



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

SÍNTESIS DE ACETATO EN *Entamoeba histolytica*

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

CITLALI VÁZQUEZ MARTÍNEZ

MEXICO, D.F. A AÑO 2014.





Universidad Nacional
Autónoma de México



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: **Profesor: Abel Gutiérrez Ramos**
VOCAL: **Profesor: J. Eleazar Martínez Barajas**
SECRETARIO: **Profesor: Emma Cecilia Saavedra Lira**
1er. SUPLENTE: **Profesor: Beatriz Ruiz Villafan**
2° SUPLENTE: **Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHAVEZ.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA _____.

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.A. ERIKA PINEDA RAMÍREZ _____.

SUSTENTANTE:

CITLALI VÁZQUEZ MARTÍNEZ _____.

RESUMEN

Entamoeba histolytica es el agente causal de la amibiiasis humana. Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en estudiar el control del metabolismo energético en este parásito. *E. histolytica* tiene como única vía para generar ATP a la glucólisis cuyos productos finales son acetato y etanol. El acetato se produce por dos rutas, i) la acetato tiocinasa (AcTK) lo forma a partir de acetil-CoA, ADP y Pi con formación de acetato, ATP y CoA; ii) la acetato cinasa (AcK) usa como sustratos acetil-fosfato (acetil-P) y Pi para sintetizar acetato y PPI. Hasta el momento no existen reportes de alguna enzima que forme acetil-P en amiba; sin embargo, el parásito es capaz de fagocitar bacterias las cuales tienen altas concentraciones del metabolito. Al respecto, en reportes previos se observó que cultivos axénicos y monoxénicos (con bacterias) en anaerobiosis, solo se produce acetato en los últimos. Por lo tanto, los estudios de esta tesis se enfocaron a caracterizar el metabolismo del acetato en *E. histolytica*

Se clonaron los genes que codifican para la AcTK y AcK de amiba, se sobre-expresaron las proteínas en *E. coli* y purificaron las enzimas para su caracterización cinética. La AcTK posee una V_{max} en la dirección directa ($V_{max_{Fw}}$) de 15 a 22 $\mu\text{moles}/\text{min} \times \text{mg}$ de proteína en un intervalo de pH de 6-7 y valores de K_m por acetil-CoA 127 μM , ADP 0.9 mM y Pi 1.8 mM. La concentración de estos metabolitos en trofozoítos fueron de 0.09mM y 3.4mM respectivamente los cuales están por arriba del valor de la K_m , por lo que la enzima podría estar saturada por sus sustratos en este sentido de la reacción. Los valores cinéticos en la reacción reversa ($V_{max_{rev}}$) fueron: 16- 20 $\mu\text{moles}/\text{min} \times \text{mg}$ de proteína a pH 6 y 7; $K_{m_{CoA}}$ 0.2 mM, $K_{m_{ATP}}$ 0.3 mM y $K_{m_{acetato}}$ 0.8 mM. Las concentraciones de estos metabolitos en trofozoítos amibianos fueron CoA= 0.05 mM y acetato no se detectó. Esto sugiere que la reacción en este sentido estaría menos favorecida *in vivo*. En extractos citosólicos, las velocidades $V_{max_{Fw}}$ y $V_{max_{rev}}$ a pH 7.0 de la AcTK fueron similares (~ 150 nmoles/min \times mg de proteína) mientras que a pH 6.0, éstas se reducen significativamente (15 nmoles/ min \times mg de proteína).

Por otro lado, las constantes cinéticas determinadas a pH 7 y 6 de la AcK recombinante fueron $V_{max_{FW}}$ 26 y 14 $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$ de proteína; $K_{m_{\text{acetil-P}}}$ 2 y 7 μM ; $K_{m_{\text{Pi}}}$ 2.2 y 2.6mM. Se ensayó la $V_{max_{rev}}$ pero no se detectó y concuerda con reportes previos. La $V_{max_{FW}}$ en extractos citosólicos fue de 48 nmoles/min \times mg de proteína. Sin embargo, no se pudo detectar acetil-P en estas amibas axénicas. Una posible explicación de la presencia de la AcK en cultivos axénicos es que tenga sustratos alternativos o que la enzima pueda consumir el acetil-P intracelular de manera muy eficiente.

Con todo lo anterior podemos decir que la AcTK es la enzima que contribuye más a la síntesis de acetato. Resulta interesante que se detectó actividad de AcK en trofozoítos amibianos, aún cuando su sustrato no está presente o está en muy bajos niveles, lo que abre la posibilidad de que esta enzima tenga otra función en cultivos axénicos.

ABREVIATURAS

μM	micro molar.
2PG	2-fosfoglicerato.
3PG	3-fosfoglicerato.
AcCoA	Acetil-Coenzima A.
AcK	Acetato cinasa.
AcTK	Acetato tiocinasa.
ADH2	Alcohol deshidrogenasa bifuncional.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADP	Difosfato de adenosina.
AHA	Absceso hepático amibiano.
ALDO	Aldolasa.
AMP	Monofosfato de adenosina.
ARN	Ácido ribonucleico.
ATP	Trifosfato de adenosina.
BSA	Albumina de suero bovino.
CaCl_2	Cloruro de calcio.
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato.
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados.
ENO	Enolasa.
EtoH	Etanol.
F1,6BP	Fructosa 1, 6 difosfato.
F6P	Fructosa-6-fosfato.
Fw	Forward
G3P	Gliceraldehido-3-fosfato.
G6P	Glucosa-6-fosfato.
Gal	Galactosa.
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
GDP	Difosfato de guanina.
GTP	Trifosfato de guanosina.
HK	Hexocinasa.
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido.
Kpb	Kilob pares de bases
Mpb	Mega pares de bases
NAD^+	Dinucléotido de nicotinamida y adenina
NADH	Dinucléotido de nicotinamida y adenina reducido.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PEP	Fosfoenolpiruvato.
PGAM	3-fosfoglicerato mutasa.
PGI	Fosfoglucosa isomerasa.
PGK	3-fosfoglicerato cinasa.
Pi	Fosfato inorgánico.
PPDK	Piruvato fosfato dicinasa.

PPi	Pirofosfato.
PPi-PFK	Fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato.
ppm	Partes por millón.
PYR	Piruvato.
RW	Reversa.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TIM	Triosafofosfato isomerasa.

Índice

Rresumen.....	3
ABREVIATURAS.....	5
1.0 INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Historia de la amibiasis.....	9
1.1.10 Tratamiento.....	19
1.1.2 Características de la enfermedad.....	10
1.1.3 Etiología.....	10
1.1.4 Morfología del parásito.....	11
1.1.5 Ciclo Biológico.....	13
1.1.6 Patogenia.....	14
1.1.7 Epidemiología.....	15
1.1.8 Manifestaciones clínicas.....	16
1.1.9 Amibiasis extraintestinal.....	17
1.2 ANTECEDENTES DEL METABOLISMO ENERGÉTICO DE <i>E. histolytica</i>.....	20
1.2.1 GENERALIDADES DE LA GLUCÓLISIS.....	20
1.2.2 Diferencias en la glucólisis de <i>Entamoeba histolytica</i>	22
1.3 METABOLISMO DEL ACETATO EN <i>E. histolytica</i>.....	25
1.4 ACETATO TIOCINASA.....	26
1.5 ACETATO CINASA.....	26
22.0 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	28
2.1 HIPÓTESIS.....	28
2.2 OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS DE LICENCIATURA.....	29
2.3 OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
3.0 METODOLOGÍA.....	30
3.1 CLONACIÓN DEL GEN.....	31
3.1.1. <i>Diseño de los cebadores</i>	31
3.1.2. <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	31
3.1.3. <i>Purificación del fragmento por electroforesis en geles de agarosa</i>	34
3.1.4 <i>Purificación del fragmento</i>	35
3.1.5 <i>Ligación al plásmido pJET 1.2</i>	35
3.1.6 <i>Transformación de bacterias con el plásmido</i>	37
3.1.7 <i>Purificación del Plásmido</i>	38
3.2 Identificación del gen.....	39
3.3 Sobreexpresión de las enzimas en bacterias <i>E. coli</i>	40
3.3.1 <i>Ligación al vector de expresión pET28</i>	40
3.3.2 <i>Sobreexpresión de las proteínas en las bacterias</i>	42
3.3.3 <i>Selección de las clonas de sobreexpresión</i>	43
3.4 Purificación de las proteínas.....	44
3.4.1 <i>Cuantificación de proteínas</i>	46
3.5 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA.....	47

3.5.1 Ensayos enzimáticos para la AcK	47
3.5.2 Ensayos enzimáticos para la AcTK	48
3.5.3 Determinación de metabolitos y actividades enzimáticas en los parásitos	50
4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
4.1 CLONACIÓN DE LOS GENES	51
4.2 CONFIRMACIÓN DE LOS GENES POR SECUENCIACIÓN DE DNA	55
4.3 SOBREENPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN BACTERIAS	57
4.3.1 sobreexpresión de la AcTK	58
4.3.2 Sobreexpresión de la AcK	59
4.4 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS	60
4.4.1 Purificación de la AcTK	60
4.4.2 Purificación de la AcK	61
4.5 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA AcK	63
4.5.1 Dependencia de la actividad con el pH	63
4.5.2 Parámetros cinéticos	64
4.5.3 Actividad de AcK y concentración de sus sustratos en trofozoitos	68
4.6 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA ACETATO TIOCINASA (AcTK)	69
4.6.1 Dependencia de la actividad con el pH	69
4.6.2 Parámetros cinéticos	70
5.0 DISCUSIÓN GENERAL	78
6.0 Conclusiones Generales	79
7.0 PERSPECTIVA	80
8.0 REFERENCIAS	81

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1. Historia de la amibiasis

Desde principios de la humanidad se ha tenido evidencia de la existencia de *Entamoeba histolytica*. Hipócrates (460-377 AC) reconoció la amibiasis en un paciente con disentería y fiebre, a dicha enfermedad la nombró “Flujo del vientre”. Otra evidencia se dio en América durante el siglo XVI, en publicaciones de Alcalá de Henares quien documentó el fallecimiento en 1611 de Fray García Guerra, arzobispo de México y Virrey de Nueva España a causa de un cuadro caracterizado por fiebre y dolor en el área hepática (Pinilla 2008).

En 1875 Lösh describió al parásito sin establecer la relación causa-efecto con la enfermedad (Dimon S. y Graham C. 2007). En 1903 Schaudin le dió el nombre de *Entamoeba histolytica* por su capacidad de lisis de tejido y producir úlceras intestinales (Ximenez 2007). En 1982 Sargeant y Willams por medio de estudios electroforéticos de isoenzimas establecieron que existían en el intestino humano dos cepas de *E. histolytica* morfológicamente idénticas pero no se conocía su patogenicidad, al presentar bandas β en lugar de bandas α en la enzima fosfoglucomutasa (Pinilla 2008). Estudios recientes realizados con sondas de ARN y ADN han demostrado la existencia de diferencias genéticas entre cepas patógenas y no patógenas de *E. histolytica*; las segundas se han separado de las patógenas y reclasificado como *E. dispar* (Buss S. et al. 2008).

1.1.2 Características de la enfermedad

La amibiasis intestinal es el nombre con que se describe a la parasitosis humana causada por el protozoario *E. histolytica*. Los trofozoítos de esta amiba se adhieren a la pared del intestino y por la acción de sus proteasas penetran el tejido para alimentarse de los productos proteolíticos de la sangre y los tejidos. Los trofozoítos se reproducen en abundancia en el intestino y provocan la formación de abscesos que al romperse, descargan moco y sangre, lo que provoca la licuación de las heces y genera diarrea abundante por lo que la amibiasis presenta un cuadro de

disentería aguda. Los trofozoítos pueden diseminarse por la corriente sanguínea y producir abscesos en el hígado o, con menor frecuencia, en los pulmones o el cerebro (Morán P. et al. 2012). Así mismo, en su recorrido por el intestino, los trofozoítos pueden transformarse en quistes, la forma infectiva del parásito y los cuales se expulsan con las heces del hospedero,

1.1.3 Etiología

Entamoeba histolytica, el protozoo patógeno intestinal más frecuente en todo el mundo pertenece a la superclase *Rhizopoda* del subfilo *Sarcodina*. El microorganismo presenta un trofozoíto con capacidad de alimentarse y replicarse en el lumen del intestino humano. En condiciones desfavorables se transforma en un quiste latente. La infección se contrae comúnmente por la ingestión de quistes en agua o alimentos contaminados con heces fecales.

Entamoeba histolytica se consideró un microorganismo primitivo por carecer de mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico y posee un metabolismo energético similar al de las bacterias. Tiene un genoma haploide de Mpb. En el proyecto del genoma de amiba se indica que contiene 9,938 genes y un promedio de 1.17Kb, donde solo el 25% de los genes contiene intrones y una cuarta parte son múltiples (Ximenez et al. 2007).

1.1.4 Morfología del parásito

Se presenta bajo tres estadios: Una forma trofozoica de la luz intestinal conocida como forma minuta; una más capaz de invadir la mucosa intestinal y responsable de la afección causada por el parásito, que se conoce como forma tisular o como forma magna por su mayor tamaño y la forma quística tetranucleada cuando madura.

Forma minuta (Fig.1) Mide 8 - 14µm además de su tamaño pequeño, se caracteriza porque en su citoplasma se encuentran vacuolas digestivas con restos bacterianos o

de otro tipo, pero nunca eritrocitos. Tiene núcleo con cariosoma puntiforme central. Tiene una zona ectoplasmática hialina que demarca el endoplasma granuloso. **Forma tisular o magna.** Bastante mayor, desde uno 10 a 30 o más μm ; presenta el núcleo y las regiones citoplasmáticas así como la característica motilidad. Solo se distingue por presencia de eritrocitos en el endoplasma.

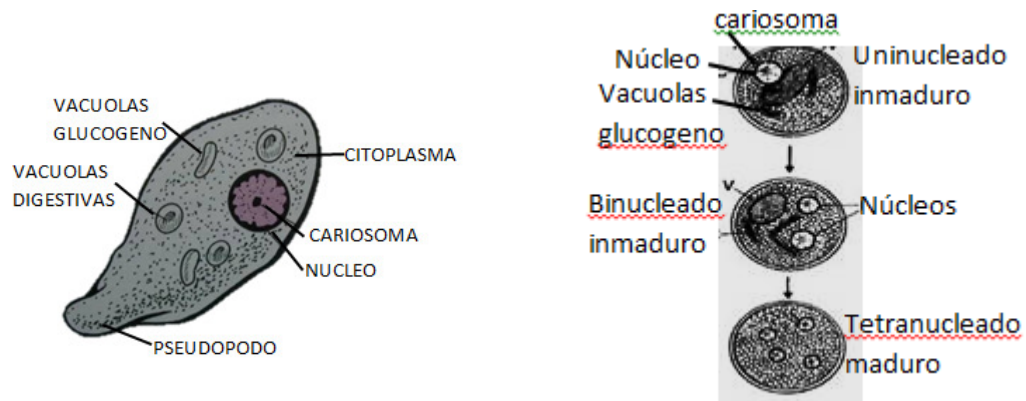


Figura 1.1 Partes del Trofozoito y la maduración del quiste

Quiste (fig1.1.). esférico y subesférico de 10 a 20 μm de diámetro y con una cubierta quística poco aparente, puede ser uninucleado o binucleado como inmaduros y típicamente tetranucleados cuando han completado su desarrollo, se pueden observar cuerpos sidéfilos o cromidiales (manual parasitología 2006).

1.1.5 Ciclo Biológico

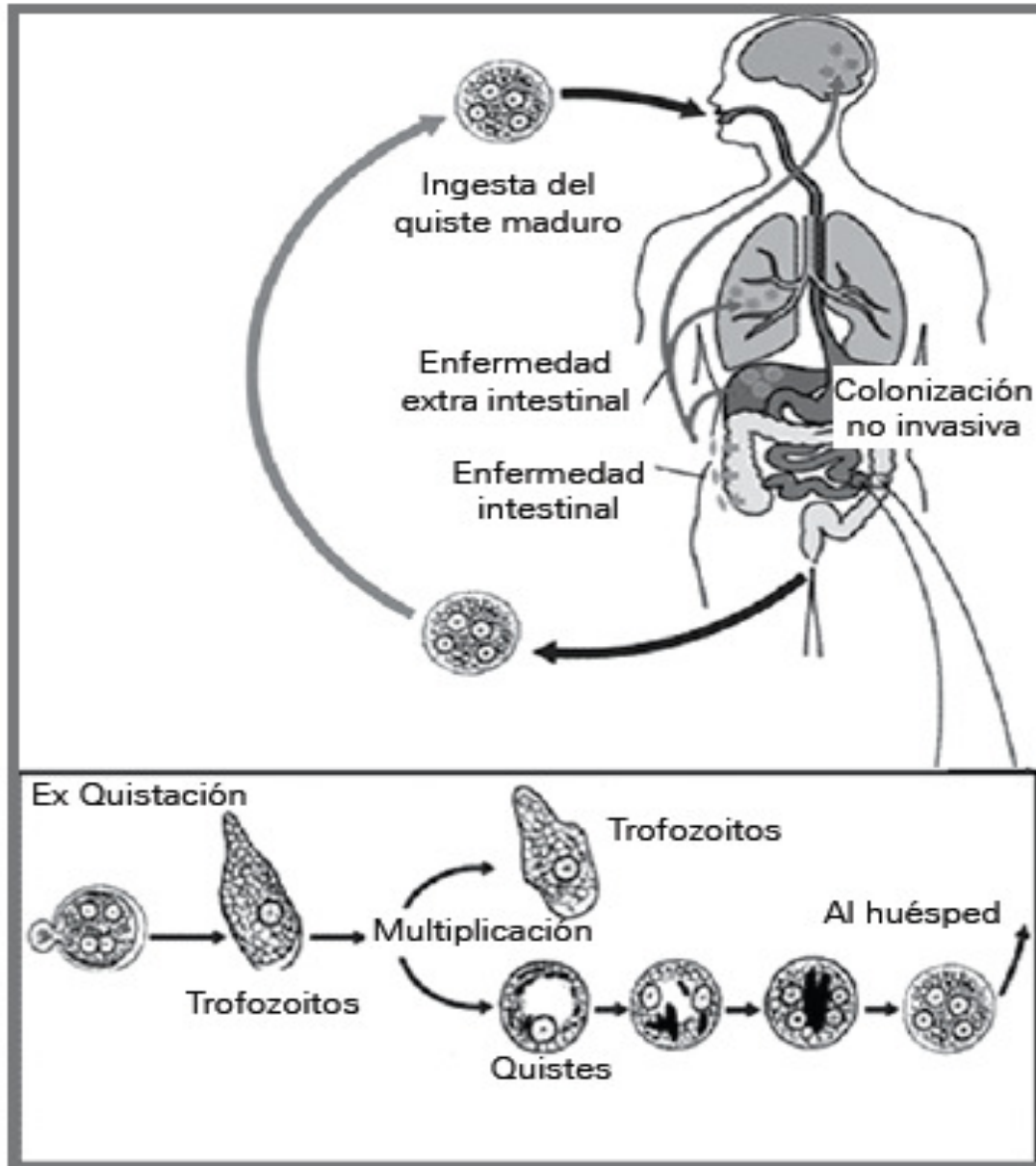


Fig.1.2 Ciclo de vida de Entamoeba histolytica.

(<http://www.dpd.cdc.gov/DPD/amibiasis>).

El contacto entre personas y la contaminación con heces fecales por manipulación de alimentos y agua; parecen ser el medio de transmisión más importante. Asimismo, se ha documentado la transmisión sexual, sobre todo entre homosexuales varones (Marshall 1997). El ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* inicia con la ingesta de quistes tetranucleados por el hospedero, estos pasan al estómago donde el ácido clorhídrico del jugo gástrico reblandece la quitina que protege a los quistes y da origen a 8 trofozoitos en el intestino delgado; en esta etapa el trofozoito se multiplica por fisión binaria. Ahí se alimentan de bacterias y restos celulares.

Estos trofozoítos pueden emigrar por vía hematogena al hígado u otros órganos, o pueden enquistarse en el intestino grueso completando el ciclo biológico (González 2012).

1.1.6 Patogenia

La enfermedad empieza cuando el trofozoíto se establece preferentemente en el íleon terminal. Los trofozoítos migran al intestino grueso, donde colonizan la mucosa intestinal y se adhieren a la célula epitelial a través de lectinas, la más estudiada es la que tiene motivos de Gal/GalNac (Peterson 2010). Esta adhesina es una proteína multifuncional, la cual le permite a la amiba la adhesión a eritrocitos humanos, neutrófilos, algunos epitelios y a ciertas bacterias (Mortimer, 2010).

El daño tisular inicia cuando los trofozoítos adheridos al epitelio intestinal penetran la mucosa, que en las primeras etapas de la relación hospedero-parásito disminuye la motilidad de los parásitos. El daño está determinado por la muerte de la célula epitelial, de los neutrófilos y linfocitos del huésped. La interacción con las células del hospedero origina una respuesta inflamatoria muy marcada a través de la activación del factor nuclear kapa B (NF- κ B) y la secreción de linfocinas. La capacidad virulenta de cepas de *E. histolytica* depende de numerosos factores de patogenicidad como la secreción de proteasas de cisteína, proteínas formadoras de poros (ameboporos), resistencia al estrés oxidante entre muchos otros. El

ameboporo es un péptido que forma un canal de 77 residuos de aminoácidos, existen tres isoformas de este (A, B y C) las cuales tienen en común un residuo de cisteína en posiciones idénticas, además de la histidina cerca del extremo N-terminal (Beck L. et ali 2002).

Además en los trofozoítos se han descrito mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero mediante los cuales escapan de los mecanismos de resistencia del hospedero en el intestino. Por ejemplo, la lectina amibiana descrita anteriormente tiene similitud con el CD59, esta última es un antígeno que se encuentra en leucocitos para la activación del complemento o las proteínas de cisteína que degradan las anafilotoxinas C3a y C5a y son capaces de degradar a la IgA secretora y IGg humanas, lo que impide la opsonización (Beck L. et al 2002).

