



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO
DESHIDROGENASA Y 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA
RECOMBINANTES DE *Trypanosoma cruzi***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

JOSÉ ANTONIO TÉLLEZ ARELLANO



MÉXICO, D.F.

2016



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: ABEL GUTIÉRREZ RAMOS
VOCAL: LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMÁN
SECRETARIO: ZABDI ABRAHAM GONZÁLEZ CHÁVEZ
1er. SUPLENTE: AURORA LARA NÚÑEZ
2° SUPLENTE: JOSÉ CORDERO HERNÁNDEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA, IGNACIO CHÁVEZ.

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. ZABDI ABRAHAM GONZÁLEZ CHÁVEZ

SUSTENTANTE:

JOSÉ ANTONIO TÉLLEZ ARELLANO

***El hombre encuentra a Dios
detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir.***

A. EINSTEIN

Resumen:

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas. Actualmente, los fármacos que se utilizan para su tratamiento son el nifurtimox y benznidazol, los cuales actúan generando estrés oxidante en el parásito. Sus efectos secundarios en los pacientes debido su inespecificidad (provoca hepatotoxicidad y nefrotoxicidad), alto costo, baja efectividad en la fase crónica de la enfermedad y la aparición de cepas resistentes por lo que han promovido la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos, dentro de los cuales se ha propuesto al sistema antioxidante dependiente de tripanotión [T(SH)₂].

En los tripanosomátidos, el T(SH)₂ junto con la tripanotión reductasa (TryR), reemplazan al sistema glutatión/glutatión reductasa (GSH/GR) de mamíferos. El T(SH)₂ es el metabolito central de la vía de reducción de hidroperóxidos, este T(SH)₂ se mantiene reducido por la TryR que es dependiente de NADPH, siendo el suministro de NADPH esencial para este sistema, que se sugiere proviene principalmente de la vía oxidativa de las pentosas fosfato, específicamente de las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH).

Ya se ha realizado la caracterización cinética de ambas enzimas, sin embargo, no se realizó bajo condiciones fisiológicas de pH y temperatura, por lo que no podemos utilizarlos, ya que en nuestro grupo de trabajo se está construyendo un modelo cinético del metabolismo del T(SH)₂ de *T. cruzi*, para lo cual se requieren los parámetros cinéticos de las enzimas determinados en estas condiciones, para así poder identificar las enzimas con mayor potencial terapéutico.

El objetivo de este trabajo es determinar los valores de los parámetros cinéticos de las enzimas recombinantes G6PDH y 6PGDH en condiciones de pH y temperatura cercanas a las fisiológicas (pH 7.4 y 37°C). Los genes que codifican para la G6PDH y 6PGDH se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de *T. cruzi* de la cepa Ninoa, se clonaron y secuenciaron para confirmar su identidad. Posteriormente, las proteínas se sobreexpresaron en bacterias y se purificaron con

alto grado de pureza. La caracterización cinética de las enzimas se llevó a cabo mediante la reconstitución *in vitro* de la vía, y monitoreando la oxidación de NADPH a 340 nm en un espectrofotómetro. A partir de los valores de V_m y K_m obtenidos para cada una de las enzimas por sus respectivos sustratos, se pudieron determinar sus k_{cat}/K_m .

Los parámetros cinéticos de la G6PDH recombinante y en extractos de epimastigotes, son similares a los reportados anteriormente, a pesar de la diferencia de temperaturas (37°C vs. 30°C respectivamente). Se había reportado que la 6PGDH es inestable a la dilución, por lo que se había logrado estabilizar a través de mutagénesis sitio dirigida aumentando el número de puentes salinos entre los dos monómeros que conforman la enzima, para aumentar su estabilidad a la dilución; sin embargo, en este trabajo se estabilizó en amortiguador en presencia de 140 mM de KCl, se obtuvieron sus parámetros cinéticos en esta condición, observando que su velocidad máxima aumentó de 5 a 10 veces con respecto a lo reportado. Esta técnica no nos permitió estabilizar a la enzima en el extracto, obteniendo una pérdida de la actividad con respecto al tiempo. Los resultados obtenidos nos permitieron determinar que la 6PGDH es de 2 a 18 veces más eficiente que la G6PDH en condiciones cercanas a las fisiológicas, por lo que la G6PDH podría ser la enzima que esté limitando el suministro de NADPH en la vía.

