enzimas de interés. Con la adición de AdoMetDC se inicia la reacción sin registrarse un cambio notorio de la pendiente de esta reacción lo cual es indicativo de la falta de actividad de la AdoMetDC y la SpdS.

Para resolver los problemas de la medición se realizaron variaciones en la técnica las cuales se enlistan a continuación:

1. Se cambió el orden de adición de los sustratos y enzimas con la finalidad de asegurarse que se estaba llevando a cabo la formación del compuesto donador de los grupos propilamino a la Put para la síntesis de Spd.
2. Se emplearon concentraciones de Put de 2 y 20 mM. Se decidió disminuir su concentración para disminuir la reacción inespecífica que tiene con la tripanotión sintetasa.
3. Se emplearon diferentes volúmenes de reacción (0.5 y 1 mL) con la finalidad de tener más concentrada las enzimas en el medio de reacción sin variar las concentraciones empleadas para cada sustrato o enzima.
4. También se intentó usar distintas concentraciones de las enzimas del sistema acoplante (AdoMetDC, CfTRyS, SpdS).
5. Medir la actividad con las enzimas recién purificadas ya que se llegó a pensar que las enzimas podrían inactivarse durante su conservación en glicerol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y
6. Por último se decidió guardarlas en diferentes conservadores como: glicerol al 50%, trehalosa 0.5 mM y sulfato de amonio 3.2 mM, y temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $4^{\circ}\text{C}$  pensando en lograr su mejor estabilidad.

Aún con todas estas variaciones, no se logró observar la actividad de la AdoMetDC ni de la SpdS y se consideró que la AdometDC y/o la SpdS pudieran estar inactivas. Por lo tanto se decidió determinar en primer lugar a la AdoMetDC monitoreando por cromatografía de gases el  $\text{CO}_2$  que se libera durante la reacción de descarboxilación.

### **7.7 Caracterización cinética de la AdoMetDC por cromatografía de gases**

Los ensayos por este método se realizaron en condiciones cercanas a las fisiológicas (pH 7.4 y  $37^{\circ}\text{C}$ ) reconstituyendo la vía de síntesis de dAdoMet en frascos viales sellados herméticamente con la finalidad de atrapar el  $\text{CO}_2$  liberado durante la reacción. La reacción se incubó en buffer de 40 mM HEPES pH 7.4 a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  y se tomaron muestras del gas atrapado

cada 0,1.5, 3, 5, 15 y 20 minutos; sin embargo no se lograron obtener diferencias en la cantidad de CO<sub>2</sub> producido a través del tiempo o al incrementar la cantidad de proteína (Fig. 25) por lo que se pensó que el CO<sub>2</sub> liberado podría estarse solubilizando en el medio acuoso a este pH.

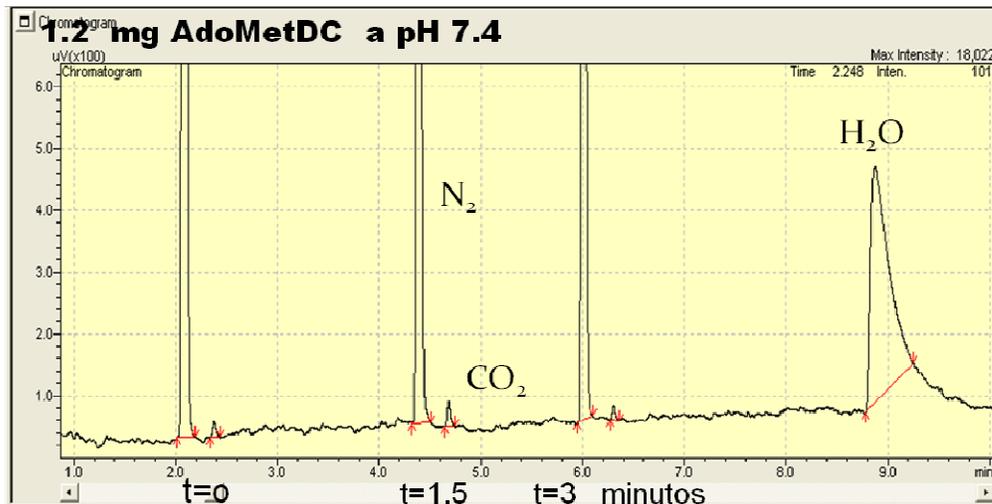


Figura 25. Cromatograma representativo de la actividad de AdoMetDC a pH 7.4 donde se puede observar la falta en la definición de las áreas bajo la curva de los picos correspondientes al CO<sub>2</sub> producto de la reacción.