1.1.7 Epidemiología

Entamoeba histolytica tiene una distribución mundial; sin embargo, las infecciones son más frecuentes en los países y regiones en vías de desarrollo como América Latina, Asia y África. Las zonas con mayor endemia son los países tropicales y subtropicales, además están implicados los factores sociodemográficos y de accesibilidad a los servicios sanitarios en una comunidad. Se considera que el 10% de la población mundial está infectada por el parásito, de los cuales el 90% no tienen síntomas. Se calcula que cada año ocurren 50 millones de casos sintomáticos de los cuales 100,000 son mortales (WHO; 2006).

En México la amibiasis es el problema sanitario de salud pública más importante. Un estudio seroepidemiológico reciente reportó que el 8.41% de la población tiene anticuerpos antiamebianos, lo que demuestra la elevada frecuencia de infección por este parásito (Rodríguez et al 1999). En nuestro país, de 1995 a 2006 se estimó una tasa de morbilidad por amibiasis intestinal entre 1,000 y 5,000 casos por cada 100,000 habitantes, con pocas variaciones anuales. Se ha demostrado que los menores de 15 años son los más afectados. De las personas infectadas, el 14% corresponde a *E. histolytica* y 10% a *E. dispar* (González 1999).

Antes de la década de los 50s del siglo pasado, la forma clínica más frecuente de la amibiasis era el absceso hepático; sin embargo, con la llegada del drenaje, agua potable y pavimentación de las calles, ha disminuido sustancialmente esta forma de la enfermedad; para el año 2002 solamente se reportaron 3.6% de pacientes que presentaron esta manifestación clínica (Ximenez et al 2007).

1.1.8 Manifestaciones clínicas

De acuerdo a los síntomas de los individuos afectados, la amibiasis puede agruparse en sintomática sin daño tisular y sintomática con daño tisular.

E. histolytica se multiplica en la luz intestinal; si no hay invasión de la pared, el portador es asintomático. Cuando hay invasión tisular, inicialmente el punto de penetración se manifiesta como la alteración microscópica de la mucosa y submucosa, lo que produce una lesión puntiforme y que da origen a la laceración. Los trofozoítos se multiplican en la parte más profunda de la lesión con tendencia a destruir el tejido del lado, por debajo de la mucosa intestinal; cuando esto ha sucedido se constituye la lesión característica llamada “botón de camisa” la cual está formada por una pápula con una pequeña lesión central que se prolonga de manera más amplia desde la base (Kimura et al 1997).

Después de seis semanas se presenta la colitis amibiana sintomática; cuyos síntomas son (Tabla 1): dolor abdominal inferior y una ligera diarrea, seguida por malestar, pérdida de peso, dolor en la espalda y abdomen inferior difuso. Una vez que los trofozoítos han colonizado y destruido la mayoría de la mucosa intestinal, se producen ulceraciones con moco abundante, provocando necrosis graves (Fig. 3a).

Tabla 1.1 Amibiasis intestinal sintomática

SINTÓMAS	TIPOS		
	INVASIVA AGUDA	INVASIVA CRÓNICA	COLITIS FULMINANTE
	<ul style="list-style-type: none"> -Gran cantidad de evacuaciones, pujos y tenesmo. -Cada vez se elimina menos materia fecal, hasta ser solo moco sanguinolento. 	<ul style="list-style-type: none"> -Colitis disentería. sin -Dolor abdominal, diarrea, moco. -Pujo y tenesmo 	<ul style="list-style-type: none"> -Fiebre alta. -Hemorragia masiva. -Sensibilidad abdominal. -Se trata con colectomía

1.1.9 Amibiasis extraintestinal

El absceso hepático amibiano (AHA) se debe a la presencia de grandes cantidades de amibas en el hígado (Fig. 3B), que llegan ahí por vía intravenosa debido a la ulceración del intestino. Cuando *E. histolytica* llega a los sinusoides hepáticos, se produce una reacción inflamatoria alrededor de los parásitos; donde se elevan los eosinofilos. Estas lesiones aumentan de tamaño y se van haciendo más irregulares, sin que la respuesta inmune pueda afectarlos, es entonces cuando los hepatocitos sufren necrosis y las lesiones tienden a ser confluentes dando origen a granulomas. Finalmente se produce necrosis a los cinco días, y el desenlace es fatal para el individuo (Kimura et al. 1997).

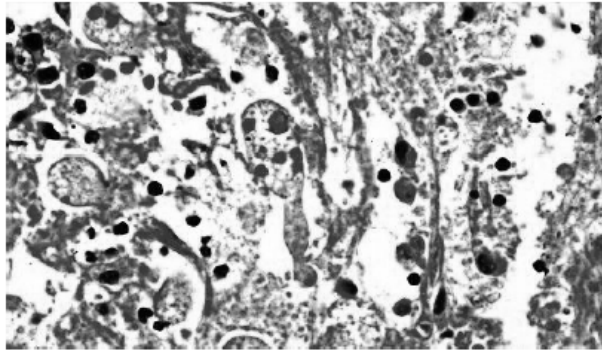


Figura 1.3A. Muestra en tejido de paciente con colitis fulminante

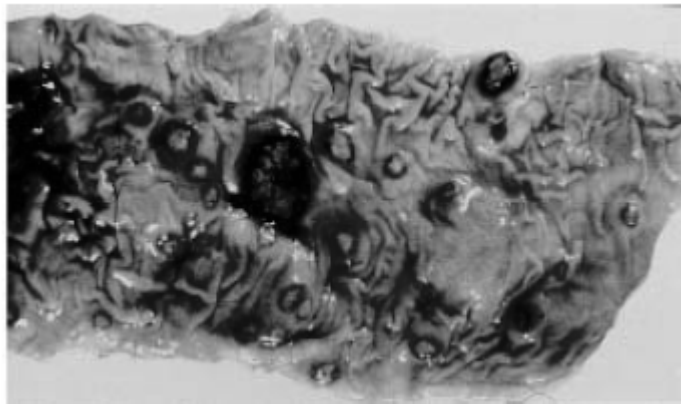


Figura1.3B Biopsia de un paciente con absceso hepático amibiano

Existen casos raros de amibiasis en otros órganos (Tabla 2)

Tabla 2 Otros tipos de amibiasis extraintestinal

Características	Tipos pocos frecuentes		
	Pleuropulmonar	Cutánea y Mucosa	Cerebral
	-complicación por rotura del absceso. -Dolor torácico, tos, derrame pleural.	-poca higiene. -Úlceras perianales y genitales. -Olor fétido	-Diseminación hematológica. -Mortal

El diagnóstico de la amibiasis intestinal se realiza por medio del estudio parasitológico de las heces donde generalmente se observa quistes y raramente la presencia de trofozoítos; también puede ser establecido por estudio de histopatología en tejidos. Las técnicas más utilizadas en el diagnóstico de laboratorio son la fijación PAF (Fijación de fenol-alcohol y formol) para observar trofozoítos y la tinción de Telemann para detectar quistes.

Para el diagnóstico del absceso hepático, si existe sospecha, es necesario hacer estudios imaginológicos como el ultrasonido, e inmunológicos y microbiológicos para confirmar la etiología. En caso de demostrar el agente, es necesario un método invasivo como la punción hepática (Hanque R. et al.2003).

1.1.10 Tratamiento

Existen fármacos para el tratamiento de la amibiasis con acción a diferentes niveles de los tejidos infectados: los de acción luminal, tisular dentro o fuera del intestino, de concentración tisular hepática y de acción mixta .

Las quinoleínas y diyodohidroquinoleínas son compuestos derivados de yodo, la quinfamida es una tetrahidroquinoleína halogenada con acción luminal con buena eficacia y tolerancia a tratamiento corto. Los medicamentos de acción tisular en el intestino son la clefamida y etofamida (Romero 1993) los cuales son preparados sintéticos que se absorben parcialmente en el intestino y actúan contra los trofozoítos por contacto directo en la luz intestinal a diluciones muy altas, por encima de 1: 80000.

El metronidazol y otros imidazoles como son el tinidazol, secnidazol y ornidazol son de acción sistémica, es selectivo contra microorganismos anaerobios. Después de ingresar a la célula por difusión, su grupo nitro es reducido por la actividad de nitroreductasas y proteínas redox a un radical nitro altamente reactivo y

produce citotoxicidad al parásito al generar estrés oxidante que daña el DNA y otras biomoléculas esenciales (Pérez-Trallero & Iglesias 2003).

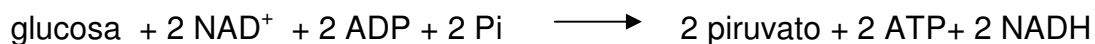
El metronidazol es el fármaco por excelencia, pero se han reportado cepas *in vitro* que han generado resistencia de hasta 10 μM (Samarawickema et al. 1997). Este fármaco tiene sabor metálico y causa náuseas, dolor abdominal, cefalea y neutropenia reversible, confusión, convulsiones (Tracye y Zlobl 2001).

1.2 ANTECEDENTES DEL METABOLISMO ENERGÉTICO DE *E. histolytica*

El parásito carece de mitocondrias y las enzimas del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa por lo que la glucólisis es la única vía significativamente importante para cubrir las demandas energéticas requeridas para sus procesos vitales (Reeves 1984; Saavedra et al 2005).

1.2.1 GENERALIDADES DE LA GLUCÓLISIS

La glucólisis es la vía metabólica encargada de oxidar la glucosa con la finalidad de obtener energía para las células. Este proceso metabólico se resume en la siguiente ecuación:



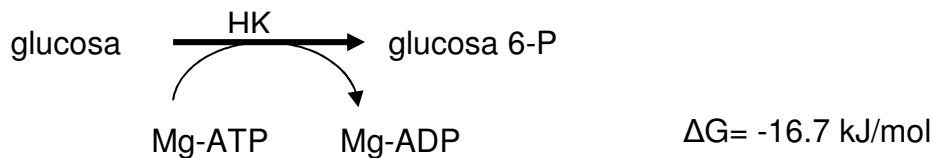
El hecho de que esta vía ocurra en organismos muy diversos, indica que es una vía metabólica conservada, es decir presente en organismos filogenéticamente distantes.

Esta vía se divide en dos fases: la primera consta de cuatro reacciones de las cuales dos de ellas son de fosforilación por lo que consumen ATP, el objetivo de esta fase es romper la molécula de glucosa para producir dos triosas fosfatadas que terminarán como dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato (G3P), por medio de la

triosafosfato isomerasa (TPI). La segunda fase oxida estas dos moléculas hasta piruvato con formación neta de dos moléculas de ATP y poder reductor en forma de NADH (Nelson y Cox 2005)

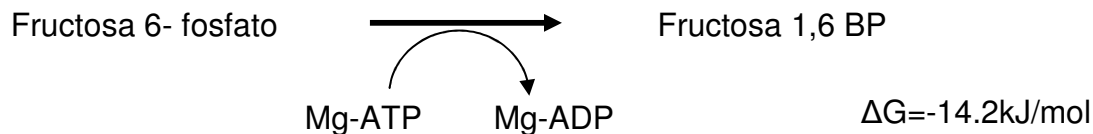
La glucólisis en mamíferos está regulada por tres reacciones *irreversibles* en condiciones fisiológicas:

1) la hexocinasa (HK) fosforila al C-6 de la glucosa consumiendo una molécula de ATP. Esta enzima se inhibe por el producto de la reacción, glucosa-6-fosfato (G6P).



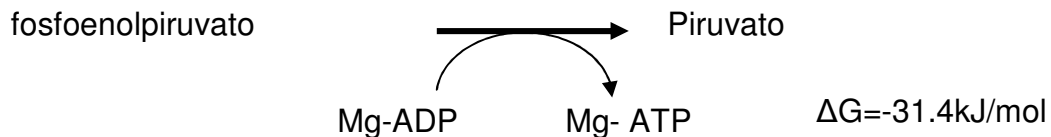
En el hígado se encuentra una isoenzima especializada de la HK, la glucocinasa, la cual no se inhibe por la G6P pero tiene 10 veces menor afinidad por la glucosa que la HK (Nelson y Cox 2005).

2) La fosforilación de la fructosa-6-fosfato (F6P) es el segundo paso regulado de la glucólisis, donde la fosfofructocinasa 1 (ATP-PFK1) transfiere un fosfato del ATP al C-1, para formar fructosa 1,6-difosfato (F1,6BP). Cuando se alcanzan altos niveles de ATP en la célula, la PFK se inhibe alostéricamente por este metabolito, disminuyendo su afinidad por F6P; en contraparte, cuando la demanda energética de la célula es alta, se produce un incremento en los niveles celulares de ADP. Por la acción de la adenilato cinasa, dos moléculas de ADP se transforman en ATP y AMP y éste último es un activador alostérico muy potente de la ATP-PFK1 (Nelson y Cox 2005).



Al nivel de la PFK, los niveles de glucosa extracelular también regulan el flujo de la glucólisis. Cuando la concentración de glucosa en sangre es baja, aumentan los niveles de la hormona glucágon que favorece la fosforilación de la actividad de fosfatasa de la fosfofructocinasa tipo 2 (ATP-PFK2) e inhibiendo su actividad de cinasa, lo que hace descender el nivel de F2, 6BP el cual es el activador más potente de la ATP-PFK1. Al contrario, si la concentración de glucosa en sangre es alta, a través de una cascada de señalización mediada por la insulina, la ATP-PFK2 se desfosforila con lo que se incrementa su actividad de cinasa e incrementa los niveles de la F2, 6BP los cuales incrementarán la actividad de la ATP-PFK1 favoreciendo el flujo glucolítico (Nelson y Cox, 2005).

La última enzima de la glucólisis que es regulada alostéricamente es la piruvato cinasa (PYK) la cual transfiere el grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) al ADP para generar ATP y piruvato. La PYK se regula de manera diferente según el tejido en el que trabaje, pero en hígado se inhibe en presencia de ATP y acetil-CoA, y se activa por la la F-1,6-BP y la concentración de fosfoenolpiruvato (Nelson y Cox, 2005).



1.2.2 Diferencias en la glucólisis de *Entamoeba histolytica*.

Existen diferencias importantes entre la glucólisis de mamífero y la del parásito (Fig. 1.4) (Reeves 1982). En la vía amibiana solo la HK cataliza una reacción irreversible y no se inhibe por G6P, sino el ADP y AMP son potentes inhibidores competitivos con respecto al ATP. Además, el parásito tiene las enzimas dependientes de pirofosfato fosfofructosa cinasa dependiente de pirofosfato (PPI-PFK) y la piruvato fosfato dicinasa (PPDK) (Figura 1.4) las cuales catalizan reacciones reversibles y cuyas contrapartes en la glucólisis de mamíferos son la

ATP-PFK1 y la PYK (piruvato cinasa). La amiba cuenta con genes que codifican proteínas similares a estas dos, sin embargo la actividad de estas enzimas que se determinó en los trofozoítos es de apenas el 10% de la de las contrapartes dependientes de P_i, por lo que muy probablemente no contribuyen de manera significativa al flujo glucolítico (Saavedra et al 2007). Así mismo, en el primer paso de fosforilación a nivel de sustrato catalizado por la 3-fosfoglicerato cinasa (PGK) la enzima tiene un orden de magnitud mayor afinidad por el GDP que por el ADP, por lo que este primer paso sintetizaría de manera principal GTP en lugar de ATP (Reeves 1984; Saavedra et al, 2005).

La descarboxilación oxidativa del piruvato también tiene diferencias con la del humano. La amiba no tiene la piruvato deshidrogenasa típica de organismos aeróbicos, la conversión de piruvato a acetil-CoA es catalizada por la piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) (Reeves, 1975, Pineda et al, 2010). Los electrones de la oxidación se transfieren a dos moléculas de ferredoxina las cuales se reoxidan por otros procesos celulares.

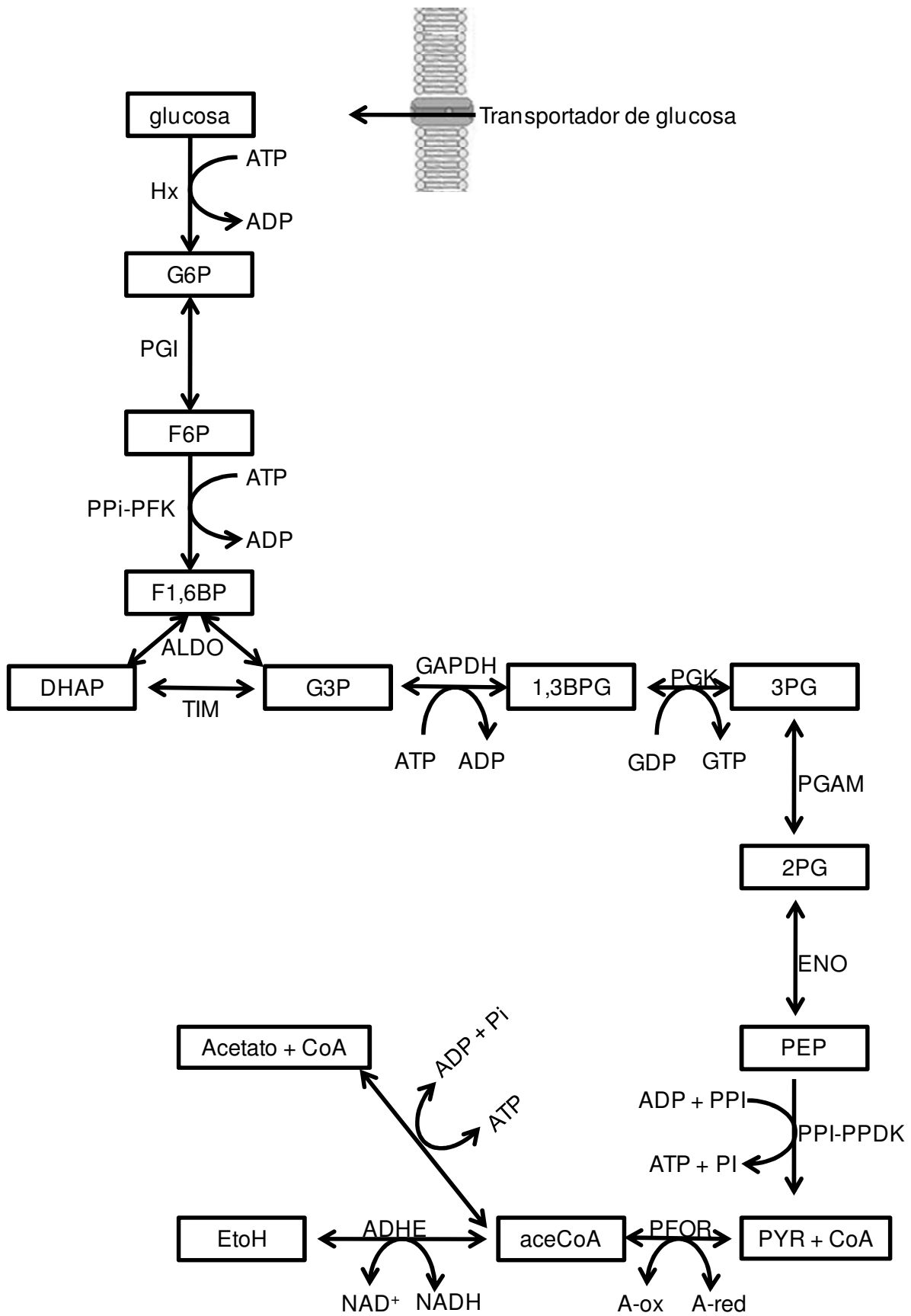


Figura 1.4. Vía glucolítica de *Entamoeba histolytica*

Una diferencia con respecto a las células de mamífero es que los productos finales de la glucólisis en amiba son el acetato y el etanol mientras que en mamífero el producto final es lactato, producto de la reacción de la lactato deshidrogenasa. El etanol y acetato se obtienen a partir de acetyl-CoA. El flujo principal de la glucólisis es hacia la formación de etanol. La alcohol deshidrogenasa bifuncional (ADHE) de amiba reduce el acetyl-CoA a acetaldehído y posteriormente este último lo vuelve a reducir para producir el etanol. En este proceso se oxidan dos moléculas de NADH producto de la glucólisis y se requieren otras dos moléculas de NADH provenientes de la oxidación de la ferredoxina para poder regenerar el NAD⁺ para que el flujo glucolítico no se interrumpa. El metabolismo del acetato se describe en detalle a continuación.