Índice:

Resumen.....	4
Lista de abreviaturas.....	8
1. Introducción.....	10
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
1.2. Enfermedad de Chagas.....	12
1.2.1. Epidemiología.....	12
1.2.2. Patogenia.....	13
1.2.3. Diagnóstico.....	14
1.2.4. Formas de infección.....	15
1.2.5. Tratamiento y mecanismo de acción de los fármacos.....	16
1.3. Diferencias entre el metabolismo antioxidante de las células de mamífero y de <i>T. cruzi</i>	18
1.4. Vía de las pentosas fosfato.....	22
1.5. Cinética enzimática.....	25
1.6. Enzimas deshidrogenasas.....	28
1.7. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.....	28
1.8. 6-fosfogluconato deshidrogenasa.....	31
2. Hipótesis.....	34
3. Objetivos.....	34
3.1. Objetivo general.....	34
3.2. Objetivos particulares.....	34
4. Metodología.....	35
4.1. Diseño de oligonucleótidos.....	35
4.2. Amplificación de los genes.....	35
4.3. Ligación al vector de clonación pJet 1.2/blunt.....	37
4.4. Identificación del gen. Análisis de restricción y secuenciación.....	38
4.5. Ligación de los genes al vector de sobreexpresión.....	39
4.6. Sobreexpresión de proteínas.....	41

4.7. Purificación de proteínas.....	42
4.8. Cuantificación de proteínas.....	43
4.9. Ensayos enzimáticos.....	43
4.10. Obtención de extractos celulares.....	44
5. Resultados y Discusión.....	46
5.1. Amplificación de los genes que codifican para la G6PDH y 6PGDH de <i>T. cruzi</i>	46
5.2. Clonación de los fragmentos y transformación en bacterias.....	47
5.3. Análisis de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos.....	48
5.4. Secuencia de la G6PDH.....	48
5.5. Secuencia de la 6PGDH.....	50
5.6. Sobreexpresión de las proteínas.....	50
5.7. Purificación de las proteínas.....	52
5.8. Caracterización cinética.....	54
5.9. Propiedades cinéticas de la G6PDH.....	54
5.10. Propiedades cinéticas de la 6PGDH.....	57
5.11. Propiedades cinéticas de G6PDH y 6PGDH en extractos celulares....	60
6. Discusión general.....	62
7. Conclusiones.....	63
8. Bibliografía.....	64

Lista de abreviaturas:

ADN: ácido desoxirribonucleico

ATP: trifosfato de adenosina

β -ME: β -mercaptoetanol

BSA: albúmina sérica bovina

Cat: catalasa

Cys: cisteína

dNTPs: desoxinucleótidostrifosfatados

DE: desviación estándar

DO: densidad óptica

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminatetraacético

Fw: forward (hacia adelante)

γ -EC: gamma glutamil cisteína

γ -ECS: gamma glutamil cisteína sintetasa

Glu: glutamato

Gly: glicina

GR: glutatión reductasa

GSH: glutatión (forma reducida)

GSSG: glutatión (forma oxidada)

G6P: glucosa-6-fosfato

G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

h: hora

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranósido

kcat: constante catalítica

kDa: kilo daltones

Km: constante de Michaelis-Menten

LB: Luria-Bertani

M: molar

min: minuto(s)

nm: nanometros

μM : micromolar

NAD^+ : dinucleótido de nicotinamida (forma oxidada)

NADH : dinucleótido de nicotinamida (forma reducida)

NADP^+ : nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)

NADPH : nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)

$^{\circ}\text{C}$: grados celsius

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)

PPP: vía de las pentosas fosfato (por sus siglas en inglés)