Basándose en los valores de pKa del ácido carbónico (6.35 y 10.33), se decidió realizar los ensayos en buffer 10 mM MOPS pH 6.5 a 37 °C con lo cual se lograron observar cambios significativos en la cantidad de CO<sub>2</sub> liberado que eran dependientes del tiempo y de la cantidad de proteína (Fig. 26).

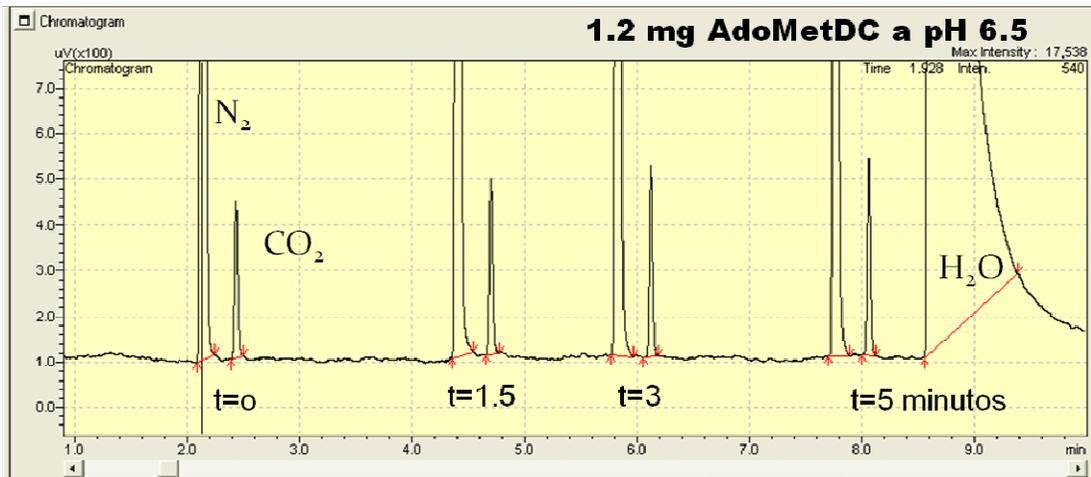
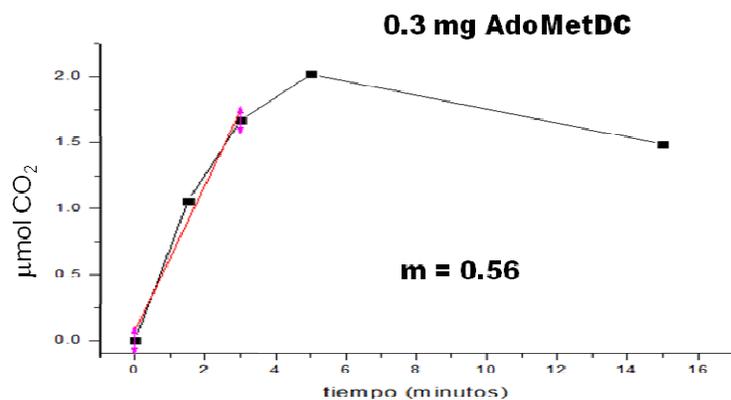
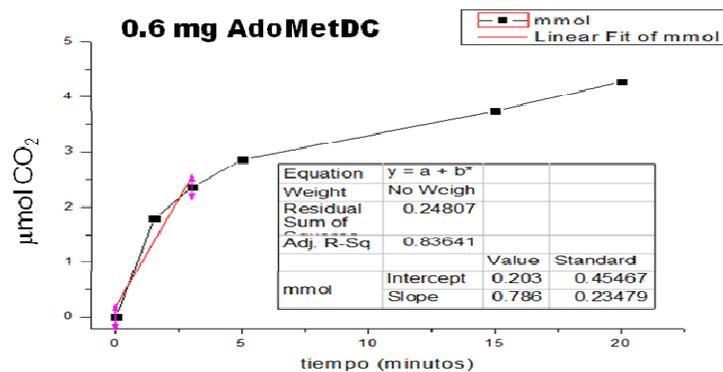