1.3 METABOLISMO DEL ACETATO EN *E. histolytica*

Nuestro grupo de investigación reportó recientemente que solamente el 10% del acetyl-CoA producto del catabolismo de la glucosa se transforma en acetato por la acción de la acetato tiocinasa (AcTK) (Pineda et al 2010). La síntesis de acetato en *E. histolytica* (Fig. 1.5) ha sido poco analizada y no se sabe la relevancia que pueda tener esta vía en el metabolismo intermediario del parásito, por lo que esta tesis se

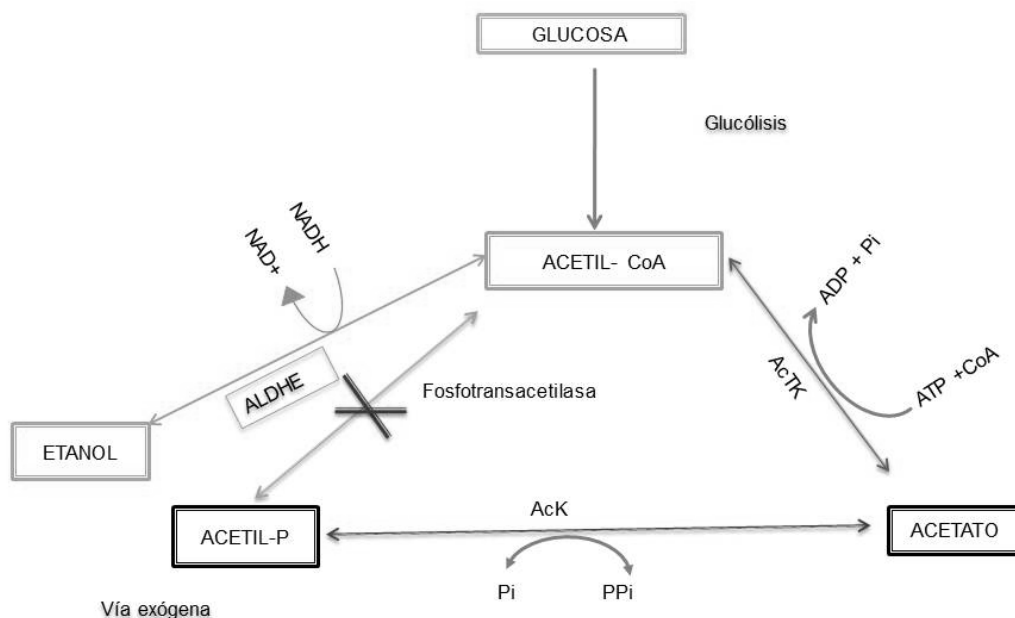
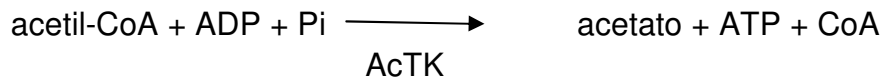


Fig 1.5 Vías de obtención de acetato en el parásito *E. histolytica*.

enfocó a estudiar las enzimas del metabolismo del acetato del parásito. A continuación se describe lo reportado para este metabolismo.

1.4 ACETATO TIOCINASA

La reacción de la AcTK se muestra a continuación:



Es muy poca la información que se tiene de la AcTK amibiana. En 1975 Reeves reportó la evidencia de producción de acetato en cultivos amibianos monoxénicos incubados en condiciones aerobias (Reeves 1975). Posteriormente, a partir de extractos amibianos logró semi-purificar esta enzima y determinó una velocidad máxima (V_{max}) de la 0.44 U/mg de proteína. Esta enzima utiliza ADP y Pi como sustratos en lugar de AMP y PPI como la enzima de mamíferos. En el 2000 Jessica Field logro obtener la secuencia de la enzima; la cual reporto en el genbank.

Además de la AcTK, existe otra reacción en la amiba que sintetiza acetato. La acetato cinasa (AcK) dependiente de PPI utiliza acetilfosfato (acetil-P) y Pi para sintetizar acetato y PPI.



1.5 ACETATO CINASA

Una caracterización parcial de la AcK de *E. histolytica* fue publicada por Reeves (Reeves et al, 1975). En ese estudio se purificó a la enzima a partir de extractos amibianos y se determinó una V_{max} de 0.77mU por mL, y con afinidades por sus sustratos de $Km_{\text{acetil-P}} = 0.006\text{mM}$ y $Km_{\text{Pi}} 2.2\text{mM}$. También se estableció que la reacción reversa está poco favorecida.

Es importante resaltar que hasta el momento, en *E. histolytica* no se ha encontrado actividad de fosfotransacetilasa ni de otra acetato cinasa dependiente de

ATP que pueda originar acetil-fosfato (Fig. 1.5) (Reeves, 1984). En otros microorganismos que utilizan el acetato como fuente de carbono estas dos reacciones activan al acetato para su posterior metabolización. Se ha propuesto que el acetil-P que necesita la AcK amibiana para generar acetato proviene de la fagocitosis de bacterias por el parásito (Reeves et al 1975). Esto aún no ha sido evaluado.

2.0 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Debido a la poca información que existe en *E. histolytica* sobre la función fisiológica del metabolismo del acetato y sus enzimas involucradas, este proyecto de tesis consistió en caracterizar cinéticamente las enzimas y determinar los intermediarios de esta sección de la glucólisis amibiana. La determinación de la actividad de estas enzimas y los metabolitos en el parásito nos permitirá establecer su funcionalidad en la célula. Así mismo, los datos cinéticos y metabólicos generados servirán para actualizar un modelo computacional de la glucólisis en amiba construido por el grupo de trabajo (Saavedra et al 2007).

2.1 HIPÓTESIS

Debido a las propiedades cinéticas y presencia de sus sustratos en la célula, la AcTK contribuirá más que la AcK en la síntesis de acetato.

2.2 OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS DE LICENCIATURA

Caracterizar el metabolismo del acetato en *E. histolytica*

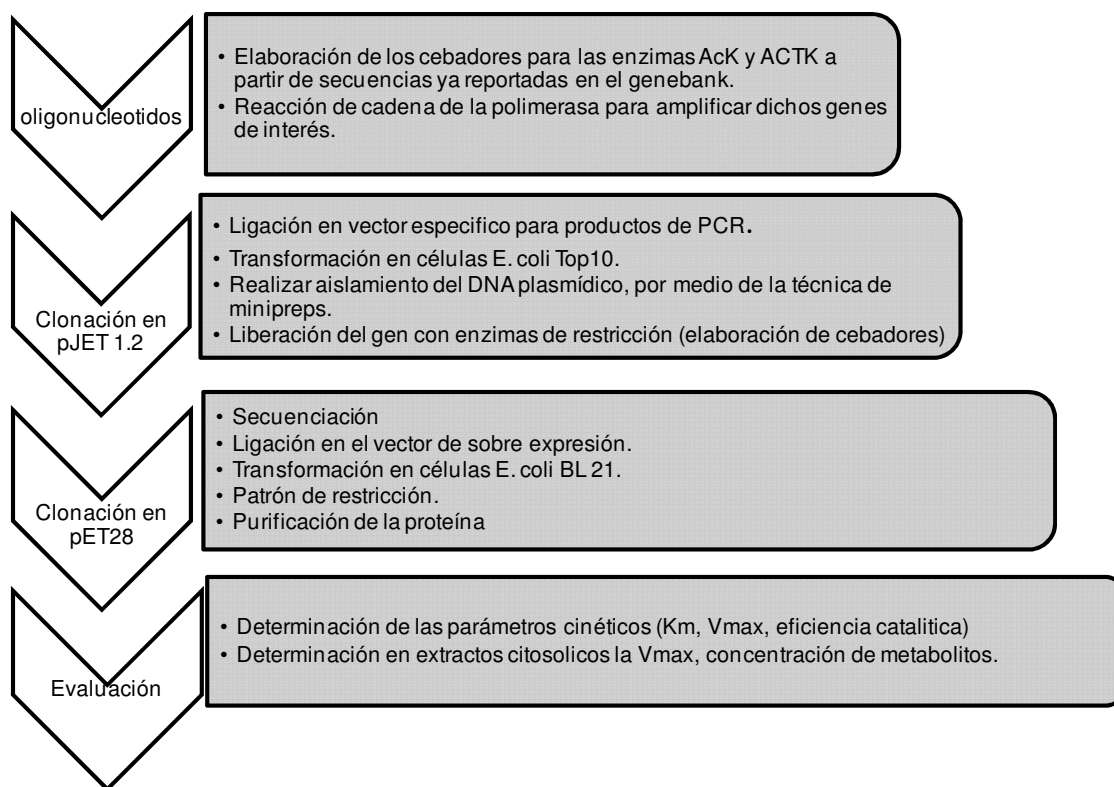
2.3 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Clonar los genes y sobre-expresar las enzimas AcTK y AcK de *E. histolytica*.
2. Obtener las proteínas recombinantes en forma pura y estable.
3. Caracterizar cinéticamente a las enzimas recombinantes en condiciones cercanas a las fisiológicas de pH (6.0 y 7.0) y de temperatura (37°C).
4. Determinar las actividades y concentraciones de intermediarios del metabolismo del acetato en el parásito.

3.0 METODOLOGÍA

En el siguiente esquema se sintetiza el plan de trabajo que se llevó a cabo durante el proyecto de tesis.

Figura 3.1. Estrategia experimental



3.1 CLONACIÓN DEL GEN

3.1.1. Diseño de los cebadores

Se diseñaron dos oligonucleótidos correspondientes a las regiones 5' y 3' de la AcTK y ACK. Su secuencia de nucleótidos se basó en las secuencias reportadas para los genes de ambas enzimas en el banco de secuencias del genoma de *E. histolytica* (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) correspondientes a los marcos de lectura AF286346.1 y NW_001914922.1, respectivamente. Se adicionaron los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción NdeI (extremo 5') y XhoI (extremos 3') para facilitar su clonación en plásmidos. La secuencia de los oligonucleótidos se muestra a en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Cebadores para la amplificación de las enzimas AcK y AcTK.

enzima	dirección	Secuencia de oligonucleótidos
AcTK	Fw	5'CGTACATATGCAGTTTGAGCCACTC-3'
	Rw	5'-GCTACTCGAGTTATGGTTGGATGAC-3'
AcK	Fw	5'-CGTACATATGTCTAACGTCCTAATATTC-3'
	RW	5'-GCTACTCGACTTAAACTGAAATAATTC-3'

3.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica de PCR (Fig. 3.2) nos permite amplificar selectivamente y exponencialmente un segmento específico de DNA utilizando cebadores específicos hasta obtener una cantidad suficiente para su posterior manipulación.

La DNA polimerasa realiza la extensión del cebador a partir del extremo 3'OH libre de la ribosa utilizando como molde la cadena complementaria (Bell 1989)

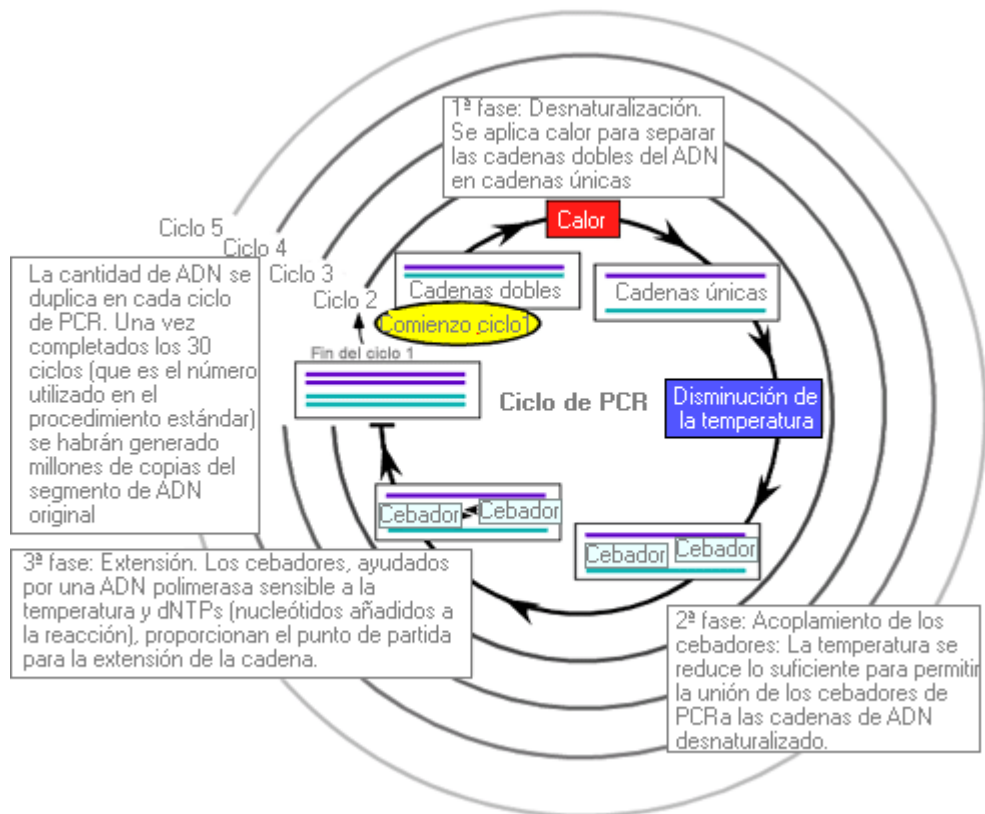


Figura 3.2. Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa. (<http://www.institutoroche.es/>)

Esta técnica se llevó a cabo para la amplificación de fragmentos de DNA que contuvieran los genes que codifican para las enzimas de interés utilizando como templado el DNA genómico de *E. histolytica* ya que se ha reportado que la mayoría de sus genes no contienen intrones. El volumen de la reacción fue de 50µL y contenía lo siguiente:

Tabla 3.1 Componentes de la mezcla de reacción de PCR

Componente	Concentración final
MgCl ₂	1.5mM
Buffer de reacción *	2X
DMSO	0.1mM
Mezcla de desoxiribonucleótidos (dNTPs)	0.2mM
cebadores	200ng
DNA	
MgSO ₄	8mM
Pfu DNA polimerasa	1U

*50 mM Tris-Cl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM Mg₂Cl.

El termociclador de gradiente (Marca Biometra) se programó con el siguiente protocolo de amplificación para determinar la temperatura óptima de alineamiento de los cebadores:

Paso 1	95 °C , 3 min	1 ciclo desnaturalización
Paso 2	95 °C , 30 seg	desnaturalización
Paso 3	gradientes de 68°C, 1 min	alineamiento cebadores
Paso 4	72 °C, 4min	Extensión
Paso 5	Se repite pasos 2-4 por 30 ciclos	
Paso 6	72 °C, 10 min	
Paso 7	4°C.	

Las temperaturas de alineamiento fueron de 61 °C para la AcTK y 58.8°C para la AcK.

3.1.3. Purificación del fragmento por electroforesis en geles de agarosa.

La electroforesis en gel es un método que se emplea para separar macromoléculas en función del tamaño y la carga eléctrica (Sambrook y Russell 2001). La fuerza motriz de la electroforesis es la tensión eléctrica aplicada a los electrodos en ambos extremos del gel (Fig. 3.3). Muchas macromoléculas biológicas poseen grupos ionizables y a un pH determinado existen en solución como especies cargadas eléctricamente, sean cationes (+) o aniones (-). Según la naturaleza de la carga neta, las partículas cargadas migrarán hacia el cátodo o hacia el ánodo.

La separación de las macromoléculas depende de dos variables: carga y masa. La corriente eléctrica de un electrodo repele las moléculas, al tiempo que el otro electrodo las atrae. La fuerza de fricción del material de gel actúa como tamiz molecular, separando las moléculas en función de su tamaño. Podemos calcular el peso aproximado de las moléculas separadas por medio de marcadores de peso molecular.



Figura 3.3 Electroforesis en gel. Los compuestos se separan de acuerdo al tamaño y carga al hacer pasar una corriente eléctrica a través del tamiz utilizado.

Los productos de la reacción de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% con 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio. El gel se colocó en una

cámara de electroforesis que contenía buffer TBE 0.5X (45 mM Tris, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA pH 8.3) y se aplicó una corriente de 100 V.

Para observar las bandas de DNA, el gel se colocó en un trans-iluminador con luz UV, ya que el bromuro de etidio se intercala entre las bases del DNA y fluoresce al exponerlo a luz UV.

3.1.4 Purificación del fragmento

Los fragmentos de DNA del peso aproximado de los genes de interés que se separaron por electroforesis, se cortaron del gel y se extrajeron del gel de agarosa utilizando el kit zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo research). La técnica se basa en la unión del DNA a partículas de sílice cuando la concentración salina es alta, posteriormente, el DNA se eluye de la resina en presencia de agua o en soluciones amortiguadoras de baja fuerza iónica.

El protocolo general es:

1. Añadir tres volúmenes de buffer ADB por volumen de muestra, e incubar a 55°C durante 15 min.
2. Centrifugar (microcentrifuga eppendorf 5415C) a 15996 x *g* por 5 seg
3. Descartar el sobrenadante y lavar la resina con buffer de lavado (etanol 100%), centrifugar durante 30 seg. Repetir el lavado dos veces más. Eluir el DNA con 10 µL de agua Milli-Q.

3.1.5 Ligación al plásmido pJET 1.2

Una vez que se purificaron los fragmentos de interés, se procedió a su ligación al vector pJET 1.2 de Fermentas (Fig. 3.4). Este plásmido es específico para clonar productos de PCR (de 6pb a 10Kb) en su sitio de clonación múltiple (MCS). Contiene el gen para la β-lactamasa el cual confiere a las células que contienen el plásmido resistencia a la ampicilina, esto para la selección y mantenimiento de las células

recombinantes. Además en el MCS tiene el gen *eco47R* que cuando se expresa en la célula es letal, por lo que cuando se interrumpe su secuencia por el fragmento insertado, evita que las células mueran.

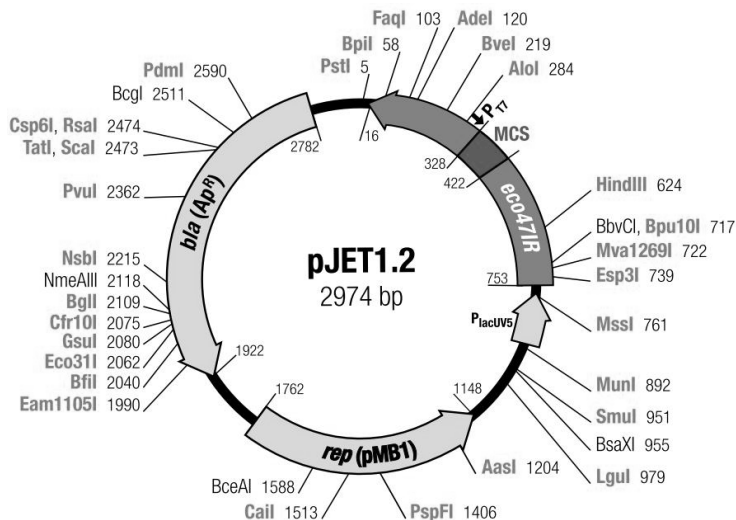


Fig. 3.4 Mapa del Vector pJET 1.2/ Blunt

Los componentes de la reacción de ligación se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Componente de la reacción de ligación

Reactivos	Volumen μL
Buffer de reacción 2X	10
Producto de PCR*	1-3
pJET 1.2 /blunt	50ng/μL
H ₂ O	19 μL
T4 DNAligasa	4U

*El producto no debe tener adeninas en sus extremos. La Pfu DNA polimerasa no se las incorpora.

La reacción de ligación se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

3.1.6 Transformación de bacterias con el plásmido

La transformación es un proceso por el cual las células captan DNA libre presente en el medio. Para que la transformación tenga lugar, la bacteria tiene que encontrarse en el llamado estado de competencia que ocurre en determinadas condiciones fisiológicas; en dicho estado, la bacteria presenta alteraciones en su pared y membrana celulares que permiten la entrada de ácidos nucleicos en la célula (Gerard. 2007). Uno de los métodos físicos de transformación es la electroporación, consistente en inducir la incorporación del DNA mediante la aplicación de un pulso eléctrico muy breve e intenso. La competencia también se puede inducir con tratamientos químicos utilizando compuestos como el cloruro de calcio.

Para hacer células competentes de la bacteria *Escherichia coli* (dependiendo de la cepa de interés), se crecieron las células en 50 mL de medio Luria-Bertani (LB; 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl y 1% de triptona) a 37°C hasta alcanzar una absorbancia de 600 nm. Posteriormente el cultivo se enfrió en un baño de hielo por 10 min. En condiciones de esterilidad se pasaron a un tubo de centrifuga y se cosecharon las células por centrifugación a 4500 x g por 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 33 mL de CaCl₂ estéril y se incubó una hora en hielo; transcurrido este tiempo las células se cosecharon nuevamente con las mismas condiciones. Se resuspendió el pellet en CaCl₂ 0.1M y 17% de glicerol estéril. Finalmente se hicieron alícuotas de 500 µL y se almacenaron a -70°C.

Para transformar las células con el plásmido pJET1.2 con el inserto incorporado, se adicionaron 50 µL de bacterias competentes *E coli* de la cepa Top10 al tubo de la reacción de ligación. Se incubó durante una hora en hielo y se realizó un choque térmico en un baño a 42°C por 1 min para que se favoreciera la entrada del plásmido a la bacteria. Después se incubaron las bacterias durante 5 min en hielo, se añadió un mililitro de medio LB y se incubaron a 37°C por 1 hr para permitir que se recuperaran del estrés provocado. Posteriormente, se cosecharon las células a 100

xg durante 5 min y se sembraron en medio LB con 1µg/mL de ampicilina para seleccionar a las colonias de bacterias que tuvieran el vector.

3.1.7 Purificación del Plásmido

Se seleccionaron 5 colonias transformadas y se cultivaron en medio LB líquido con ampicilina (1µg/mL) toda la noche a 37°C. Las células se cosecharon por centrifugación a 1000 x g durante 10 min. El DNA plasmídico se purificó utilizando el Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). El protocolo consiste:

- 1.- Cosechar las células por 5 min y descartar el sobrenadante.
- 2.- Resuspender el pellet en 250 µL de Cell Resuspension solution (250mM Tris-HCl pH 9, 10 mM MgCl₂).
- 3.- Adicionar 250µL de Cell Lysis Solution (0.2M NaOH, 1% SDS) y mezclar la muestra por inversión 4 veces.
- 4.- Adicionar 10µL de Alkaline Protease Solution, mezclar e incubar por 5 min a temperatura ambiente.
- 5.- Adicionar 350µL de Neutralization solution (4.09M clorhidrato de guanidina, 0.759 M acetato de potasio y 2.12 M ácido acético glacial) mezclar, centrifugar 10min a 15996 x g a temperatura ambiente.
- 6.- Vaciar el sobrenadante a una columna colectora de DNA y centrifugar 1 min a 15996 x g a temperatura ambiente.
- 7.- Adicionar 750µL de Wash solution (162.8 mM acetato de potasio, 22.6 mM tris-HCl pH 7.5, 0.109 mM EDTA pH 8, 60% etanol), centrifugar 1 min y descartar el sobrenadante.
- 8.- Repetir el paso 7 con 250µL de wash solution, centrifugar por dos minutos a 15996 x g.
- 9.- Pasar la columna colectora a un tubo eppendorf de 1.5mL, adicionar 100µL de H₂O Milli-Q, centrifugar a 15996 X g y guardar el eluido a -20°C.