RPE: ribulosa-5-fosfato epimerasa

Rw: reverse (reverso)

s: segundo

[S]: concentración de sustrato

SDS-PAGE: electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

SOD: superóxidodismutasa

Spd: espermidina

TCA: ácido tricloroacético

TryR: tripanotión reductasa

TryS: tripanotión sintetasa

TS_2 : disulfuro de tripanotión

T(SH)_2 : tripanotión (forma reducida)

U: unidades de actividad enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

UV: ultra-violeta

V_i : velocidad inicial

V_m : velocidad máxima

vs.: versus

6PG: 6-fosfogluconato

6PGL: 6-fosfogluconolactonasa

6PGDH: 6-fosfogluconato deshidrogenasa

1. Introducción:

1.1. *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protista flagelado del Orden Kinetoplastida de la familia de los Tripanosomatidae, causante de la enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana. El parásito se clasifica en 3 estadios morfológicos, los cuales se dividen de acuerdo a la localización del cinetoplasto, el núcleo y su único flagelo. (Figura 1) (Tay-Zavala *et al.* 1995; Cevallos y Hernández, 2001).

- Tripomastigote: Es un flagelado de cuerpo alargado que mide unas 20 a 25 micrómetros de longitud, posee el llamado cinetoplasto en la parte posterior al núcleo, el cual está formado principalmente de ácido desoxirribonucleico (ADN). Del cinetoplasto surge la membrana ondulante que recorre el parásito a todo lo largo de su cuerpo, saliendo libre en la porción anterior permitiéndole moverse libremente como un chicote. Este estadio se desarrolla en el intestino posterior del triatómino (tripomastigote metacíclico) y en la sangre de los mamíferos (tripomastigote sanguíneo).

- Epimastigote: De aspecto fusiforme con 20 a 25 micras de longitud, en el que el cinetoplasto se encuentra en posición anterior al núcleo, el flagelo se localiza en la parte media de la célula. Este estadio se multiplica en el intestino del insecto vector triatomino.

- Amastigote: Es de forma redondeada y mide únicamente de 2 a 2.5 micras, sin flagelo libre, pero al microscopio electrónico se alcanza a ver dentro de una bolsa, además presenta un gran núcleo y cinetoplasto. Este estadio se encuentra en el interior de las células del hospedero donde se multiplica profusamente.

La forma infectiva del parásito (tripomastigote metacíclico) se transmite a los seres humanos a través de un insecto vector perteneciente a la familia Reduviidae de los que en México existen 7 géneros y alrededor de 39 especies distribuidas a lo largo del territorio nacional. Los insectos defecan en la piel del hospedero tras alimentarse de su sangre y es en las heces del insecto donde se encuentran los

tripomastigotes metacíclico, que penetran por rascado o frotamiento del mismo hospedero ya sea por la mordedura del insecto o por membranas mucosas como la conjuntiva, en este momento comienza el ciclo de vida del parásito (figura 1A). Los tripomastigotes metacíclicos penetran las células cercanas al sitio de entrada donde se transforman en amastigote (figura 1 B), los cuales se multiplican por fisión binaria dentro de las células del tejido infectado (figura 1 C), los amastigotes se transforman en tripomastigotes, llenando la célula hasta reventarla y liberándolos a la circulación. Estos últimos pueden infectar otras células y transformarse en amastigotes intracelulares en nuevos sitios de infección (figura 1 D). Los triatóminos pueden ingerir la sangre infectada con tripomastigotes (figura 1 E) que se transforman en epimastigotes dentro del intestino medio del insecto (figura 1 F) en donde se multiplican (figura 1 G). Finalmente se transforman en tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del insecto (figura 1 H).