Figura 26. Cromatograma representativo obtenido de la actividad de AdoMetDC a pH 6.5 donde se puede observar los picos mejor definidos correspondientes al  $\text{CO}_2$  producto de la reacción.

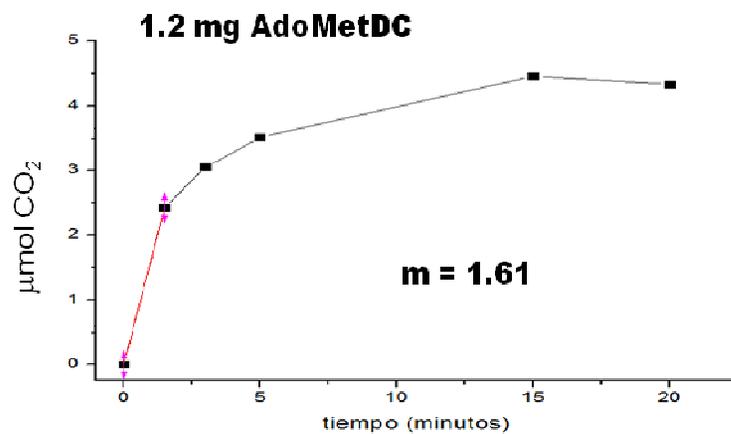
Siguiendo este nuevo protocolo de medición de la actividad enzimática y haciendo los cálculos de producción de  $\text{CO}_2$  descritos en la metodología se construyeron las gráficas de  $\text{CO}_2$  producidos por la AdoMetDC con respecto al tiempo utilizando diferentes concentraciones de enzima purificada (Fig 27).



Actividad específica= 1.85 μmol/min/mg<sub>prot</sub>



Actividad específica= 1.31 μmol/min/mg<sub>prot</sub>



Actividad específica= 1.34 μmol/min/mg<sub>prot</sub>

Figura 27. Cinética temporal de la producción de CO<sub>2</sub> a distintas concentraciones de AdoMetDC

De las gráficas de la Fig. 27 se determinaron los valores de velocidad inicial de la reacción que corresponden a la pendiente de la parte lineal de cada una de las curvas. Estos datos se graficaron contra la concentración de proteína para determinar que la actividad fuera lineal con respecto a la cantidad de proteína en el ensayo enzimático (Fig. 28).

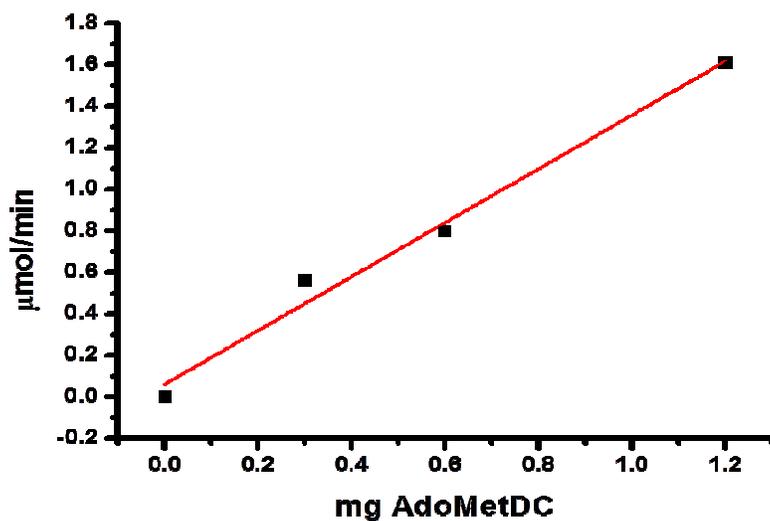


Fig. 28 Gráfica que muestra la linealidad de la actividad al variar la cantidad de la AdoMetDC presente en el ensayo.