3.2 Identificación del gen

Se realizaron digestiones del plásmido purificado de las diferentes clonas para determinar cuáles contenían el inserto del gen de interés y establecer si el fragmento amplificado contiene los sitios de restricción deducidos de acuerdo a la secuencia de nucleótidos reportada en el banco del genoma de amiba.

Se utilizaron las enzimas de restricción NdeI y Xho I cuyos sitios de corte se introdujeron al diseñar los oligonucleótidos y que extraen el inserto completo del plásmido. Las condiciones de reacción generales para las dobles digestiones se muestran en la Tabla 3.3

Reacción	Concentración final
Buffer 2 (10X)*	1X
BSA	1 mM
NdeI	10 U
XhoI	2.5 U
Plásmido	20 nmoles
Volumen final	10µL

Tabla 3.3 Reacción de digestión del plásmido con enzimas de restricción

* Su contenido es 50 mM de NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM Mg₂Cl, 1mM DTT , pH 7.9?

Por otro lado, se realizaron triples digestiones de NdeI y XhoI junto con algunas de las siguientes tres enzimas de restricción Bam HI, Sac I, Eco RV y Bgl II para determinar si los fragmentos amplificados correspondían a los genes de interés de acuerdo a la Tabla 3.4 El protocolo general se muestra en la siguiente tabla

Reacción	AcK	AcTK
Buffer 2**	1X	1X
BSA	1X	1X
NdeI*	10U	10U
XhoI*	2.5U	2.5U
Plásmido	6µL	6µL
BamH I	-----	10U
Sac I	-----	10U
Eco Rv	10U	-----
Bgl II	5U	-----
Volumen final	10 µL	10 µL

Tabla 3.4 Digestiones internas para los genes de interés

Se incubaron las mezclas por dos horas a 37°C y los fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa para su análisis.

Una vez evaluado que los fragmentos amplificados y clonados pudieran contener los genes de interés, éstos se enviaron a secuenciación automática de DNA en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los fragmentos amplificados sí contenían los genes de interés.

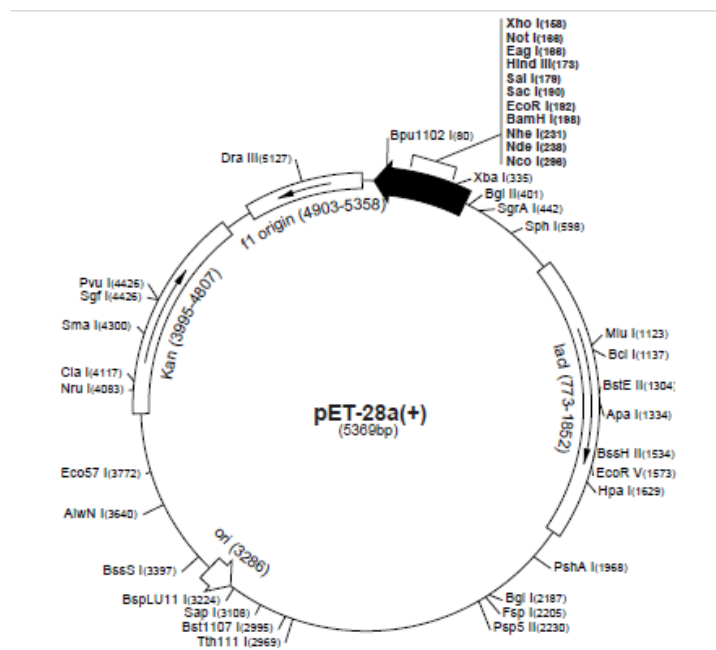
3.3 Sobreexpresión de las enzimas en bacterias *E. coli*

3.3.1 Ligación al vector de expresión pET28

Una vez confirmado que el DNA amplificado correspondía a los genes de interés y que no se hubieran introducido mutaciones durante el proceso de amplificación, los genes se clonaron en el plásmido de expresión en bacterias pET 28. Este plásmido (Fig. 3.5) es un vector de sobreexpresión diseñado para producir copias de una proteína deseada en una célula huésped. Este vector tiene todos los códigos genéticos necesarios, desde el promotor para la célula huésped bacteriana,

la secuencia de terminación, el promotor T7 que solo se une a la T7 RNA polimerasa proporcionándole selectividad, el gen lac que es un gen que codifica para el represor T7 para evitar expresión inespecífica y un casete de resistencia a la kanamicina. Dependiendo de las enzimas de restricción que se utilizan para cada gen, se pueden adicionar etiquetas de histidinas en el extremo amino terminal de la proteína expresada.

Figura 3.5 Características del vector de sobrexpresión pET28



Los plámidos pJET que contenían los genes de interés se digirieron con NdeI y XhoI para obtener los genes mientras que el pET28 se digirió con las mismas enzimas de restricción. La reacción de ligación contenía lo siguiente

Reactivo	componente
pET-28	X ul
Gen purificado	10µL
DNA ligasa	4U
Buffer*	1X
Volumen final	10µL

Tabla 3.5 Reacción de ligación de los genes en el pET28

*50mM Tris-HCl, 10mM MgCL2, 10mM DTT, 1mM ATP, 25µg/mL pH 7.5

Posteriormente, la reacción de ligación se incubó toda la noche a 16 °C.

Las bacterias de *E.coli* de la cepa BL21(DE3)(pLysS) son lisógenos del fago DE3 el cual puede transcribir el gen de la T7 RNA polimerasa que solamente reconoce el promotor unido al gen de interés presente en el plásmido pET28; por lo tanto, el incremento en la transcripción del gen insertado en el plásmido se da de manera específica. Las bacterias de dicha cepa se hicieron competentes por el tratamiento con cloruro de calcio descrito anteriormente y posteriormente se transformaron con la mezcla de ligación por el método también descrito anteriormente. Las clonas se seleccionaron por su resistencia a kanamicina (1µg/mL) en la placa de cultivo.

- **3.3.2 Sobreexpresión de las proteínas en las bacterias**

Se eligieron 10 colonias y se sembraron en 3 mL de medio LB con kanamicina (1µg/mL), se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm en un rango de 0.5-0.6, después se indujo la expresión de las proteínas agregando 0.4 mM de IPTG y se continuó el crecimiento a 25 °C toda la noche.

El IPTG es un análogo de la lactosa la cual se une al represor lac que está unido al promotor del plásmido y evita la transcripción del gen blanco. Dicha unión hace que el represor se desprege del promotor y pueda estar disponible para que se una la T7 RNA polimerasa y empezar la transcripción de los genes de interés.

3.3.3 Selección de las clonas de sobreexpresión

Para identificar las clonas que sobre-expresan las proteínas de interés, se muestrearon alícuotas de los cultivos de las diferentes clonas y las proteínas celulares se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Los geles separador y concentrador se prepararon de acuerdo a la Tabla 3.6:

	Separador 12.5%	Concentrador
H ₂ O mL	2.5	1
Acrilamida 30%	3.0 mL	300μL
Buffer de separación pH8.8	1.9mL*	444μL**
APS 10% (μL)	112	28
TEMED 10μM (μL)	5	2.5

Tabla 3.6 Preparación de los geles separador y concentrador de acrilamida para la electroforesis en geles de agarosa

*Tris 18%, SDS 10%, pH 8.8, en HCl 12N.

**Tris 6%, SDS 10%, pH 6.8, en HCl 12N

La preparación de las muestras fue: 10 μ L cultivo de bacterias +10 μ L de H₂O + 5 μ L Buffer de carga (10% glicerol, 10% SDS, 2 mg de bromofenol, 1 μ L de β -mercaptoetanol) y se incubaron 5 min a ebullición. Así mismo, se incluyeron estándares de peso molecular para proteínas.

La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis y se aplicó una corriente de 120 volts. Al terminar la electroforesis, el gel se tiñó con una solución de azul de coomassie (1% azul brillante de coomassie, 50%metanol, 10% ácido acético glacial) durante una hora y se destiñó con solución para desteñir (40% metanol, 10%ácido acético glacial). Se seleccionaron aquellas clonas que presentaran bandas de proteína enriquecidas de acuerdo al peso molecular esperado.

El protocolo de inducción descrito anteriormente sirvió para la AcTK; sin embargo, siguiendo este mismo protocolo la AcK mostró baja sobreexpresión y se hicieron las siguientes modificaciones. Se sembraron 4 matraces con 50 mLde medio LB con Kanamicina con una colonia cada uno.. Se incubaron a 37°C con agitación por 6 horas. Transcurrido este tiempo se incubaron toda la noche en refrigeración para inducir la expresión de chaperonas que ayudan en el correcto plegamiento de las proteínas. Al día siguiente se indujo la expresión de las proteínas 0.4mM IPTG y se incubaron a diferentes temperaturas (25 °C y 37 °C) por 3 y 6 horas.

En ambos protocolos de sobre-expresión se realizó el control con bacterias BL21 sin vector de sobreexpresión tratadas en las mismas condiciones que las clonas de interés.

3.4 Purificación de las proteínas

Una vez estandarizados los protocolos de expresión se escalaron los cultivos a 50 mL siguiendo el mismo procedimiento de cultivo, inducción e identificación por electroforesis. Las bacterias sobreexpresantes se cosecharon por centrifugación a 15996 x g durante 10 min y se resuspendieron en solución de lisis (100 mM de

trietanolamina- HCl pH 7.4, 300 mM de NaCl y 2 mM de imidazol). Se sonicaron en hielo con 5 pulsos de 1 min al 70% de la máxima capacidad del sonicador con un minuto de descanso entre cada uno. El lisado celular se centrifugó a 8161 x g durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 mL de la solución de lisis. Para determinar si las proteínas se expresaban de manera soluble o insoluble, se realizó la separación de muestras del sobrenadante y precipitado a través de electroforesis en geles de acrilamida en las condiciones previamente descritas. Para la purificación de las proteínas se utilizaron las fracciones que tuvieran la proteína en forma soluble.

Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad con metales. Esta técnica permite la separación de mezclas proteicas por su afinidad a un ligando; las proteínas que se retienen en la columna son aquellas que se unen específicamente al ligando. Se termina con la elución de la proteína de interés con una solución que compite por la afinidad al ligando. En la metodología las proteínas se purifican utilizando una resina acoplada a cobalto (Marca Clontech) a la cual se va a unir nuestra proteína de interés debido a la cola de histidina que le adiciona el vector pET 28. Las proteínas se eluyen con una alta concentración de imidazol, el cual compete con las histidinas por el sitio de unión al Co^{2+} y al estar en mayor concentración, el imidazol desplaza a la proteína recombinante.

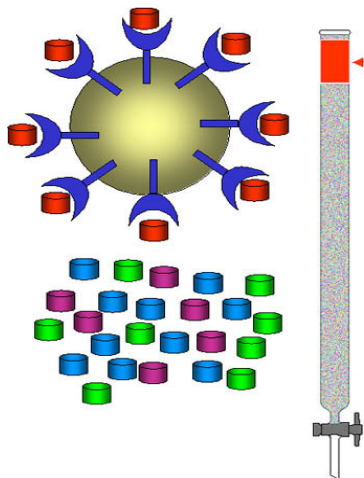


Fig. 3.6. Cromatografía de afinidad. Permite la separación de mezclas proteicas por su afinidad o capacidad de unión a un ligando

Para la purificación de las proteína se sembraron cultivos de 250mL con las bacterias y se indujo la sobre expresión en las condiciones detalladas anteriormente. Se obtuvo la fracción celular en el que la proteína se presentara en su forma soluble. El proceso de purificación se llevó a cabo incubando por 1 h el sobrenadante del sonicado con la resina previamente equilibrada con el buffer de lisis que se utilizó para la sonicación Posteriormente se realizaron 3 lavados de la resina con 10 ml de buffer de lisis. Se vació la resina en una columna de filtración la cual consistió de una jeringa de 10 mL con un filtro en la parte inferior que retiene la resina. Se realizó un último lavado con buffer de lisis + 10 mM imidazol para eliminar las impurezas. . Finalmente se eluyó la proteína de interés con 10 mL de buffer de lisis + 100mM imidazol. La proteína eluída se concentró utilizando una unidad de filtración con membrana de 30K y centrifugando a 3500 rpm durante 20 minutos Finalmente las proteínas se recuperaron en un volumen promedio de 200 μ L, se agregó glicerol a una concentración final del 50% y se almacenaron a -20°C.

3.4.1 Cuantificación de proteínas

La concentración de las proteínas se determinó por el método de Lowry (Lowry et al; 1951) el cual se describe a continuación. Para evitar la interferencia del imidazol en las muestras, las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final del 13% y se mantuvieron a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en solución A de Lowry (2% NaCO₃, 0.4% NaOH, 0.16% tartrato Na-K y 1% SDS).

Se realizó una curva patrón de albúmina de suero de bovino (BSA) a diferentes concentraciones (0, 5, 10, 20, 40, 60, y 80 μ g) llevándolas a 100 μ L con agua.

A las muestras problema y a la curva patrón de proteína se les añadió 1mL de una mezcla de reacción (1 parte de la solución B (4% CuSO₄) por 49 partes de solución A de Lowry) y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente.

Posteriormente se les añadió 100 μL del reactivo de Folin diluído 1:2 con agua y se incubó de 10-30 min. Se midió la absorbancia a 660 nm.

3.5 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA

Los parámetros cinéticos de las enzimas se determinaron a pH y temperatura cercanas a las fisiológicas en la amiba (pH 6.0-7.0 y 37°C). Se utilizaron ensayos espectrofotométricos utilizando enzimas acoplantes en celdas de plástico de 1 mL y utilizando un espectrofotómetro en arreglo de diodos (Agilent technologies) para la determinación de la absorbancia. Los protocolos generales se muestran en las siguientes figuras:

3.5.1 Ensayos enzimáticos para la AcK

El esquema del protocolo de medición de la actividad en la reacción forward (glucolítica) se muestra en la Fig. 3.8

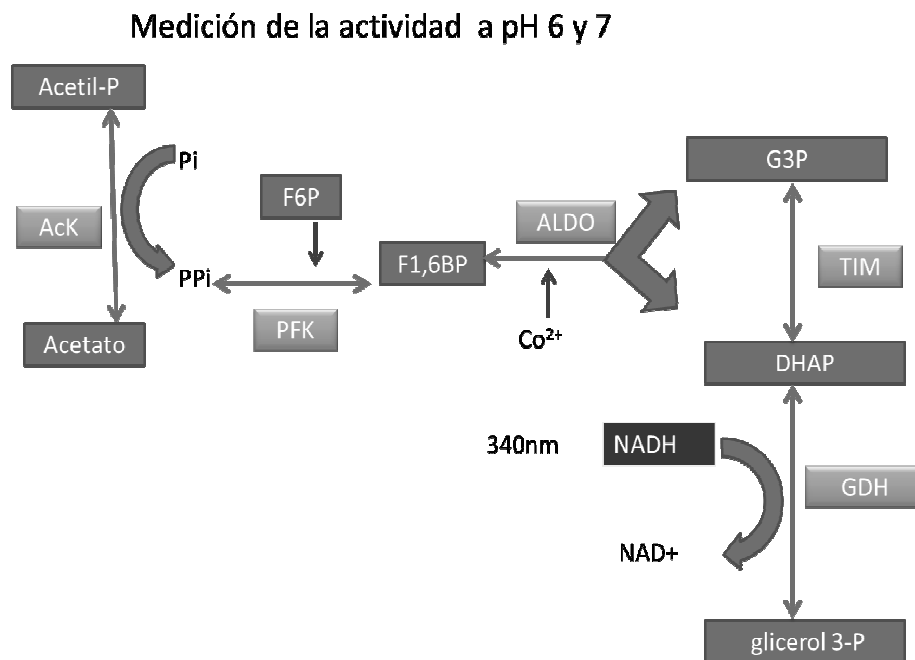


Fig. 3.8 Determinación de la actividad de la AcK en la reacción forward

La mezcla de reacción contenía buffer (10 mM Mops, 10 mM Mes a pH 6 y 7), 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mM F6P, 1 U EhPPi-PFK, 1 U aldolasa (ALDO), 1 U triosafosfato isomerasa-glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (TIM-GDH), 0.2 mM Co²⁺, 0.2 mM NADH, 100 μM acetil-P y 50 μg de AcK. La reacción se empezó agregando 20 mM de Pi. Se monitoreó la desaparición del NADH a 340 nm.

El protocolo de medición de la actividad en la reacción reversa se muestra en la Fig. 3.9

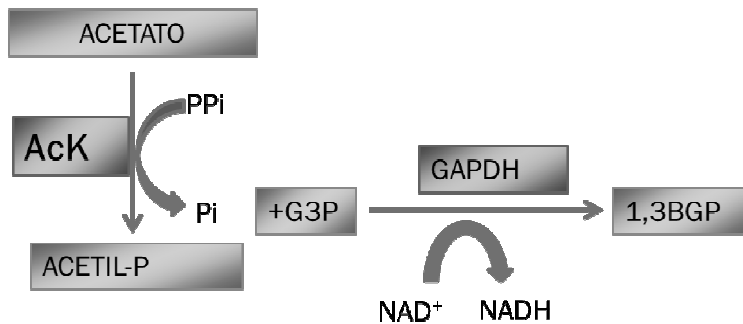


Figura 3.9. Ensayo de actividad de la AcK en la reacción reversa

La reacción contenía buffer 25 mM de Mes, 25 mM Mops 20 mM acetato, 5 mM gliceraldeído-3-fosfato (G3P), 1U gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y 0.1 mM NAD⁺. La reacción se inició con la adición de 0.1 mM PPI y 50 μg de AcK y se midió la formación de NADH a 340nm.

3.5.2 Ensayos enzimáticos para la AcTK

Para determinar la actividad en la reacción forward, se evaluaron dos ensayos: El primero consistió en monitorear a pH 7.0 la liberación de la CoA y hacer reaccionar su tiol libre con ácido 2-nitrobenzoico (DTNB) el cual forma un compuesto colorido que se mide a 412nm en el espectrofotómetro (Fig. 3.10). La reacción contenía: Buffer 25 mM Mes, 25 mM Mops, 10 μM acetil-CoA, 20 mM Pi, 0.2 mM

DTNB 30 μg de AcTK. La reacción se inició con 10 mM ADP y se midió la formación de 2-nitro-5-tiobenzonato a 412nm

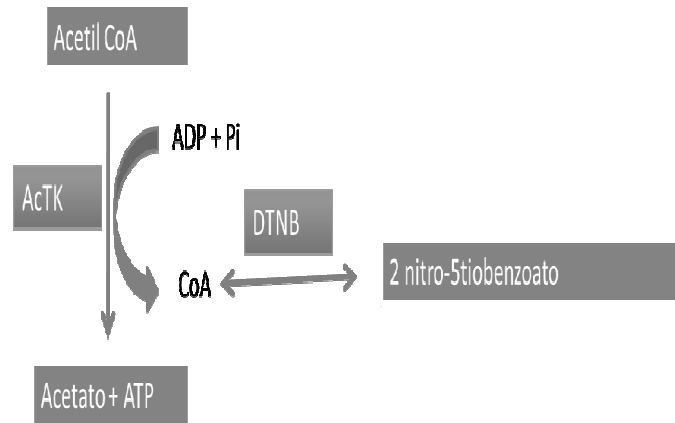


Fig. 3.10 determinación de la actividad de AcTK en la reacción directa por liberación de la CoA

También se evaluó la reacción directa monitoreando la formación de ATP como se muestra en la Fig. 3.11

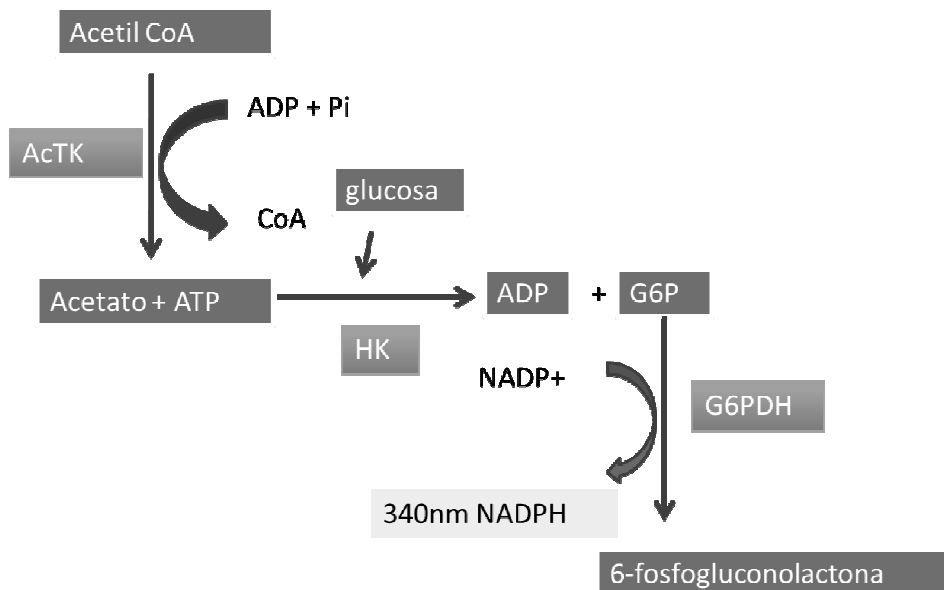


Fig. 3.11 determinación de la actividad de AcTK en la reacción directa monitoreando la formación de ATP

En este sistema acoplante se monitoreó la formación de NADPH a 340nm, la reacción contenía: Buffer (25 mM Mes, 25 mM Mops), 0.01 mM acetil-CoA, 2 mM ADP, 20 mM, 10 mM Pi, 1 mM glucosa, 1 mM NADP⁺

La reacción reversa de la AcTK se determinó en un ensayo enzimático acoplado con piruvato cinasa y que monitoreaba la formación de ADP el cual se muestra en la Fig. 3.12

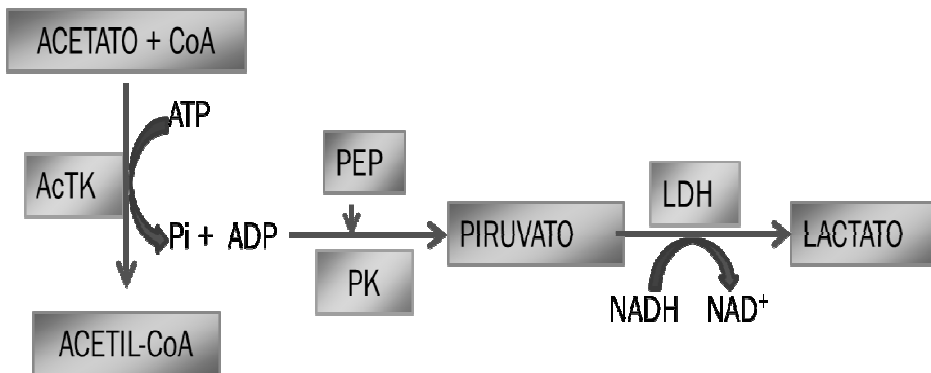


Fig. 3.12 determinación de la actividad de AcTK en la reacción reversa monitoreando la formación de ADP

El ensayo contenía buffer 25 mM Mes, 25 mM Mops, 20 mM acetato, 10 μ M CoA, 0.2 mM ATP, 0.2 mM PEP, 1 mM NADH.