A partir de la pendiente de la gráfica anterior se calculó la actividad específica promedio de la AdoMetDC, la cual fue de  $1.3 \mu\text{moles}/\text{min} \cdot \text{mg}$  de proteína; esta gráfica también demuestra que la actividad obtenida en cada caso, es proporcional en un amplio intervalo de cantidad de proteína.

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

En este trabajo de tesis se lograron clonar los genes que codifican para la AdoMetDC y SpdS de *Trypanosoma cruzi*. La identidad de la secuencia de aminoácidos de la AdometDC y SpdS es de 99.5% y 99.6%, comparadas con las secuencias respectivas reportadas para la cepa CL Brener.

Las proteínas se sobre-expresaron y se purificaron con altos grados de pureza (mayor al 80%) en ambos casos con rendimientos de 5-10 mg para la AdometDC y de 20-30 mg de SpdS. La AdometDC recombinante obtenida en este trabajo, fue capaz de llevar a cabo los mecanismos de auto-procesamiento, para dar como producto una enzima activa de 42 kDa (32 kDa para la subunidad  $\alpha$  y 10 kDa para la subunidad  $\beta$ ).

A pesar de todos los ensayos que se realizaron para determinar la actividad específica de la AdoMetDC recombinante por el método espectrofotométrico, la cuantificación por cromatografía de gases fue el que nos permitió determinar una actividad específica de la proteína de 1.3 U/mg de proteína a un pH de 6.5/37°C. El valor reportado por Kinch et al, (1999) de actividad de AdoMetDC recombinante fue de 0.045 U/mg de proteína a pH 8.0 y 37°C. Dicha caracterización de la enzima se realizó empleando concentraciones de AdoMet marcada con  $^{14}\text{C}$  y monitoreando la liberación de  $\text{CO}_2$  radiactivo. Se utilizaron concentraciones del sustrato radiactivo de 0.0045 a 0.3 mM mientras que el valor reportado para la  $K_m$  por ese mismo grupo fue de  $0.11 \pm 0.033$  mM por lo tanto el valor de actividad específica no se obtuvo en concentraciones saturantes de su sustrato por lo que podrían haber subestimado la actividad específica. En este trabajo de tesis se utilizó una concentración de AdoMet de 1.1 mM lo que podría explicar la diferencia de 29 veces en la actividad de las enzimas. Además se utilizaron las mismas concentraciones del activador Put (20 mM). Otra posibilidad es que el dato que obtuve se encuentre sobreestimado ya que solamente se realizó una vez. Por lo tanto se requieren hacer más determinaciones para confirmar el valor de velocidad.

Otro de los objetivos de este trabajo fue caracterizar la AdoMetDC bajo condiciones cercanas a las fisiológicas (pH 7.4/37°C) ya que nuestro laboratorio está interesado en construir un modelo cinético-matemático del metabolismo de las poliaminas y del T(SH)<sub>2</sub> en *T. cruzi*, para lo cual debido a que hay muy pocos datos para la enzimas de este parásito, se requiere caracterizar a todas las enzimas en condiciones cercanas a las fisiológicas. Debido a la incompatibilidad del método para determinar la actividad a pH 7.4 por la alta solubilidad del CO<sub>2</sub> a este pH, únicamente fue posible determinarla a pH 6.5 a 37°C. Sin embargo, el haber podido establecer una metodología para determinar la actividad de esta enzima en nuestro laboratorio abre la posibilidad de caracterizarla cinéticamente para obtener sus parámetros cinéticos. Tal vez sea necesario que se realice la clonación, sobreexpresión y purificación de la pro-enzima de AdoMetDC ya que este es un mejor activador que la Put. Datos reportados por Willert *et al.*, 2007 indican que el heterodímero formado por la AdoMetDC y la proenzima es catalíticamente funcional y su capacidad catalítica (*k<sub>cat</sub>*) incrementa 1200 veces más que el monómero de la AdoMetDC (35 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> para la AdoMetDC sin la proenzima con 5 mM de putrescina como activador mientras que la del heterodímero es de 1.1 x 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> empleando la misma concentración de Put).

Por otro lado, hasta el momento solamente se ha caracterizado la SpdS de *T. brucei* (Taylor et al, 2008). A pesar de que en este trabajo de tesis se obtuvo la enzima recombinante en alta cantidad y estado de pureza, no fue posible obtener un valor de su actividad específica debido a que no se vende comercialmente su sustrato. Por lo tanto se requiere obtener la AdoMetDC con una alta actividad para sintetizar el sustrato de la SpdS (dAdoMet) en la mezcla de reacción. Una vez confirmada que la AdoMetDC que obtuve es activa se puede utilizar para medir la actividad de la SpdS. Sin embargo, cabe la posibilidad que se requiera utilizar gran cantidad de AdoMetDC en el ensayo para que se pueda sintetizar de manera rápida la dAdoMet de tal manera que la SpdS pueda catalizar la reacción y poder medir la formación de Spd por HPLC. Por lo tanto, todavía hace falta una mayor caracterización cinética de la AdoMetDC para utilizarla como sistema acoplante para medir la actividad de la

SpdS. Hasta ahora existe muy poca información sobre la SpdS en tripanosomátidos, la mayoría de los estudios de esta enzima se han hecho en plantas por lo que urge la necesidad de encontrar nuevas metodologías para poder caracterizarla en estos microorganismos ya que esta enzima no solo se encuentra implicada en la síntesis del T(SH)<sub>2</sub> sino es precursora de otras poliaminas como la espermina lo que contribuiría al estudio de la caracterización de estas y del papel que desempeñan en *T.cruzi*

La caracterización de estas dos enzimas recombinantes también es determinante para establecer una técnica que permita determinar las actividades enzimáticas en epimastigotes de *T.cruzi*. La determinación de los datos de los parámetros de afinidad por los sustratos y actividad de las enzimas en los parásitos se utilizarán para actualizar el modelo del metabolismo del T(SH)<sub>2</sub> el cual se está desarrollando en el laboratorio. Con el modelo se puede evaluar la importancia de la vía de síntesis de novo de Spd (AdoMetDC y SpdS) para la síntesis del T(SH)<sub>2</sub> esencial para el parásito. Así mismo, nos podría permitir evaluar si la AdoMetDC o la SpdS también pueden considerarse como blancos terapéuticos para interferir el metabolismo del T(SH)<sub>2</sub> del parásito tal como se obtuvo para la  $\gamma$ ECS y TryS obtenidos por el modelado metabólico (Olin-Sandoval, et al 2012). Al respecto, la secuencia de aminoácidos de la AdoMetDC de *T. cruzi* cuenta con un 68-72% de identidad con aquellas de *T.brucei* y *Leishmania donovani*, ambos parásitos tripanosomátidos y solamente tiene un 25% de identidad con la AdoMetDC humana (Persson, 1998) por lo que esclarecer los parámetros cinéticos de esta enzima y su diferencias con las del humano podría ser de gran ayuda para establecer una mejor terapéutica contra la enfermedad de Chagas.

La obtención de estas dos enzimas dentro del laboratorio deja un campo abierto para poder realizar otros protocolos de investigación no solo en torno a su caracterización sino también en su estructura que permitan esclarecer muchas de las dudas que hasta hoy día se tienen en torno a ellas.

## 9. CONCLUSIONES.

La AdoMetDC y la SpdS pueden ser enzimas de vital importancia para el aporte de Spd celular además de la que proviene del transporte de Spd extracelular .

A pesar de que no se pudo completar la caracterización cinética de la AdoMetDC, en esta tesis se logró desarrollar un protocolo para su obtención en forma recombinante y para medir su actividad enzimática.