3.5.3 Determinación de metabolitos y actividades enzimáticas en los parásitos

Extracto citosolico.

Se realizaron cultivos de amibas en cajas con 25 mL de cultivo TYI (1.0 g Na₂HPO₄, 0.6 g de NaHPO₄, 2.0 g de NaCl, 20 g de peptona de caseína, 10 g de levadura, 10.0 g de C₆H₁₂O₆, 2.0 g de L-cisteína, 0.2 g de ácido ascórbico, 1.0 mL de C₆H₄yFeNO₇) suplementado con 10% de suero bovino a un pH de 6.8. Se incubaron a 37 °C por 72 h para alcanzar 8 millones de trofozoitos por cultivo.

Se cosecharon a 2000g Xmin y se realizaron dos lavados con PBS; posteriormente se resuspendieron en 1mL de buffer de lisis, Se realizó lisis celular por congelación, descongelación.

Se midió velocidad máxima de las diferentes enzimas, con los métodos ya descritos.

Extracto ácido

Se obtuvo una concentración de parásitos cercana a 20 millones de parásitos por cultivo; se cosecharon y resuspendieron en 1mL de PBS, después se añadió 100µL de PCA (ácido perclórico) al 30% y se incubó en hielo durante 20min, se centrifugó a 14000rpm por 10 minutos. Se descartó el pellet y se neutralizó con NaOH 3M.

Para medir la concentración de metabolitos se utilizaron los mismos métodos descritos sin colocar el sustrato de interés, dejando el resto de ellos y la concentración de enzima purificada saturante.

Para calcular la concentración de los metabolitos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Abs} = CL\epsilon$$

Donde.

Abs= absorbancia.

C= concentración

L= longitud de la celda.

ϵ = coeficiente de extinción molarEl coeficiente de extinción molar para el NADH y el NADPH es de 6.22mM

4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CLONACIÓN DE LOS GENES

Se amplificaron fragmentos de DNA que contuvieran los genes que codifican para la AcTK y la AcK de utilizando como templado DNA genómico de *E. histolytica* y cebadores específicos. Se evaluaron diferentes condiciones de amplificación de los

fragmentos de interés, variando la concentración de Mg^{2+} y diferentes temperaturas de alineamiento de los cebadores. Los productos del PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio. En la figura 4.1 se muestran los geles revelados con UV.

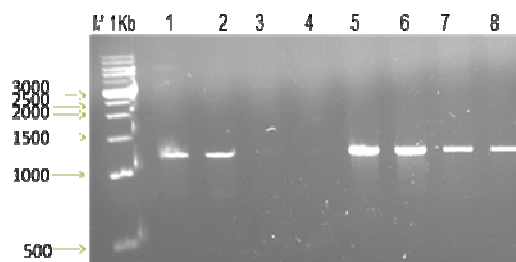


Figura 4.1A. Estandarización del protocolo de PCR para AcK. M) Marcador de peso molecular. 1,2) 58°C + 2.5mM de $MgSO_4$. 3, 4) 54°C + 2.5mM de $MgSO_4$. Carril 5,6) 58°C + 4mM $MgSO_4$. Carril 7,8) 54°C + 4mM de $MgSO_4$.

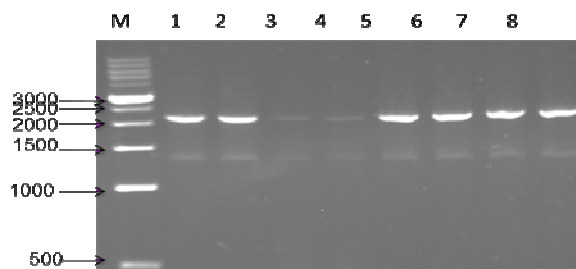


Figura 4.1B. Estandarización del protocolo de PCR para AcTK. M) Marcador de peso molecular. 1,2) 58°C + 2.5mM de $MgSO_4$. 3,4) 54°C + 2.5mM de $MgSO_4$. 5,6) 58°C + 4mM $MgSO_4$. 7,8) 54°C + 4mM de $MgSO_4$.

En la figura 4.1A se pueden observar bandas bien definidas, estas corresponden al tamaño esperado (1200 pb) para el gen que codifica para la AcK deducido a partir de la secuencia reportada en el Genbank. En el caso de la AcTK (Fig. 4.1B) se amplificó la banda de 2142 pb que corresponde para este gen. También se amplificó una banda inespecífica de un menor tamaño (<1500pb) la cual no se consideró en pasos posteriores. Las bandas del tamaño esperado se cortaron

del gel de agarosa, se purificó el DNA y posteriormente se clonaron los fragmentos en el vector para productos de PCR pJET 1.2. Los plásmidos con los insertos ligados se utilizaron para transformar células de *E. coli* TOP10. Se tomaron al azar y se cultivaron 4 transformantes resistentes a ampicilina para extraer el plásmido y analizar el patrón de restricción para los genes de interés. En ambos caso se realizaron dobles digestiones con XhoI y NdeI para liberar el inserto del vector y comprobar que fueran los insertos del tamaño esperado para la AcTK y la AcK (Fig. 4.2).

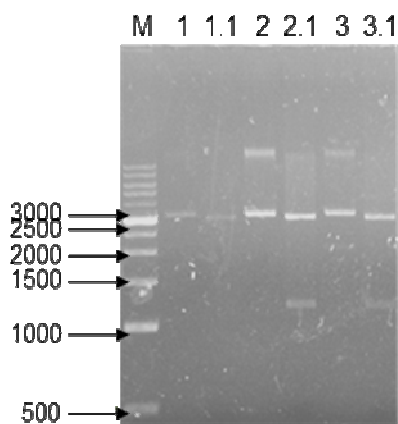


Fig 4.2A Liberación del gen Ack

Carril 1) Marcador de peso molecular. Carril 1, 2 y 3, plásmido sin cortar; carriles 1.1, 2.1 y 3.1 doble digestión del plásmido con NdeI y XhoI

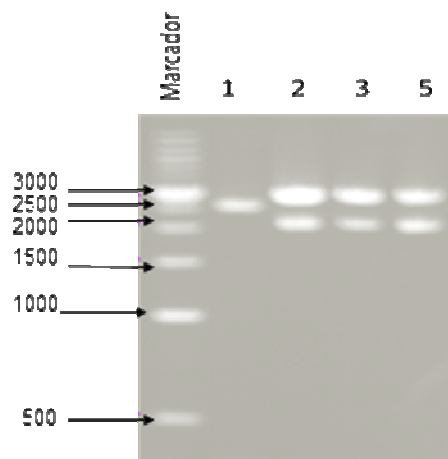


Fig 4.2B. Liberación del gen AcTK.

Marcador de peso molecular. Carril 1, 2, 3 y 5) Doble digestión de los plásmidos con NdeI y XhoI.

En la figura 4.2A que corresponde a las digestiones del gen de la AcK, se puede observar en las carriles 1, 2 y 3 plásmidos sin cortar de las diferentes clonas mientras que los carriles 1.1, 2.1 y 3.1 se muestran las dobles digestiones con NdeI y XhoI. La clona uno no tiene el fragmento de interés, en el caso de las clonas 2 y 3 se logran observar bandas definidas cercanas a los 1200 pb.

La figura 4.2B corresponde a los plásmidos que contienen el inserto de la AcTK. Los carriles del 1 al 5 corresponden a diferentes clonas en las cuales el plásmido se sometió a una doble digestión con NdeI y XhoI para extraer el fragmento

Podemos observar que las clonas del 2 al 4 fueron positivas a esta digestión pues se observan fragmentos de aproximadamente 2000pb que es el tamaño aproximado del gen AcTK.

Una vez que se identificaron las clonas con los plásmidos con los fragmentos de DNA de interés, se seleccionó una clona para cada gen y se analizó el patrón de restricción por medio de triples digestiones (Fig. 4.3)

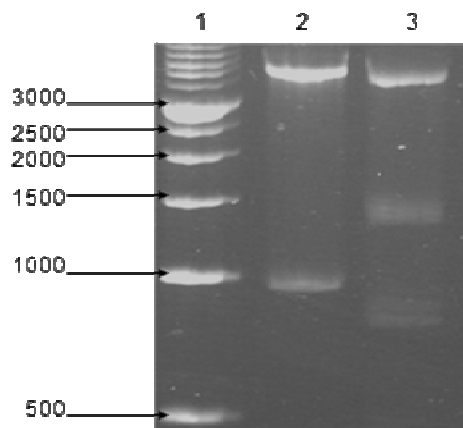


Figura 4.3A Patrón de restricción triple para la AcK.

Carril 1) Marcador. Carril 2) Triple digestión con NdeI , XhoI y Bgl II. Carril 3) Triple digestión con NdeI, XhoI y EcoRV.

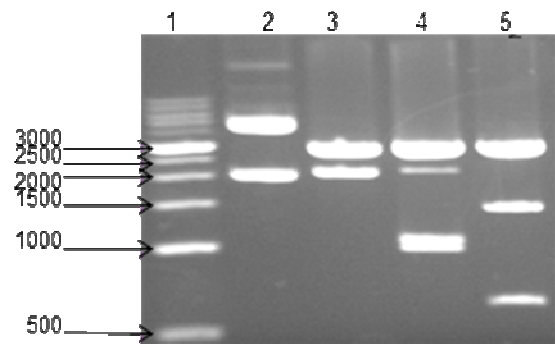


Figura 4.3B Patrón de restricción triple para la AcTK.

Carril 1) marcador de peso molecular Carril 2, 3) Doble digestión con NdeI y XhoI. Carril 4) Triple digestión NdeI, XhoI y BamHI. Carril 5) Triple digestión con NdeI, XhoI y SacI.

En la Fig. 4.3A se observa el patrón de restricción de la AcK. En el carril 2 se liberó el inserto con las enzimas de restricción NdeI y XhoI y se agregó Bgl II que genera 2 fragmentos, uno de 946 pb y el segundo de 233 pb; se puede observar una banda cercana a 1000 pb y el fragmento pequeño se salió del gel. En el carril 3 se utilizó EcoRV para cortar dentro el gen y se espera un fragmento de 798 pb.

En la figura 4.3B se presenta el patrón de restricción para la AcTK. En el carril 2 y 3 del plásmido digerido con NdeI y XhoI se observa la liberación de inserto de interés (banda de 2100pb) y un fragmento de 3000pb correspondiente al vector. En el carril 4 se agregó además a la reacción BamHI que generaría dos bandas de 1035 y 1107, las cuales se observan en el gel. También hay una banda arriba de 2000pb

que podría ser el inserto que no se cortó completamente y a 3000pb observamos el vector. En el carril 5 se observa la triple digestión con Sac I, la cual generaría dos bandas del inserto con 1466 y 676 las cuales se observan en el gel.

De esta manera podemos afirmar que los fragmentos de DNA que amplificamos podrían corresponder a los genes de la AcTK y la AcK, por lo que se procedió a determinar su secuencia de nucleótidos.

4.2 CONFIRMACIÓN DE LOS GENES POR SECUENCIACIÓN DE DNA

Para confirmar que los fragmentos de DNA obtenidos correspondían a los genes de la AcK y a la AcTK se determinó la secuencia de nucleótidos de los insertos presentes en el pJET. Las secuencias obtenidas se tradujeron a secuencias de amino ácidos y éstas se alinearon utilizando el programa BLAST con las secuencias para cada enzima reportadas en el Genbank. El alineamiento de las secuencias para la AcK se muestra en la Fig. 4.4

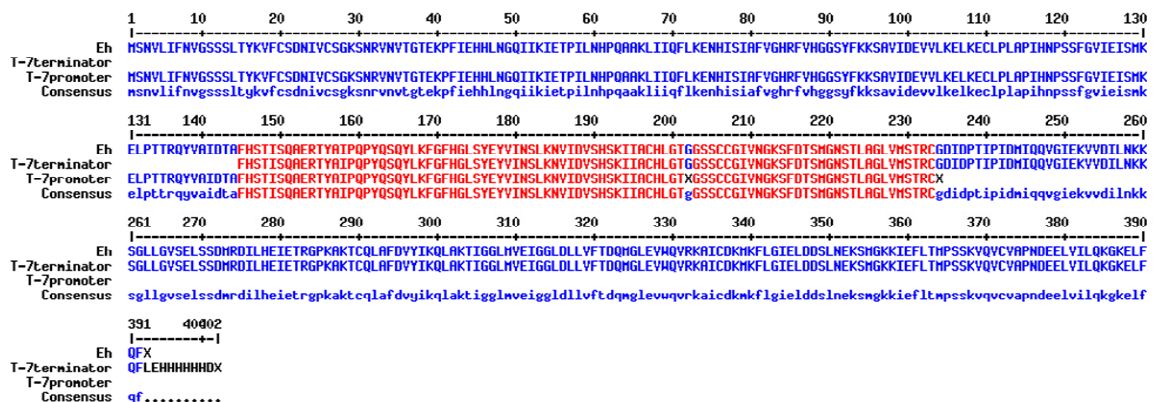


Figura 4.4.- Alineamiento de la secuencia obtenida para la AcK.

T7 terminator y T7 promoter indican los cebadores de los extremos terminales que se utilizaron para la secuenciación.

El alineamiento mostró que el gen amplificado y su secuencia de amino ácidos no presenta diferencia con respecto al reportado en el banco del genoma y se logró obtener y secuenciar el gen completo.

Por otro lado, el análisis de la secuencia de amino ácidos de la AcTK (Fig. 4.5) mostró que existen dos diferencias. La primera se localiza en el amino ácido 13 donde se esperaba una prolina y se amplificó una alanina. El primero es un aminoácido polar sin carga y la alanina es no polar El segundo cambio se encontró en el aminoácido 61 donde se obtuvo glutamina en vez de lisina, los dos son polares pero la lisina tiene carga positiva. Una posible explicación de estos cambios es que pueden deberse a diferencias del aislado del parásito con el que trabajamos con el que se utilizó para secuenciar el genoma.

El posible efecto que puedan tener estos cambios en la estructura no se puede saber, pero posteriormente se encontró que la proteína es funcional por lo que se puede suponer que no afectó a la actividad. Debido al tamaño de este gen no fue posible secuenciarlo completamente, para lo cual se necesitaría de otro oligonucleótido intermedio.

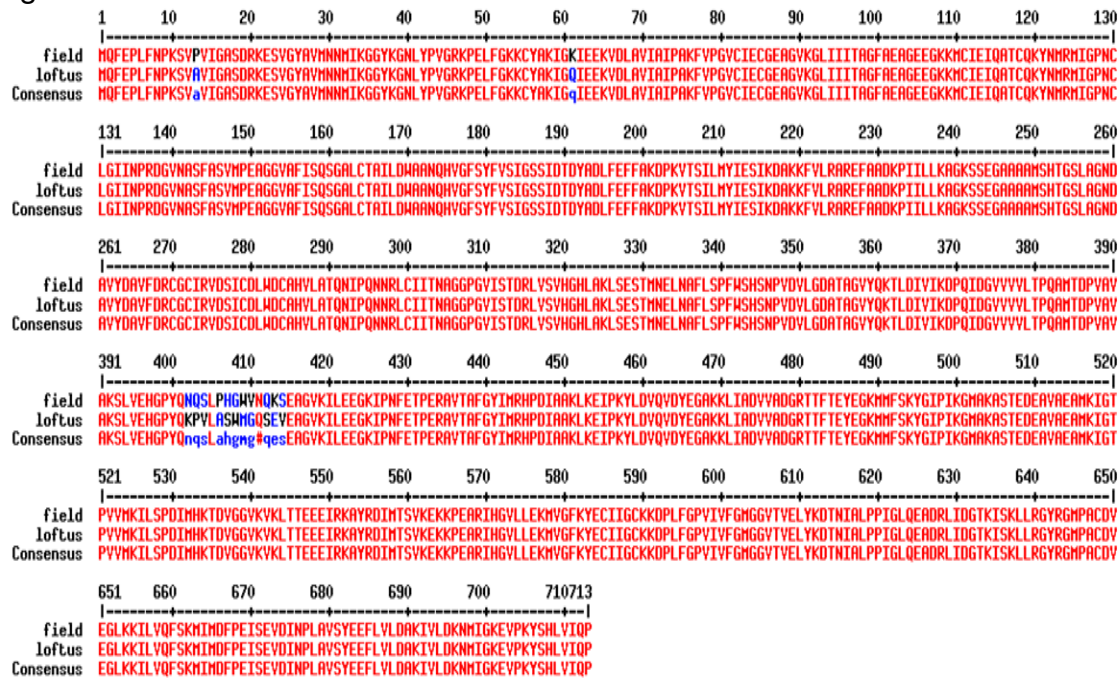


Fig. 4.5. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos obtenida para la AcTK con la reportada en el GenBank .

4.3 SOBREEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN BACTERIAS

Los genes se clonaron en el vector de expresión pET28 y las mezclas de ligación se utilizaron para transformar células TOP10. Se eligieron al azar 5 colonias transformantes para extraer el plásmido y determinar si contenían el gen de interés a través de dobles digestiones.

En la figura 4.6A se observa el gel de las restricciones de los plásmidos para las clonas de la AcK; las clonas 2 y 4 presentaron el gen clonado. En la figura 4.6B se muestra el gel con las restricciones del plásmido de la AcTK obtenido de cinco transformates, en este se ve que los plásmidos de todas las clonas seleccionadas contienen el gen de interés.

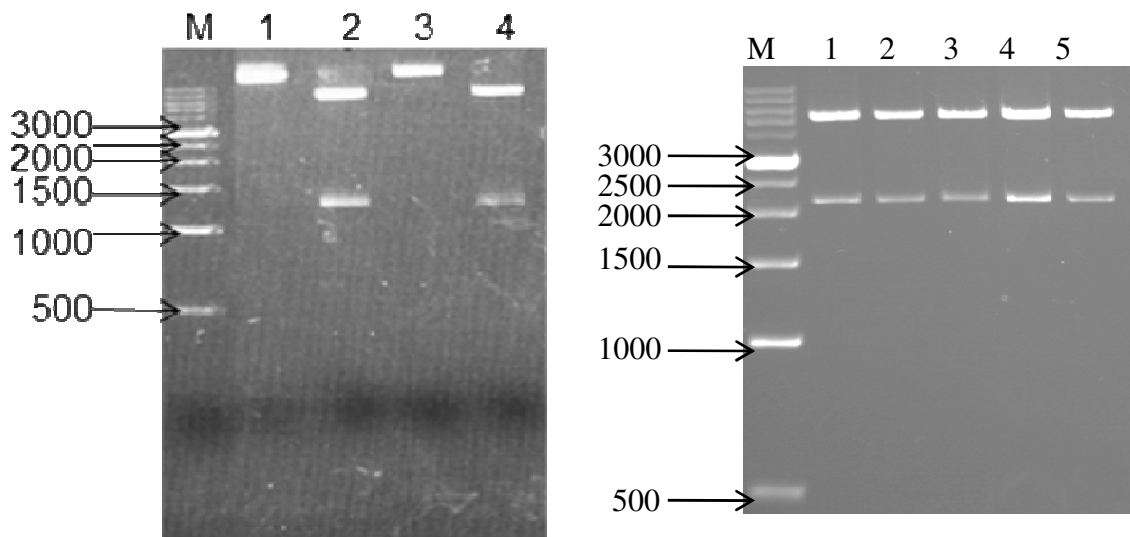


Figura 4.6A Detección de gen de AcK en el vector pET28.

Carril 1) Marcador de peso molecular 1Kb. Carril del 2 al 5) Doble digestión con NdeI y XhoI.

Figura 4.6B Detección del gen de AcTK en pET 28.

Carril 1) Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 2-6) doble digestión con NdeI y XhoI.

De las clonas que contenían el gen de interés, se seleccionó una para cada gen, se purificó el plásmido y se utilizó para transformar bacterias *E. coli*. BL21(DE3) para sobre expresar a las proteínas. Se seleccionaron 10 clonas para determinar si expresaban las proteínas de interés. Se sembraron en medio LB líquido +

kanamicina (30µg /mL) y se indujo la sobre expresión con IPTG como se describió en la metodología. Se analizaron por electroforesis en geles de acrilamida las proteínas de alícuotas de los cultivos para determinar si se expresaban las proteínas de interés.

4.3.1 sobreexpresión de la AcTK

De acuerdo a la secuencia de aminoácidos para la AcTK el peso esperado, tomando en cuenta la cola de histidinas que el vector pET28 le agrega a la proteína, es de 77.5 KDa. En la figura 4.7 se observa una banda más intensa de menos de 76 KDa en las colonias 5 y 6. La diferencia en el tamaño aparente de la proteína se puede deber a una migración anómala de la proteína o del estándar de peso molecular.