De acuerdo al análisis de los datos cinéticos reportados en la literatura, la vía de síntesis *de novo* de poliaminas constituida por la AdoMetDC y la SpdS podría contribuir de manera importante al control de la síntesis de T(SH)<sub>2</sub> en los parásitos debido a la poca eficiencia catalítica que tienen estas enzimas. Por lo tanto es relevante continuar con los avances hasta ahora obtenidos para caracterizar a estas enzimas de *T.cruzi* ya que pueden ser posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

## 10. PERSPECTIVAS

La baja actividad específica de la AdoMetDC indica que es necesario obtener a su proenzima para poder incrementar su actividad, lo que facilitará su caracterización cinética y a su vez nos permitirá utilizarla para caracterizar cinéticamente a la SpdS.

La caracterización de estas enzimas abre un amplio campo de investigación para contestar las preguntas que se tienen en torno a la vía de síntesis de poliaminas:

-¿Quién aporta más Spd en el parásito, los transportadores o la síntesis *de novo*?

-¿Bajo qué condiciones el parásito demanda más Spd?

-Si los transportadores son altamente eficientes ¿Por qué o para qué se encuentra presente la vía de síntesis *de novo* de Spd?

-¿Qué control tiene la AdoMetDC y la SpdS sobre el flujo de la vía del metabolismo del tripanotión en *T.cruzi*?

## 11. BIBLIOGRAFÍA.

- Andey SP, Anade SAR, Agar PKN, Nikhil K (2000) Role of polyamines an ethylene as modulator of plant senescence. *J Bio Sci.* 25(3):291-299.
- Ariyanayagam MR, Fairlamb AH (2001) Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 115(2):189-98.
- Ariyanayagam MR, Oza SL, Mehlert A, Fairlamb AH (2003) Bis(glutathionyl)spermine and other novel trypanothione analogues in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 278(30):27612-9.
- Barret MP, Burchmore RJS, Stich A, Lazzar, Frash AC, Cazzulo JJ y Krishna S (2003) The trypanosomiasis. *The Lancet* 362: 1469-1480.
- Becerril FMA, Romero CR (2004) *Parasitología Médica de las moléculas a la enfermedad*. Mc Graw-Hill/Interamericana. México: pp 301.
- Bitonti AJ, Kelly SE, McCann PP (1984) Characterization of spermidine synthase from *Trypanosome brucei brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 13(1):21-28.
- Castro JA, Diaz de T E (1988) Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas disease). *Biomed Environ Sci.* 1(1): 19-33.
- Cohen SS (1998) *A guide to the polyamines*. Oxford University Press, New York.
- Coura JR (2009) Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Institute. Oswaldo Cruz.* 104(4):549-554
- Coura JR, Albajar VP (2010) Chagas disease a new worldwide challenge. *Nature.* 465: S6-S7.
- Coura JR, Junqueira A (2012) Risk o endemicity, morbiliti and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon region. *Memories Institute Oswaldo Cruz.* 107(2):145-15.
- De Souza W (2002) From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biology and Disease* 1(3): 1-21.
- Dumonteil, E. (1999) Update on Chagas disease in México. *Salud pública de México.* 41(4):322-327.
- Feuerstein BG, Pattabiraman y Marton LJ (1986) Spermine –DNA interactions: a theoretical study. *Journal List/ Proc Natl Acad Sci USA.* 83(16): 5948-5952.
- Gascon J, Albajar P, Cañas E, Flores M, Gómez PJ, Herrera RN, Lafuente CA, Luciardí HL, Moncayo A, Molina L, Muñoz J, Puente S, Sanz J, Treviño B y

Salles XS (2007) Diagnóstico ,manejo y tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica en áreas donde la infección por *Trypanosoma cruzi* no es endémica. *Rev Esp Cardiol.* 60(3):285-293.

- Guzman ME, Zavala CJE ,Acosta VKY, Rosado BME (1999) Importancia de la caracterización de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Biom* 177-184.

- Hampel KJ,Crosson P, Lee JS (1991) Polyamines favor DNA triplex formation at neutral pH. *Biochemistry.* 30(18): 4455-4459.