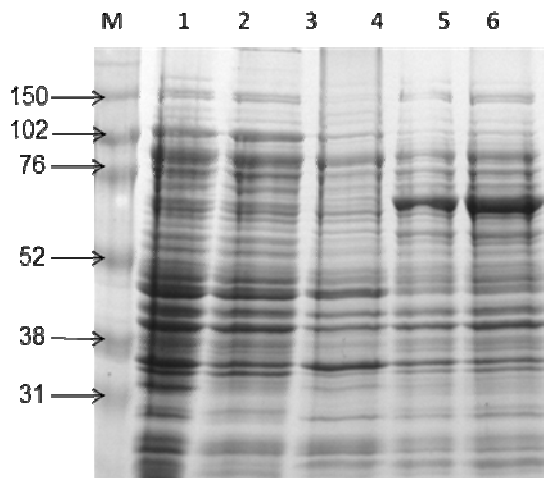


Figura 4.7 Clonas que sobreexpresan a la AcTK. Marcador de peso molecular. Carriles 1-6) Diferentes clonas crecidas a 25°C toda la noche a las que se indujo la expresión de la proteína

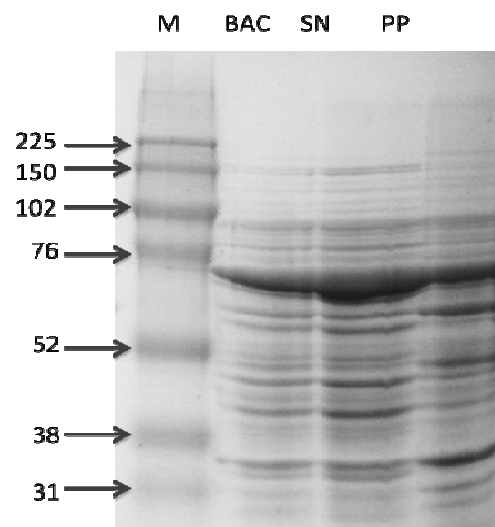


Figura 4.8 Determinación de la solubilidad de la AcTK sobreexpresada M, Marcador de peso molecular. Bac, lisado total de bacterias BL21(DE3) sobreexpresantes. SN, sobrenadante del lisado después de centrifugar. PP, precipitado del lisado después de centrifugar.

Una vez que se determinó cuáles colonias estaban sobre-expresando a la AcTK se determinó si la proteína se encontraba de manera soluble o insoluble. Se seleccionó una colonia y se cultivó en medio LB líquido de acuerdo al protocolo de expresión descrito arriba. Las bacterias se cosecharon, sonicaron y centrifugaron para separar la fracción soluble de la fracción insoluble. En la figura 4.8 se observa que la AcTK se expresa principalmente de manera soluble, aunque una fracción menor se va al precipitado.

4.3.2 Sobreexpresión de la AcK

La sobreexpresión de la AcK se complicó ya que al escalar el cultivo a volúmenes mayores de 50 mL, las bacterias se morían o no se expresaba una banda definida a la altura de los 45 kDa, de acuerdo al peso molecular de la proteína considerando la cola de histidinas. Además de que la poca proteína que se sobre-expresaba lo hacía mayoritariamente en el precipitado, por lo que su purificación tendría menor rendimiento. Por lo tanto, se tuvo que inducir a las bacterias en diferentes tiempos y temperaturas como se mencionó en la metodología.

En la Fig. 4.9A se muestran las proteínas de lisados totales bacterianos que expresan a la AcK y que se indujeron a 25°C. En los carriles 1 y 2 se corrieron proteínas de peso conocido como marcadores (PGK: 47 KDa y ALDO 39 KDa), en el tercer carril se colocó a una muestra de AcK previamente purificada pero con problemas de sobreexpresión; en los siguientes carriles están las bacterias, el sobrenadante y el precipitado de bacterias inducidas, cosechadas y lisadas a 3 y 6 horas. En este gel se puede apreciar una banda de sobreexpresión a un tiempo de tres horas, la cual ya no se observa a las seis horas.

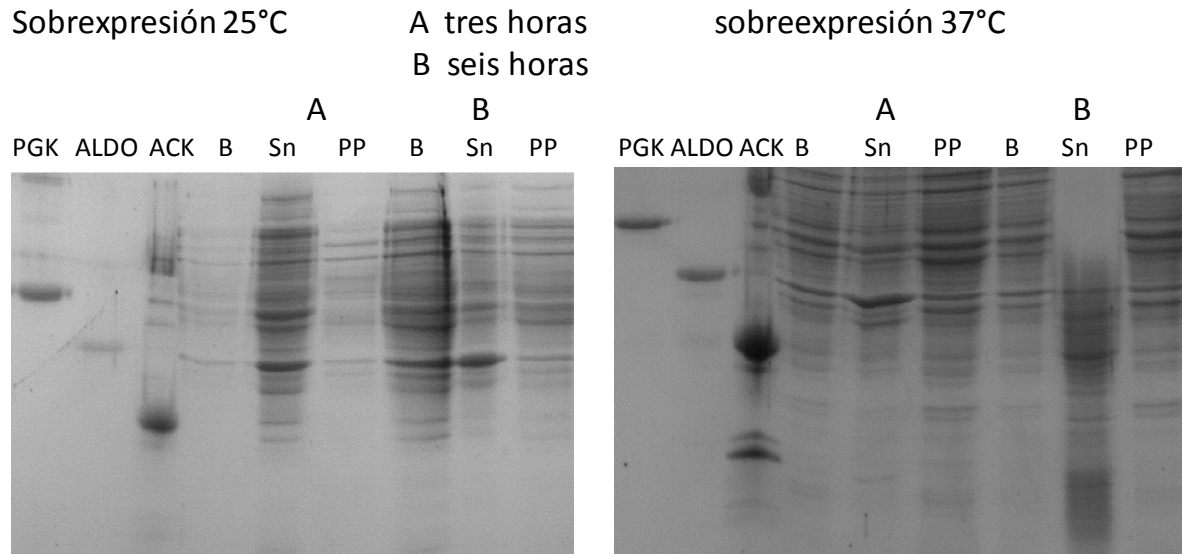


Figura 4.9 Comparación de la sobreexpresión de la AcK de cultivos bacterianos sometidos a diferentes tiempos y temperaturas.

En la Fig. 4.9 se muestra la sobre expresión a 37°C. Como podemos observar, a tres horas de sobreexpresión se observa que la proteína se expresa preferentemente de manera soluble, no así a las 6 horas de inducción en donde ya no se observa banda de la AcK. De acuerdo con los resultados anteriores se eligió realizar la sobre expresión a 37°C por 3 hrs.

4.4 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Una vez que se determinaron los tiempos de inducción adecuados y que las enzimas se sobre expresaban de manera soluble, se realizó la purificación de las mismas.

4.4.1 Purificación de la AcTK

En la figura 4.10 se muestra la marcha de purificación para la AcTK. En el primer carril se observa a la PPI-PFK de amiba que sirvió como marcador de peso molecular (64 KDa), en el segundo carril se observan las bacterias en las que se

muestra que la proteína se está sobre expresando de manera abundante, tanto así que una fracción de la misma se está yendo al precipitado. Casi toda la proteína se unió a la resina, pues o se aprecia una banda intensa del tamaño de la AcTK en el carril del eluído (carril F); con el lavado de buffer de 10 mM imidazol se empieza a despegar la proteína, sin embargo, una gran proporción se eluye con el buffer con 100 mM de imidazol. La proteína recombinante se obtuvo con pureza mayor al 90 % y un rendimiento 15mg/250mL de cultivo.

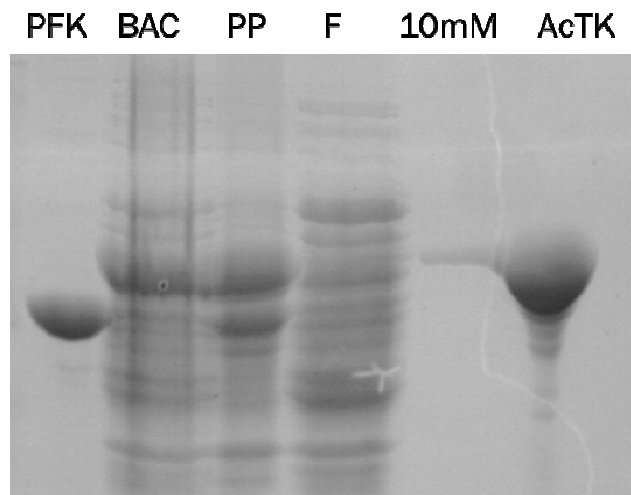


Figura 4.10 Marcha de Purificación de la AcTK.

PFK, marcador de 64 kDa; BAC, lisado total de bacterias; PP, precipitado del lisado celular; F, fracción que no se unió a la columna 10mM, lavado con buffer 10 mM imidazol; AcTK. Enzima purificada.

4.4.2 Purificación de la AcK

En la figura 4.11 se muestra la marcha de purificación de la AcK. En los primeros dos carriles del gel se aprecian las bandas correspondientes a las enzimas que se utilizaron como marcador de peso molecular la PGK (47 KDa) y la ALDO (39 KDa); en el carril marcado con bac están las bacterias que sobre expresan a la proteína, es importante destacar que el nivel de sobre expresión es muy bajo, de hecho no se alcanza a apreciar una banda más intensa en esta muestra y la mayor parte de la proteína se encuentra de manera insoluble en el precipitado (PP). Para

esta purificación se hicieron lavados con 10 y 50 mM de imidazol para eliminar contaminantes; sin embargo, la proteína eluída se obtuvo enriquecida con un grado de pureza bajo (< 50%) y con un rendimiento muy bajo (0.18mg/250mL de cultivo).

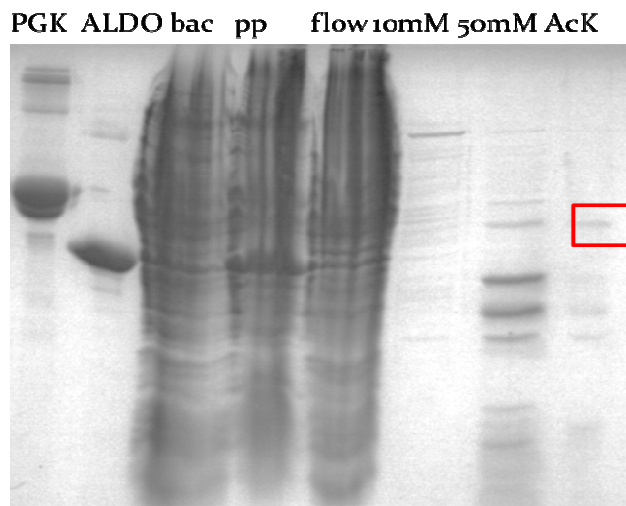


Fig. 4.11 Marcha de purificación de la AcK

PGK y ALDO marcadores de peso molecular; bac, bacterias sobreexpresantes; PP, precipitado después de centrifugar el lisado bacteriano. Flow. Fracción del sobredante que no se unió a la resina; 10mM, lavado con buffer de 10mM de imidazol; 50mM. lavado con buffer con 50mM de imidazol, AcK. Enzima purificada

En conclusión, se obtuvo a la AcTK con un grado de pureza alto, mientras que la AcK, a pesar de que se realizaron muchos esfuerzos por obtenerla de manera más pura y estable, no se pudo mejorar ni el rendimiento ni su pureza. Sin embargo, su enriquecimiento nos permitió realizar los ensayos cinéticos.

Una vez que se obtuvieron ambas enzimas recombinantes se procedió a la caracterización cinética de las mismas. A continuación se describen los resultados obtenidos para cada una de ellas.

4.5 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA AcK

4.5.1 Dependencia de la actividad con el pH

Se determinó la actividad de la AcK a diferentes pHs con el fin de establecer el pH óptimo de la enzima (Fig. 4.12).

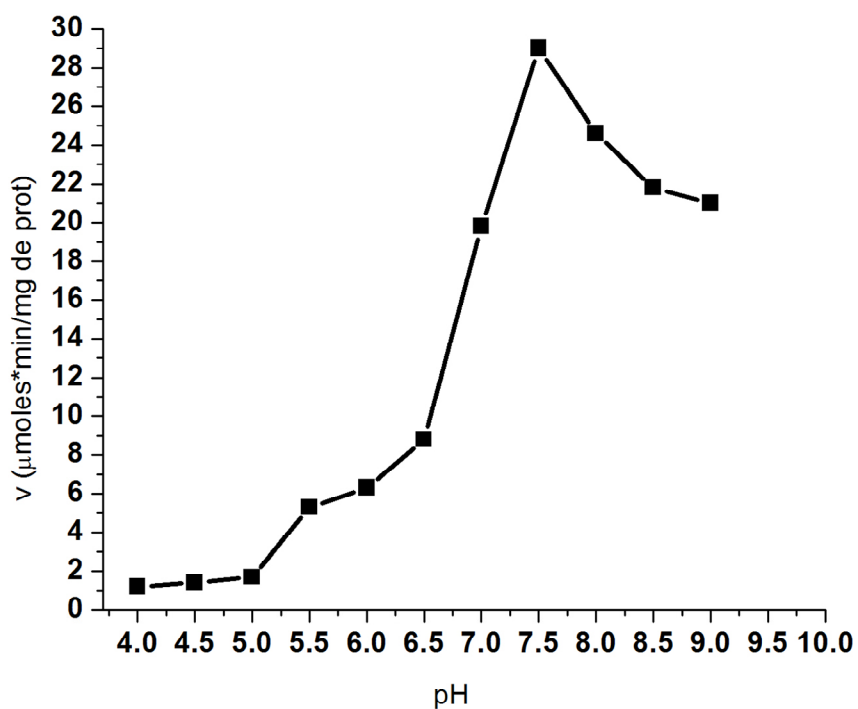


Fig. 4.12. Perfil de pH para la AcK en la reacción directa.

La actividad se determinó en una mezcla de buffers de 25 mM Mes y 25 mM Mops ajustada a diferentes pHs.

El pH óptimo de la AcK en la reacción directa es de 7.5, alcanzado una velocidad máxima (V_{max}) de 30 $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína. El pH del citosol de amiba oscila entre 6 y 7 por lo que la AcK estará trabajando por debajo del 35% de su V_{max} a pH 6.0 y cerca del 70% a pH 7.0. También se puede sugerir que en el sitio catalítico de esta enzima existe una cisteína ya que su pKa es de 8.0, y probablemente también está involucrada una histidina con pKa de 6.0.

4.5.2 Parámetros cinéticos

La actividad de esta enzima en la reacción directa se determinó utilizando acetil-P y Pi como sustratos y monitoreando la producción de PPI con la EhPPI-PFK recombinante. En el ensayo se agregó hasta el final a la AcK y después al Pi, para poder determinar con especificidad la actividad de la AcK (Fig. 4.13). Con esta estrategia nos aseguramos que aún cuando la AcK que obtuvimos no tiene un alto grado de pureza, la actividad que se mide es específica de la AcK amibiana pues en el ensayo, esta enzima es la única reportada que genera PPI a partir de acetil-P y Pi.

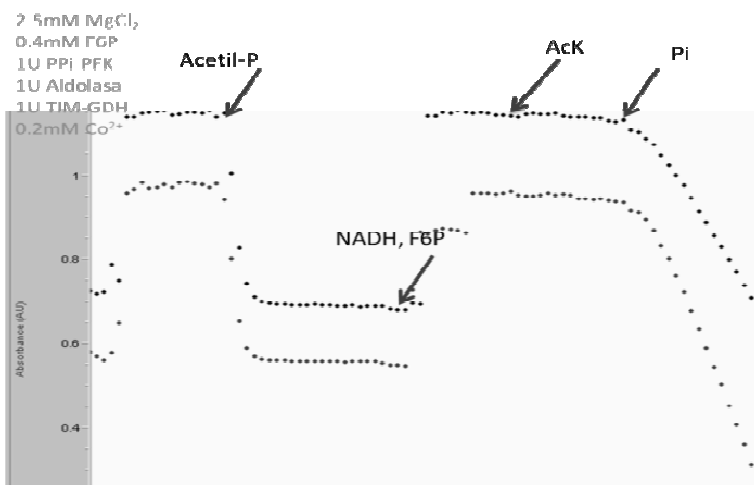


Figura 4.13. Estandarización del ensayo enzimático de la AcK en la reacción directa

El ensayo contenía 1 mM acetil-P, 2.5 mM MgCl_2 , 0.4 mM F6P, 1U PPI-PFK, 1U Aldolasa, 1U TIM-GDH, 0.2 mM Co^{2+} , 0.19 mM NADH y 30 μg de AcK. La reacción se inició con la adición de 20 mM Pi

En la figura 4.14 se muestran las gráficas de saturación por sustratos para el acetil-P y el Pi determinadas a pH 6.0 y 7.0. Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación de una hipérbola ($Y = P_1 * X / P_2 + X$), la cual es interpretada como una representación de la ecuación de Michaelis-Menten ($V_0 = V_{max} * [S] / K_m [S]$). El programa que se utilizó fue el Origin Microcal Pro 8.

La cinética de la enzima con los dos sustratos tiene un comportamiento típicamente Michaeliano. Haciendo uso del ajuste se determinaron los valores de V_{max} y K_m para cada sustrato a ambos pHs.

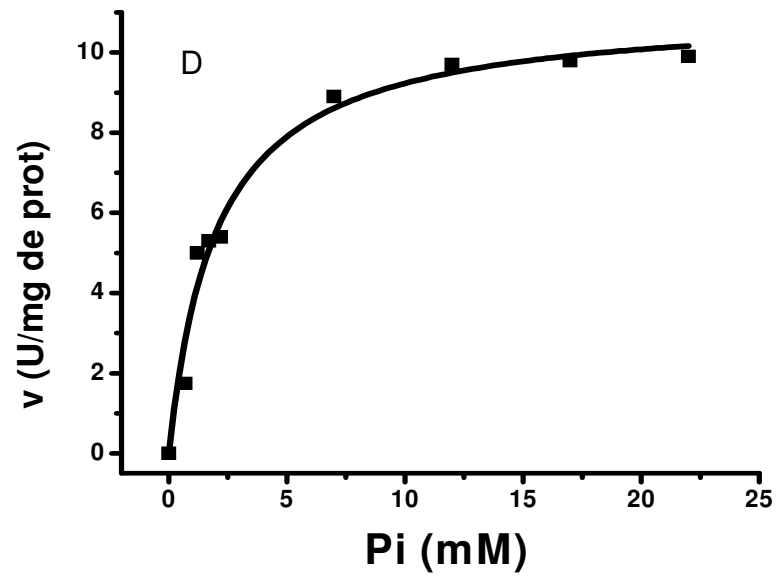
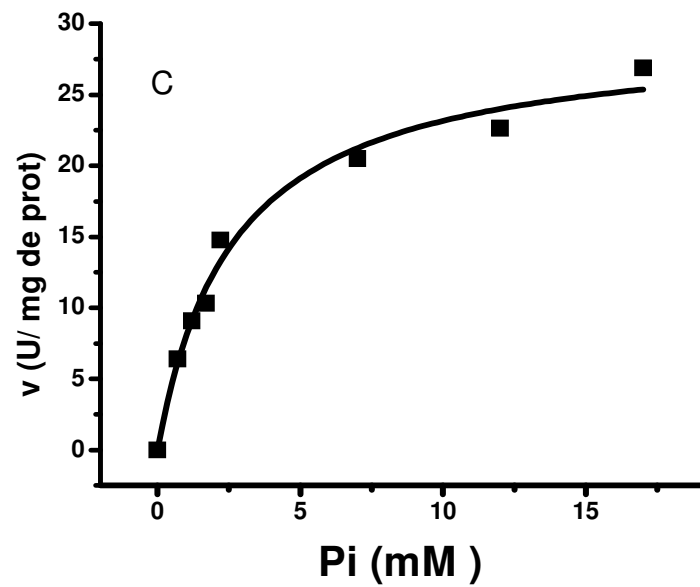
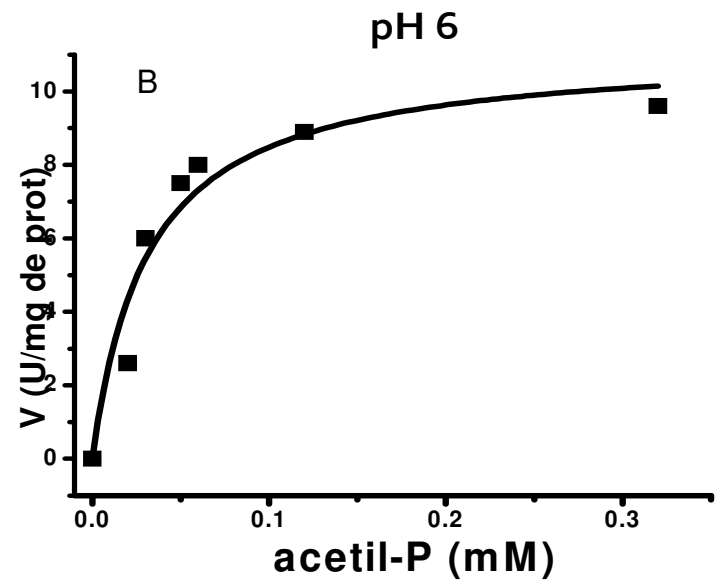
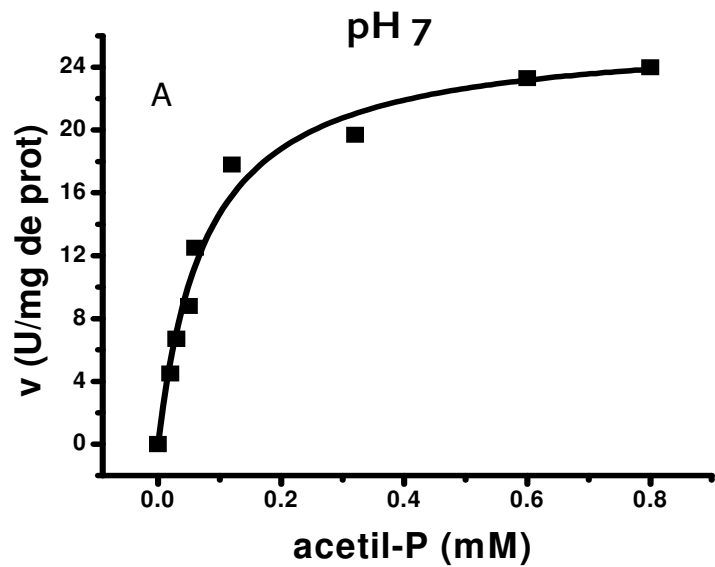


Fig. 4.14. Cinéticas de afinidad de la AcK por los sustratos acetil-P y Pi.