- Hansberg W(2002) Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico.* Facultad de medicina de la UNAM. Vol. XXVI.

- Heby O, Persson L (1990) Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci.* 15:153-158.

- Heby O, Persson L, Rentala M. Targeting (2007) The polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas disease, and leishmaniasis. *Amino Acids.* 33: 359-365.

- Hotez P, et al, (2006) Incorporating a rapid impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis and malaria. *PLoS Med.* 3:102.

- Imbert PJJ, Figuero GAH, Gomez GJV (2003) Tripanosomiasis americana o mal de Chagas. Otra enfermedad de la pobreza. *Ciencia y Cultura Elementos.* 49(10): 13.

- Janne J, Alhonen L, Leinonen P (1991) Polyamines: from molecular biological to clinical applications. *Ann Med* 23(3): 241-259.

-Kinch LN,Scott JR, Ullman B, Phillips MA (1999) Cloning and kinetic characterization of the *Trypanosoma cruzi* S-adenosylmethionine decarboxylase.*Molecular Biochemical Parasitology.* 101: 1-11.

-Korolev S, Ikeguchi Y, Skarina T, Beasley S, Arrowsmith C, Edwards A, Joachimiak A, Pegg AE, Savchenko A. (2002) The crystal structure of spermidine synthase with a multisubstrate adduct inhibitor. *Nat. Struct. Biol.* ;9:27–31.

-Krauth-S R, Comini MA Redox (2008) Control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism.*Biochim Biophys Acta.* 1780(11):1236-48.

- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y (2008) Polyamines:essential factors for growth and survival. *Biomedical and life sciences* 228(3): 367-381.

- López-Contreras AJ (2008). Caracterización de ODCp como una nueva proteína inhibidora atizimas (AZ1N2). Aspectos estructurales y funcionales. Dialnet,2008.

- Lovaas E (1997) Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. *Adv Pharmacol.* 38:119-149.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) *J. Biol. Chem.* 193(1): 265-275.
- Mandell GL, Bennett EJ, y Dolín R (2002) *Especies de Trypanosoma (tripanosomiasis Americana, enfermedad de Chagas): biología de los tripanosomas en enfermedades infecciosas: principios y práctica.* Edt. Médica Panamericana 5ª ed. Buenos Aires, Argentina vol. 11:3436-3446.
- Matthews, H.R., (1993). Polyamines, chromatin structure and transcription. *BioEssays*, 15: 561-567.
- Martins-MFR, Alencar CH, Ramos Jr AN, Heukelbach J (2012) Epidemiology of mortality related to Chagas disease in Brazil, 1999-2007. *PLoS Neglect Trop Dis* 6(2)E1508.
- Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-VP, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A (2007) Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 146(4):601-20.
- Maya JD, Orellana M, Ferreira J, Kemmerling U, López-Muñoz R, Morello A (2010) La enfermedad de Chagas: estado actual de los mecanismos patogénicos y la quimioterapia. *Biol.Res.* 43(3):323-331.
- Moran UY, López MA, Ramos LA (2010) *Trypanosoma cruzi* y endotelio ¿paraíso o campo de batalla?. *La ciencia y el hombre Volumen XXII (3) I:* 9-24.
- Nasizadeh S, Persson L (2003) Extremely rapid turnover of S-adenosylmethionine Decarboxylase in *Crithidia fasciculata*. *FEBS.* 553(1-2):131-134.
- Olín-SV, Moreno SR, Saavedra E (2010). Targeting Trypanothione Metabolism in Trypanosomatid Human Parasites. *Current Drug Targets.* 11:1-17.
- Olin-SV, González Ch Z, Berzunza CM, Martínez I, Jasso ChR, Becker I, Espinoza B, Moreno-SR, Saavedra E (2012). Drug target validation of the trypanothione pathway enzymes through metabolic modelling. *FEBS J.*;279(10):1811-1833.
- Ouameur AA, Bourassa P, Riahi H (2010) Probing tRNA interaction with biogenic polyamine. *ARN.* 16(10): 1968-1979.
- Persson K, Aslund L, Grahn B, Hanke J y Heby O (1998) *Trypanosoma cruzi* has not lost its S-adenosylmethionine Decarboxylase: characterization of the gene and the encoded enzyme. *Biochem J.* 333:527-537.