A y C pH 7; B y D pH 6 en sentido forward de la reacción. El ensayo contenía los componentes descritos en el pie de la Fig. 4.13 y los sustratos se variaron en las concentraciones indicadas.

En la Tabla 4.1 se muestra el resumen de los parámetros cinéticos determinados la AcK recombinante.

Así mismo, en condiciones de saturación de los sustratos, se determinó la actividad de la enzima en extractos amibianos utilizando 100 mg de fracción citosólica de trofozoítos.

Tabla 4.1. Resumen de los parámetros cinéticos para la AcK de *E. histolytica* recombinante y en extractos amibianos

*V*_{max}: μmol/min x mg prot. *K*_m: mM. *V*_m/*K*_m mL/min * mg de prot. NM: no medido. ND: No detectado Reportado por *Reeves 1975. # Fowler et al, 2012 y Saavedra et al 2007.

AcK			
FW recombinante			
	pH 6	pH 7	Reportado
<i>V</i> _{max}	26±3	14±6	-----
<i>K</i> _m _{acetil-P}	0.07±0.02	0.02±0.07	0.06*, 0.5#
<i>K</i> _m _{P_i}	2.6±0.2	2.2±0.5	2.2*, 48.9#
<i>V</i> _{max} / <i>K</i> _m	700	341.7	-----
No se detecto actividad en la reacción reversa			
Extractos amibianos			
<i>V</i> _{max}	0.048±0.05	0.026±0.07	0.6#
[P _i]	NM		5.4mM&
[acetil-P]	ND		-----
[PP _i]	NM		0.5mM&

La *V*_{max} disminuyó al 50% a pH 6.0 mientras que la afinidad por los dos sustratos no se afectó de manera significativa por el pH. Los valores de *K*_m que se obtuvieron son muy similares al de la enzima nativa purificada del parásito reportado por Reeves (Reeves, 1975), pero existe un orden de magnitud de diferencia con los reportados más recientemente por Fowler y colaboradores (Fowler 2012) para la enzima recombinante. Esta diferencia puede deberse a que nosotros y Reeves utilizamos un sistema enzimático acoplante para medir la actividad, mientras que el

otro grupo utilizó un ensayo colorimétrico que detecta la formación de Pi que pudo ser menos sensible.

En cuanto a la eficiencia catalítica podemos decir que es más eficiente a pH 7.0, esto concuerda con el pH óptimo de la enzima pH 7.5.

Se evaluó la actividad de la enzima en la dirección reversa por medio de un sistema acoplado a la formación de Pi, sin lograr detectar actividad alguna lo que coincide con las observaciones previas hechas por Reeves (Reeves et al, 1975). Por lo tanto la reacción de síntesis de acetil-P a partir de acetato no está favorecida para la enzima de amiba

4.5.3 Actividad de AcK y concentración de sus sustratos en trofozoítos

En la Tabla 4.1 se indican las velocidades de la AcK determinadas en la fracción citosólica de los trofozoítos las cuales son relativamente bajas con respecto a la mayoría de las enzimas glucolíticas del parásito previamente reportados (Saavedra et al, 2007). De manera similar al comportamiento de la enzima semi-purificada, la actividad de la AcK en el extracto disminuye al bajar el pH de 7.0 a 6.0. Es importante resaltar que con estos datos se demuestra que la AcK está activa en los trofozoítos amibianos.

La concentración de Pi en extractos amibianos es de 5 mM (Saavedra et al. 2007) por lo que la enzima podría estar trabajando cerca de dos valores de K_m en condiciones fisiológicas en amiba lo que nos dice que con respecto a este sustrato no estará saturada.

Utilizando la AcK recombinante se determinó en extractos ácidos neutralizados de trofozoítos la presencia de acetil-P y no se pudo detectar. No se ha identificado en el genoma de amiba algún gen que codifique para una enzima que sintetice este metabolito tal como la fosfoacetilasa. Otra explicación es que si se

sintetiza de alguna manera, la AcK puede consumirlo rápidamente de tal manera que no se pueda detectar.

Con estos resultados se puede concluir que *E. histolytica* contiene un gen que codifica para una proteína funcionalmente activa de AcK. Su función fisiológica queda por determinarse debido a que su sustrato acetil-P puede ser limitante.

Se puede especular que una probable función de la AcK es cuando el parásito está en presencia y fagocita bacterias, las cuales tienen un alto contenido de acetil-P, lo cual requeriría nueva experimentación.

4.6 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA ACETATO TIOCINASA (AcTK)

4.6.1 Dependencia de la actividad con el pH

El primer paso fue determinar el pH óptimo para esta enzima. En la figura 4.15 se muestra la actividad al variar el pH.

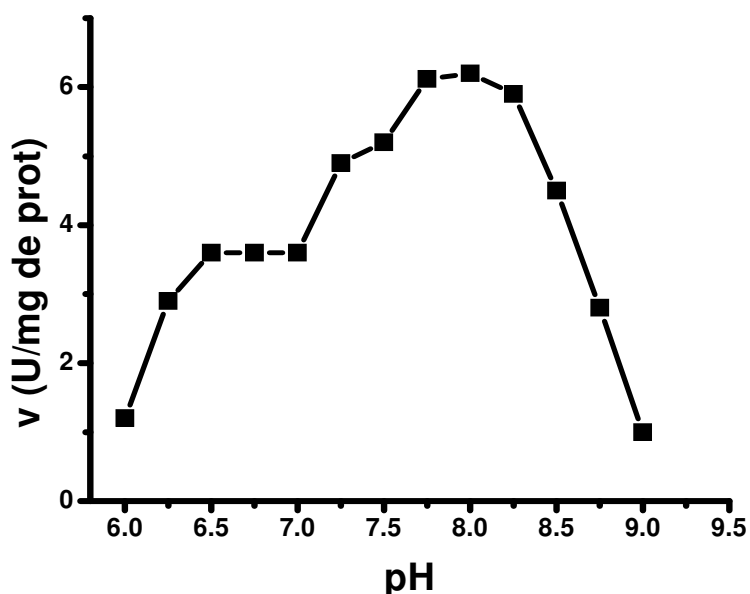


Figura 4.15. Perfil de actividad con respecto al pH para la AcTK en la reacción directa.

La actividad se determinó en la mezcla de buffers 25 mM Mes y 25 mM Mops ajustada a diferentes pHs.

Se puede apreciar que el pH óptimo de la enzima se encuentra entre 7.5 y 8.0. En el intervalo fisiológico de pH en amiba (6.0 – 7.0) la enzima se encuentra trabajando entre el 20% y 50% de su velocidad a pH óptimo. De acuerdo a los pKa que se distinguen en la gráfica, se puede sugerir que los aminoácidos involucrados en la catálisis podrían ser una cisteína y una histidina.

4.6.2 Parámetros cinéticos

Para obtener los valores de K_m por los diferentes sustratos se realizaron las curvas de saturación respectivas. Los datos experimentales se procesaron en el programa Origin Microcal Pro 8 y se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten.

En la Fig. 4.16 se observan las curvas de saturación de la enzima en la reacción forward para los sustratos ADP y acetil-CoA a pHs en el intervalo fisiológico mientras que la Fig. 4.17 muestra las curvas de saturación para el Pi.

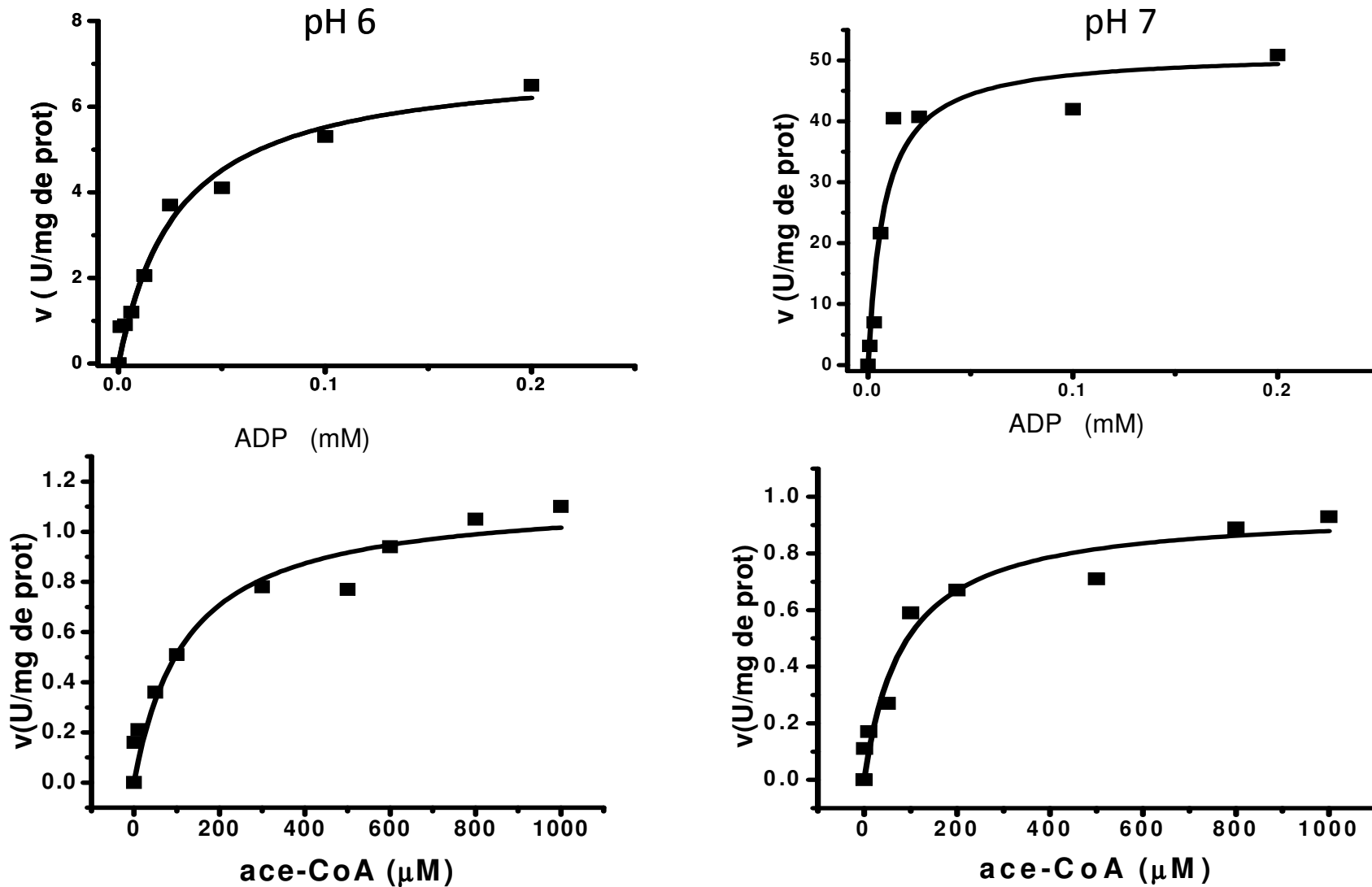


Figura 4.16. Afinidad por ADP y acetyl-CoA en dirección forward de la AcTK se borró el ADP de los
 El ensayo enzimático contenía buffer 25mM Mes, 25mM Mops pH 6 y 7, 0.1 mM DTNB, 5 mM MgCl₂ y 30 μg de enzima. Excepto los metabolitos indicados que se varió su concentración, los co-sustratos en cada ensayo se mantuvieron constantes y saturantes a las siguientes concentraciones: 0.8 mM acetyl-CoA, 1 mM ADP y 20 mM Pi.

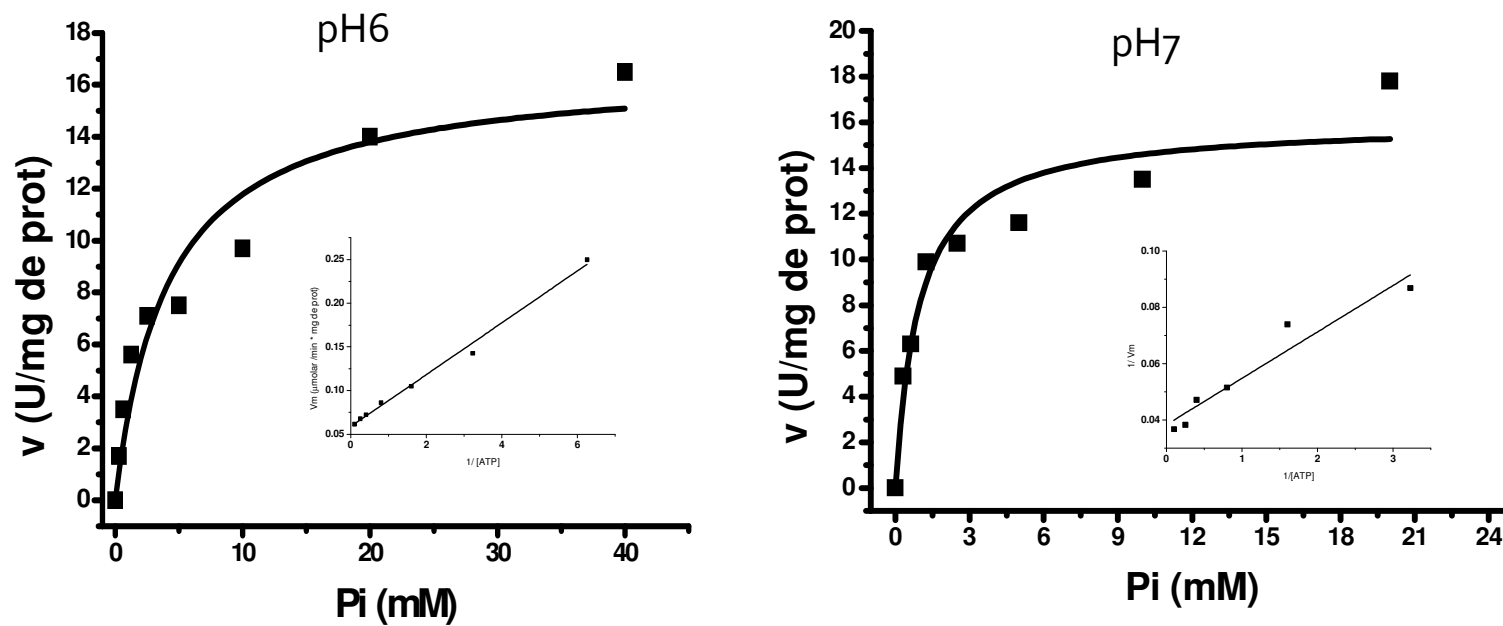


Figura 4.17. Afinidad por el P_i de la AcTK. Ver leyenda de la Fig. 4.16 para más detalles

En general, se observó un comportamiento hiperbólico para los tres sustratos a los dos pHs. Sin embargo, se hizo un análisis complementario para determinar la existencia de más componentes por medio de gráficas de doble recíprocos (insertos en las Figs. 4.16 y 4.17). Estas gráficas se ajustaron a una línea recta ($y = mx + b$) como una representación de Lineweaver-Burke:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

donde:

v =velocidad inicial.

K_m = afinidad por el sustrato.

V_{max} = velocidad máxima.

$[S]$ = Concentración del sustrato.

Para todos los metabolitos medidos no se hallaron dobles componentes

También se determinaron los parámetros cinéticos en la reacción reversa para los sustratos acetato, CoA y ATP (Figs. 4.18 y 4.19)

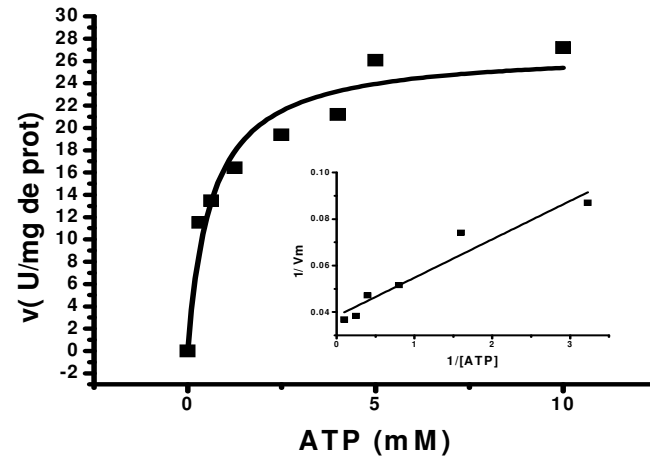
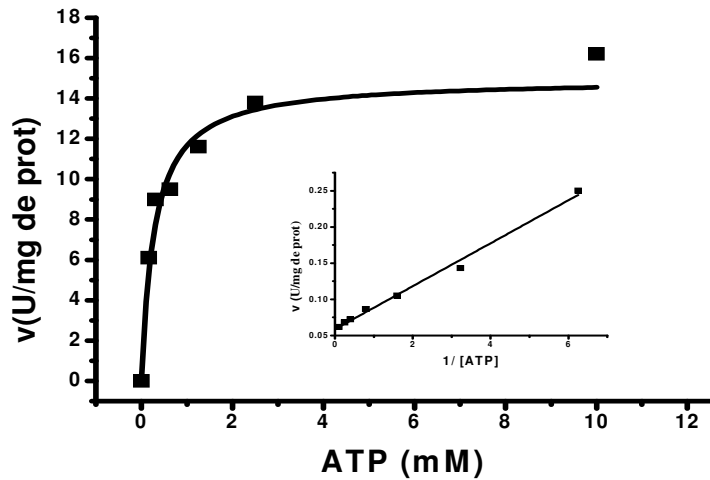
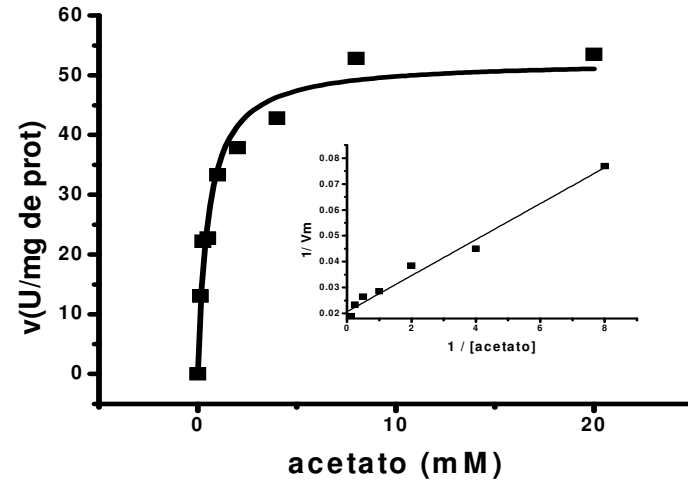
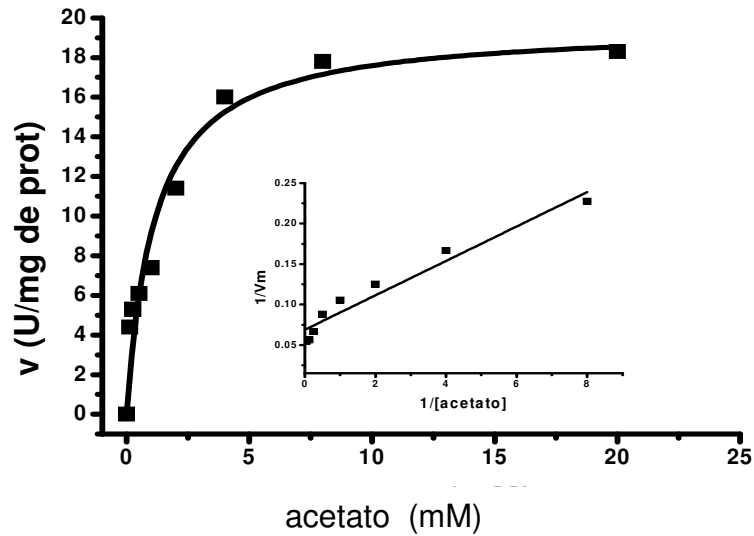


Fig. 4.18 Afinidad por el acetato y el ATP en la dirección reversa de la AcTK.

El ensayo se realizó en buffer 25mM Mes-25 mMops al pH indicado y de acuerdo al protocolo descrito en la sección de metodología.. Excepto cuando se varía el metabolito indicado, los co-sustratos se mantuvieron a las siguientes concentraciones: constantes y saturantes 2 mM de acetato, 0.4 mM de CoA, 2 mM de ATP.

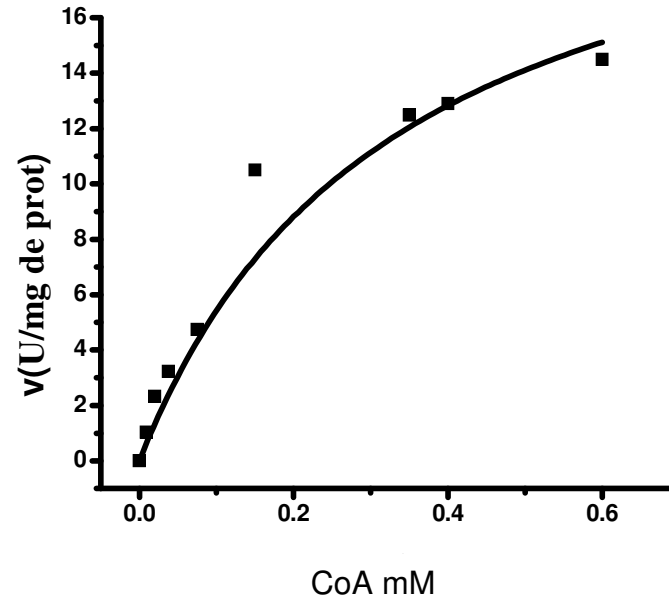
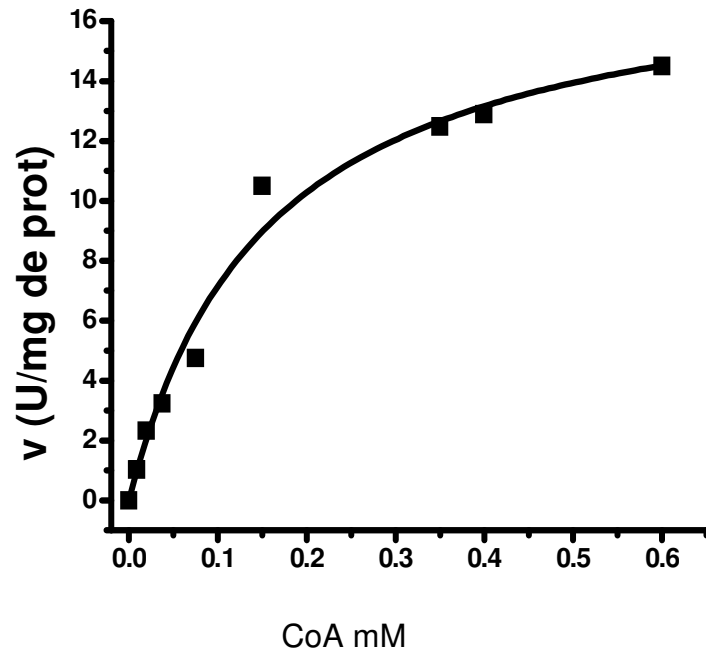


Fig. 4.19. Afinidad la CoA en la dirección reversa de la AcTK.
 Ver leyenda de la Fig. 4.18 para detalles

Las curvas de saturación tienen un comportamiento hiperbólico y los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten.

En la Tabla 4.2 se indica el resumen de los parámetros cinéticos en las reacciones directa y reversa de la AcTK.

Tabla 4.2 Resumen de los parámetros cinéticos de la AcTK.

V_{max}: μmol/min x mg prot. *K_m*: mM. *V_{max}/K_m*: mL/min * mg de prot. . NM: no medido. ND: No detectado

Enzima recombinante					
Reacción directa			Reacción reversa		
	pH 6.0	pH 7.0		pH 6.0	pH 7.0
<i>V_{max}</i>	14±4	24±4	<i>V_{max}</i>	16±3	20±3
<i>K_m_{acetil-CoA}</i>	0.14±0.04	0.13±0.03	<i>K_m_{acetato}</i>	1.3±0.2	0.8±0.1
<i>K_m_{ADP}</i>	1.9±0.7	0.9±0.3	<i>K_m_{ATP}</i>	0.6±0.06	0.3±0.07
<i>K_m_{Pi}</i>	2.7±1	1.8±0.3	<i>K_m_{CoA}</i>	0.4±0.1	0.2±0.04
<i>V_{max}/K_m_{acetil-CoA}</i>	98	186	<i>V_{max}/K_m_{acetato}</i>	12	26
pH óptimo 8.0					
Enzima en el trofozoíto					
<i>V_{max}</i>	0.016±0.002	0.15±0.05	<i>V_{max}</i>	0.012±0.003	0.14±0.02
Concentración de metabolitos					
	reportado	Obtenido		reportado	obtenido
acetil-CoA	0.6 [#]	0.086±0.08	acetato intracelular	-----	ND
ADP	3.3 ^{&}	3.4±0.2	ATP	5 ^{&}	5.4±1.0
Pi	5.4 ^{&}	NM	CoA	0.02 [#]	0.045±0.02

Reportado por *Reeves 1975. Saavedra et al 2007.

De acuerdo a la Tabla 4.2, la *V_{max}* de la enzima recombinante en ambas direcciones es muy similar y disminuye ~50% al cambiar el pH de 7.0 a 6.0, como se observó en la curva de pH. De manera interesante, en los extractos citosólicos la

V_{max} disminuyó 10 veces a pH 6.0. Los valores de K_m por los sustratos en cada sentido de la reacción no variaron de manera significativa a los dos pHs. La eficiencia catalítica es mayor en el sentido de síntesis de acetato

La mayor eficiencia catalítica hacia la formación de acetato sugeriría que es el sentido fisiológico en la glucólisis amibiana. Para explorar esta hipótesis se determinaron las concentraciones de los sustratos en ambos sentidos de la reacción. Las concentraciones de acetil-CoA, ADP y Pi de la reacción forward son de al menos dos valores de K_m para cada uno de ellos, no así para los sustratos en el sentido reverso, en donde la concentración de CoA dentro del parásito es 10 veces menor al valor de K_m por este metabolito. Algo similar ocurre con el acetato, el cual al ser expulsado del parásito su concentración debe estar por debajo del límite de detección del ensayo. Estos datos sugieren que en condiciones fisiológicas la enzima sintetizaría preferentemente acetato.

El grupo en el que trabajo ha reportado que el producto principal de la glucólisis amibiana es el etanol, con un flujo de 20-30 nmoles/min x mg de proteína comparado con 3-4 nmoles de acetato/min x mg de proteína. Con los datos cinéticos obtenidos para la AcTK se puede explicar esta diferencia en los flujos a nivel de la competencia de la AcTK y la ADHE por el acetil-CoA para la formación de acetato y etanol, respectivamente. La K_m por acetil-CoA de la AcTK es 0.14-0.13 mM y aunque la concentración intracelular de este metabolito es 3 veces mayor al valor de K_m , ya se ha reportado que la ADHE tiene una afinidad por este metabolito de 0.020 mM, lo que puede que se favorezca la reacción hacia la síntesis de etanol.

Así mismo, el poco flujo de síntesis de acetato a partir de la acetil-CoA por la AcTK descarta la hipótesis generada por otros grupos de trabajo, la cual propone que la reacción de la AcTK es una fuente importante de ATP para *E. histolytica* (Clark et al. 2007). Por lo tanto, deben existir otras razones fisiológica que expliquen la función de la AcTK.

5.0 DISCUSIÓN GENERAL

La glucólisis en *E. histolytica* es la única fuente de obtención de ATP en amiba y datos publicados por nuestro grupo de trabajo indicaron que el etanol es el principal metabolito producto de la degradación de la glucosa, con un poca producción de acetato. Sin embargo, poco se sabe acerca de la función fisiológica del acetato por amibas y esta tesis pudo aportar datos cinéticos y metabólicos del metabolismo del acetato en el parásito.

Reeves reportó que en cultivos axénicos y monoxénicos en condiciones anaerobias *E. histolytica* es capaz de sintetizar acetato mientras que en condiciones aerobias el parásito solamente puede sintetizarlo en cultivos monoxénicos . Recientemente nuestro grupo de trabajo reportó (Pineda et al, 2010) que la alcohol deshidrogenasa bifuncional, que es la enzima encargada de la formación de etanol en esta vía, se inhibe parcialmente en condiciones aerobias haciendo que se acumule al acetyl-CoA; al contrario, la AcTK no es sensible a inhibición por una condición de aerobiosis. Por lo tanto, una hipótesis que surge del estudio de la AcTK es que el flujo a través de la enzima podría incrementarse y producir el acetato con el consiguiente reciclamiento de la CoA necesaria para que la glucólisis no se detenga a nivel de la PFOR por falta de esta coenzima.

Por otro lado, varios autores han propuesto que la AcTK de la amiba puede funcionar para sintetizar ATP extra al producido en la glucólisis. Los datos derivados de esta tesis indican que el trofozoíto tiene una alta actividad de AcTK (160 nmoles/min*mg prot) que excede el flujo de acetato (3-5 nmoles acetato/min*mg prot). Sin embargo, la afinidad de la AcTK (0.14 mM acetyl-CoA) es 10 veces menor que la afinidad de la ADHE por el mismo metabolito (0.015 mM), por lo que a pesar de que de esta última hay menor actividad en la célula (75 nmoles/min*mg de prot) el flujo de etanol estaría favorecido. Por lo tanto, los datos cinéticos obtenidos en esta tesis ayudan a explicar porqué es menor el flujo de acetato en la amiba.

Por otro lado, la otra forma de sintetizar acetato en amiba es con la AcK. La actividad de esta enzima en los trofozoítos es de 48 nmoles/min*mg de prot y tiene alta afinidad por sus sustratos. Sin embargo, la concentración de acetil-P en amibas axénicas no se pudo detectar lo cual puede tener dos explicaciones i) la AcK es muy eficiente y no permite que se acumule el metabolito en la célula o ii) se sintetiza en poca cantidad a través de reacciones aún desconocidas. Estas hipótesis pueden explorarse experimentalmente en estudios posteriores. Sin embargo, la AcK pudiera tener una función fisiológica en cultivos monoxénicos o *in situ* en el tracto gastrointestinal ya que la enzima puede obtener el sustrato a partir de la fagocitosis de bacterias las cuales contienen altas concentraciones de acetil-P tal como lo reportó Reeves y col. (1975). El resultado de interés de la reacción de la AcK es que incrementaría la síntesis de PPI; el cual es sustrato de las enzimas glucolíticas PPI-PFK y PPK para sintetizar ATP. Así mismo, también se debe explorar si la AcK tiene otros sustratos fisiológicos o incluso otra función dentro de la célula ya que se ha reportado que algunas enzimas pueden tener funciones adicionales a las metabólicas.

6.0 Conclusiones Generales

-La AcTK es la enzima que participa mayoritariamente en la síntesis del acetato basado en sus parámetros cinéticos y disponibilidad de sustratos en la célula.

- La contribución de la AcTK para la síntesis de ATP del parásito pudiera ser poca debido a que la competencia con la ADHE para la formación de etanol la pone en desventaja. Sin embargo, se puede hipotetizar que la función de la AcTK podría ser importante para la regeneración de CoA para que el flujo hacia etanol pueda proseguir.

- En el trofozoíto, el acetil-P sustrato de la AcK no está presente, por lo que en amibas cultivadas *in vitro* en forma axénica esta reacción podría ser de poca relevancia para el metabolismo energético de la amiba. Sin embargo, cuando las

amibas fagocitan a las bacterias, el uso del acetil-P proveniente de estas células podría ser utilizado por la AcK y por lo tanto esta enzima podría ser relevante en condiciones de cultivo monoxénicas para formar el PPI necesario para varias reacciones de la glucólisis.

7.0 PERSPECTIVA

- ✓ Evaluar la función de la AcK en el metabolismo de *Entamoeba histolytica*.
- ✓ Evaluar la posibilidad de que existan otros sustratos para la formación de acetato por medio de la AcK.
- ✓ Evaluar si en cultivos monoxénicos se incrementa la expresión de la AcK y se detecta la presencia de acetil-P.

8.0 REFERENCIAS

Beck I., Tanyuksel M., Aaron J., Maxkey., Hanque R., Trapaidze N., WillianR., Pearson., Loffus B., Petri w. (2002). *Entamoeba histolytica*: sequence conservation of the Gal/Gal/Nac lectin from clinical isolates. *Experimental parasitology* 101: (157-163).

Bell J. (1989). The polymerase chain reaction. *Immunol Today*. 10: (351-355).

Berengues J. (2007). Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. España. *Universidad de Barcelona*.

Buss S., Kabir M., Petri Jr., Hanque R., (2006). Comparison of two immunoassays for detection of *Entamoeba histolytica*. *Journal of clinical microbiology*. 46: (2778-2779).

Clark C., Alsmark U., Tazreite M., Sarto N., Marion S., Weber C., Mukheriee C., Bruchhaus., Tannich E., Leippe M., Nozaki T., Tall N. (2007). Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Adv parasitol*. 65: (51-190).

Diamon S y Gratta M C, (2007) A redescription of *Entamoeba histolytica* schadinn 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt 1925. *Journal of Eukaryotic microbiology*. 40: (340-344).

Fild J., Rosenthal B., Samelson J. (200). Early lateral transfer of genes encoding malic enzyme, acetyl-CoA synthetase and alcohol dehydrogenises from anaerobic prokaryotes to *Entamoeba histolytica*. *Molecular microbiology*. 3: (446-455).

Fowler M., Ingram C., Smith K. (2012). Novel pyrophosphate-forming acetate kinase from the protist *Entamoeba histolytica*.

González R., (1999). Revisión del estado actual del diagnostico diferencial de la amibiasis en México. *Salud pública México*. 32: (589-596).

Hanque R., Mondal D., Beth D., Akther S., Barry M., Bradley S., Petri W., (2003).

Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infection in preschool children in an urban slum of Dhaka Bangladesh. *The American society of tropical medicine and hygiene*. 69: (833-840).

Kimura K., Stoopen M., Maurice M., Moncada R. (1997). Amebiasis; Modern diagnostic imaging with pathological and clinical correlation. *Seminarian in roentgenology*. 32: (250-275).

Lowry H., Rosebrough N., Farr A., Randall R.(1951) *Journal biological chem.* 1: (265-275).

Marshall M., Naumouitz D., Ortega Y., Streling C. (1997). Waterborn Protozoan parhogens. *American society for microbiology*. 10: (67-85).

Martínez L., Chadee K. (2010). The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Experimental parasitology*. 126: (366-380).

Móran P., Rojas L., Cerritos R., Zermeño V., Valdez A., Montes de oca G., Reyes M., González E., Partida O., Hernández E., Nieves M., Portillo T., Gudiño M., Ramiro M., Ximénez C., (2012). Cases repot. Cutaneous amebiasis. The importance of molecular diagnosis of emerging parasitic disease. *The American Journal of tropical medicine and hygiene*. 88: (186-190).

Nelson B., Cox M. Lehninger. Principios de bioquímica. 4° Ed Omega 2005.

Pérez T., Iglesias L. (2003). Tetracycline, sulfonamides and metronidazol. *Enferm. Infec. Microbial clinical*. 29: (520-528).

Peterson M., Shu J., Duggal P., Hanque R., Mondal D., Petri W., (2010). Association between TNF- α and *Entamoeba histolytica* diarrhea. *The American Journal of tropical medicine and hygiene*. 82: (620-625).

Pinilla E., López M., Viasus D. (2008) Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. *Revista médica de chile* 136:(118-124).

Reeves E R., Lionel G., Susskind B., Hsin-Sheng Lo. (1975). An energy-conserving pyruvate-to-acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. *The journal of biological chemistry*. 252: (76-731).

Reeves E., Guthrie J. (1975). Acetate kinase (Pyrophosphate). A fourth pyrophosphate-dependent. *Biochemical and biophysical research communications*. 66: (1398-1395).

Reeves RE. (1984) Metabolism of *E. histolytica*. *Adv parasitol*. 20 : (105-142).

Rodríguez M. (1999). Amibiasis Intestinal. *Revista hospitalaria de México*. 66: (34-41).

Romero L., Villagomez C. (1993). Encystation in *Entamoeba Invadens*. *Parasitol* 9: (225-227).

Saavedra E., Encalada R., Pineda E., Jasso-Chávez R., Moreno Sánchez R. (2005).

Glycolysis in *Entamoeba histolytica*. Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. *FEBS Journal*. 7 :(1767-1783).

Saavedra E., Marín-Hernández A., Encalada R., Olivos A., Mendoza Hernández G., Moreno Sánchez R. (2007). Kinetic modeling can describe in vivo Glycolysis in *Entamoeba histolytica*. *FEBS Journal*. 18: (4922-4940).

Samarawikrema NA. Brown D., Upcrof J., Upcrof P. (1997). Involvement of superoxide dismutase and piruvate: ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazol. Resistence in *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob Chemuther*. 46: (833-840).

Sambrook J., Russell D. (2001). Molecular cloning. Estados Unites. *Editorial Scalpers*.
Tamez A., Guillen N., Castorena G. (2009). Absceso hepático amibiano multiple. *Revista mexicana de medicina*. 25: (165-172).

Tracye L., Zlobl M.(2001). Amebiasis. *Elsevier scienceinc*. 8: (65-68).

WHO/PAHO/UNESCO (2006). Consultation with experts on Amebiasis Epidemiology.

Ximénez C., Mórán P., Ramos F., Ramiro M. (2007). Amibiasis intestinal: estado actual de conocimiento. *Medicina interna de México* 23: (298-407).

REFERENCIAS

Beck I., Tanyuksel M., Aaron J., Maxkey., Hanque R., Trapaidze N., WillianR., Pearson., Loffus B., Petri w. (2002). *Entamoeba histolytica*: sequence conservation of the Gal/Gal/Nac lectin from clinical isolates. *Experimental parasitology* 101: (157-163).

Bell J. (1989). The polymerase chain reaction. *Immunol Today*. 10: (351-355).

Berengues J. (2007). Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. España. *Universidad de Barcelona*.

Buss S., Kabir M., Petri Jr., Hanque R., (2006). Comparison of two immunoassays for detection of *Entamoeba histolytica*. *Journal of clinical microbiology*. 46: (2778-2779).

Clark C., Alsmark U., Tazreite M., Sarto N., Marion S., Weber C., Mukheriee C., Bruchhaus., Tannich E., Leippe M., Nozaki T., Tall N. (2007). Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Adv parasitol*. 65: (51-190).

Diamon S y Gratta M C, (2007) A redescription of *Entamoeba histolytica* schadinn 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt 1925. *Journal of Eukaryotic microbiology*. 40: (340-344).

Fild J., Rosenthal B., Samelson J. (200). Early lateral transfer of genes encoding malic enzyme, acetyl-CoA synthetase and alcohol dehydrogenises from anaerobic prokaryotes to *Entamoeba histolytica*. *Molecular microbiology*. 3: (446-455).

Fowler M., Ingram C., Smith K. (2012). Novel pyrophosphate-forming acetate kinase from the protist *Entamoeba histolytica*.

González R., (1999). Revisión del estado actual del diagnostico diferencial de la amibiasis en México. *Salud pública México*. 32: (589-596).

Hanque R., Mondal D., Beth D., Akther S., Barry M., Bradley S., Petri W., (2003).

Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infection in preschool children in an urban slum of Dhaka Bangladesh. *The American society of tropical medicine and hygiene*. 69: (833-840).

Kimura K., Stoopen M., Maurice M., Moncada R. (1997). Amebiasis; Modern diagnostic imaging with pathological and clinical correlation. *Seminarian in roentgenology*. 32: (250-275).

Lowry H., Rosebrough N., Farr A., Randall R.(1951) *Journal biological chem.* 1: (265-275).

Marshall M., Naumouitz D., Ortega Y., Streling C. (1997). Waterborn Protozoan parhogens. *American society for microbiology*. 10: (67-85).

Martínez L., Chadee K. (2010). The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Experimental parasitology*. 126: (366-380).

Móran P., Rojas L., Cerritos R., Zermeño V., Valdez A., Montes de oca G., Reyes M., González E., Partida O., Hernández E., Nieves M., Portillo T., Gudiño M., Ramiro M., Ximénez C., (2012). Cases repot. Cutaneous amebiasis. The importance of molecular diagnosis of emerging parasitic disease. *The American Journal of tropical medicine and hygiene*. 88: (186-190).

Nelson B., Cox M. Lehninger. Principios de bioquímica. 4° Ed Omega 2005.

Pérez T., Iglesias L. (2003). Tetracycline, sulfonamides and metronidazol. *Enferm. Infec. Microbial clinical*. 29: (520-528).

Peterson M., Shu J., Duggal P., Hanque R., Mondal D., Petri W., (2010). Association between TNR- α and *Entamoeba histolytica* diarrhea. *The American Journal of tropical medicine and hygiene*. 82: (620-625).

Pinilla E., López M., Viasus D. (2008) Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. *Revista médica de chile* 136:(118-124).

Reeves E R., Lionel G., Susskind B., Hsin-Sheng Lo. (1975). An energy-conserving pyruvate-to-acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. *The journal of biological chemistry*. 252: (76-731).

Reeves E., Guthrie J. (1975). Acetate kinase (Pyrophosphate). A fourth pyrophosphate-dependent. *Biochemical and biophysical research communications*. 66: (1398-1395).

Reeves RE. (1984) Metabolism of *E. histolytica*. *Adv parasitol*. 20 : (105-142).

Rodríguez M. (1999). Amibiasis Intestinal. *Revista hospitalaria de México*. 66: (34-41).

Romero L., Villagomez C. (1993). Encystation in *Entamoeba Invadens*. *Parasitol* 9: (225-227).

Saavedra E., Encalada R., Pineda E., Jasso-Chávez R., Moreno Sánchez R. (2005).

Glycolysis in *Entamoeba histolytica*. Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. *FEBS Journal*. 7 :(1767-1783).

Saavedra E., Marín-Hernández A., Encalada R., Olivos A., Mendoza Hernández G., Moreno Sánchez R. (2007). Kinetic modeling can describe in vivo Glycolysis in *Entamoeba histolytica*. *FEBS Journal*. 18: (4922-4940).

Samarawikrema NA. Brown D., Upcrof J., Upcrof P. (1997). Involvement of superoxide dismutase and piruvate: ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazol. Resistence in *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob Chemuther*. 46: (833-840).

Sambrook J., Russell D. (2001). Molecular cloning. Estados Unites. *Editorial Scalpers*.
Tamez A., Guillen N., Castorena G. (2009). Absceso hepático amibiano multiple. *Revista mexicana de medicina*. 25: (165-172).

Tracye L., Zlobl M.(2001). Amebiasis. *Elsevier scienceinc*. 8: (65-68).

WHO/PAHO/UNESCO (2006). Consultation with experts on Amebiasis Epidemiology.

Ximénez C., Mórán P., Ramos F., Ramiro M. (2007). Amibiasis intestinal: estado actual de conocimiento. *Medicina interna de México* 23: (298-407).