- Prata A (1995) Tripanosomiasis Americana Enfermedad de Chagas. Parasitología y Medicina Tropical. 346-359.
- Prata A (2001) Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. The Lancet Infectious Disease Vol1 (2) :92-100.
- Reguera RM, Redondo CM, Pertejo PY, Balaña FR. (2007) S-Adenosylmethionine in protozoan parasites: Functions, synthesis and regulation. Molecular and Biochemical Parasitology 152: 1-10.
- Rodrigues CJ, L de Castro S (2002) A critical review on Chagas Disease Chemoterapy. Mem Inst. Oswaldo Cruz. 97(1): 3-24.
- Rosa R, Basmadjian R, González MM, Gonzalez AM, Salvatello (2001). Actualización clínico-epidemiológica y terapéutica de la enfermedad de Chagas en Uruguay. Revista Médica Uruguay 17: 125-132.
- Saavedra E, Marín HA, Encalada R, Olivos A, Mendoza HG, Moreno SR (2007) Kinetic modeling can describe in vivo glycolysis in Entamoeba histolytica. FEBS J. 274(18):4922-40.
- Seiler N, Delcros JG, Moulinoux JP (1996) Polyamine transport in mammalian cells Int. J. Biochem Cell Bio 28(8): 843-861.
- Shridhar B, Steven E (2010) Structural Biology of S-Adenosylmethionine Decarboxylase. Amino Acids. 38(2): 451-460.
- Sierra JJ, Oliver MA, Monteon PVM, Reyes P y Vallejo M (2005) Panorama epidemiológico y clínico de la cardiopatía chagásica crónica en México. Revista de Salud Pública 39(5):754 -760.
- Spothem MM, Ruiz S, Sabat TR, M C (1995) Radioprotection of DNA by polyamines. Int.J Radiant. 68(5): 571-577.
- Stuart K, Brun R, Croft, *et al* (2008) Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. J. Clin Invest. 1:118(4):1301-1310.
- Tabor CW and Tabor H (1984) Polyamines. Rev Bio Chem. 53:749-790.
- Tay Z, Velasco C, Lara A, Gutiérrez Q (2002) Parasitología Médica. Mendez editores. 121-146.
- Taylor MC, Kaur H, Blessingto BJM and Wilkinson SR. (2008) Validation of spermidine synthase as a drug target in African trypanosomes. Biochemical Journal 409 (2): 563-569.
- Teixeira AR, Nascimento RJ y Sturm NR. (2006) Evolution and pathology in Chagas disease a Review. Memorias Instituto Oswaldo Cruz. 101(5): 463-491.

- Thomas, T. and Thomas, T. J. (2001) Polyamines in cell growth and cell death molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol .Life Sci.* 58(2): 244-258.
- Vierstracte,A (1999) Principle of the PCR. Documento Web <http://users.ugent.be/avierstr/principles/pcr.html>.
- Watanabe S,Kusama EK,Kobayashi H,Igarashi K (1991) Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in b ovine lymphocytes and rat liver. *J.Biol. Chem.* 266:20803-20809.
- Willert EK, Fitzpatrick R, Phillips MA (2007) Allosteric regulation of an essential trypanosome polyamine biosynthetic enzyme by catalytically dead homolog. *PNAS* Vol.104 No. 20: 8275-8280.
- World Health Organization (2002) Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series 905 Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (2007) Reporte sobre la enfermedad de Chagas. World Health Organization on behalf of the special program for research and training in tropical diseases 1-96.
- Wu H, Min J, Zeng H, McCloskey DE, Ikeguchi Y, Loppnau P, Michael AJ, Pegg AE, Plotnikov AN. (2008) Crystal structure of human spermine synthase: implications of substrate binding and catalytic mechanism. *J Biol Chem.* 283(23):16135-46.