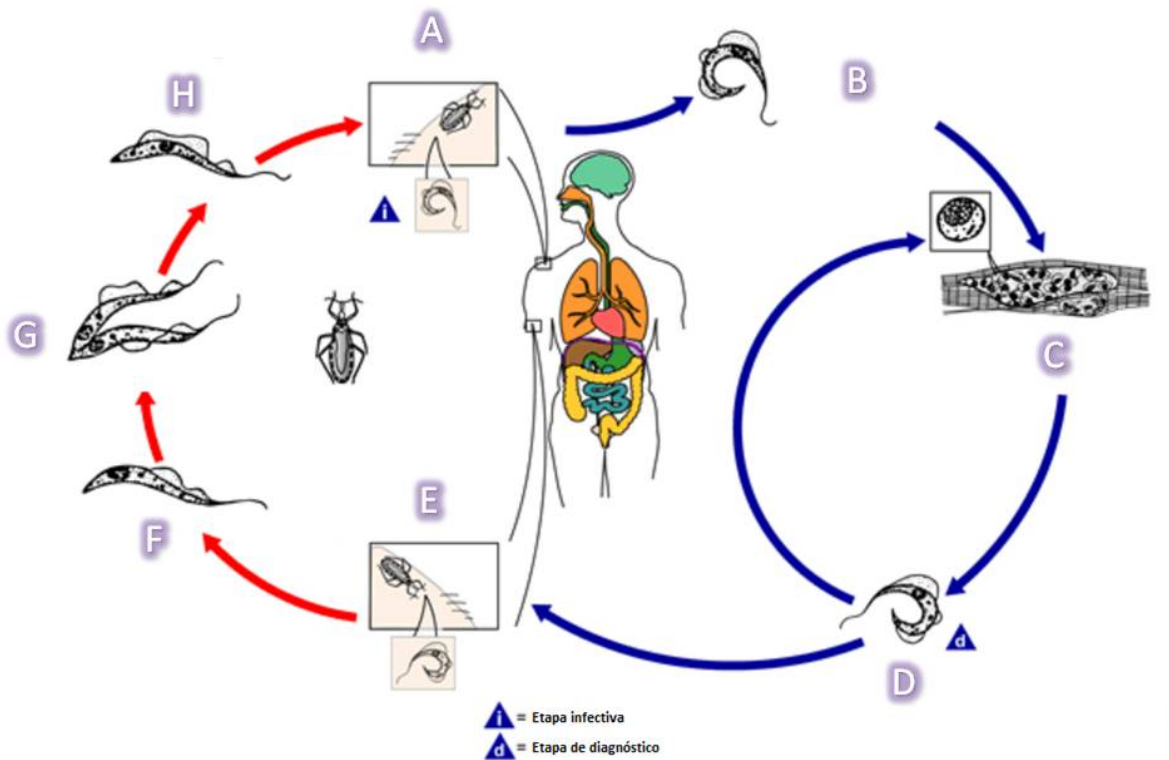


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Modificado de <http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>

1.2. Enfermedad de Chagas

1.2.1. Epidemiología

La enfermedad de Chagas, es una seria amenaza a la salud humana en Latino América, y una de las enfermedades emergentes más importantes en Europa y Estados Unidos de América (Parker y Sethi, 2011). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que a nivel mundial 10 millones de personas están infectadas, las cuales pertenecen a América Latina principalmente; además se calcula que alrededor de 25 millones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad debido a las condiciones de las viviendas, las cuales son propicias para la proliferación del vector. En 2008 se reportó que alrededor de 10 000 personas murieron a causa de la enfermedad a nivel mundial [OMS, 2010].

En México de acuerdo al censo nacional del 2010 (Instituto Nacional de Estadística Geografía e informática, <http://www.inegi.org.mx>, 2010), reportó 112.3 millones de persona viviendo en México y basado en el porcentaje de seropositividad publicado por Cruz Reyes y Pickering-Lopez 2006, se pudo realizar un estimado del número de infectados por *T. cruzi* por estado como se muestra en la figura 2, esto indica que el número estimado de personas potencialmente afectadas en México es de 5.5 millones.

Sin embargo, la enfermedad de Chagas sigue siendo poco reportada en México. De acuerdo con el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE), en el periodo 2000-2010 se tuvo un número total acumulado de alrededor de 3500 nuevos casos , no obstante estos datos podrían estar subestimados, si se comparan con los datos reportados en diferentes estudios de seroprevalencia de la enfermedad de Chagas (Cruz Reyes y Pickering-Lopez, 2006).

En concordancia con la estimación del número de personas infectadas, Jalisco, Oaxaca y Chiapas son los estados que tienen el mayor número de casos (figura 2).

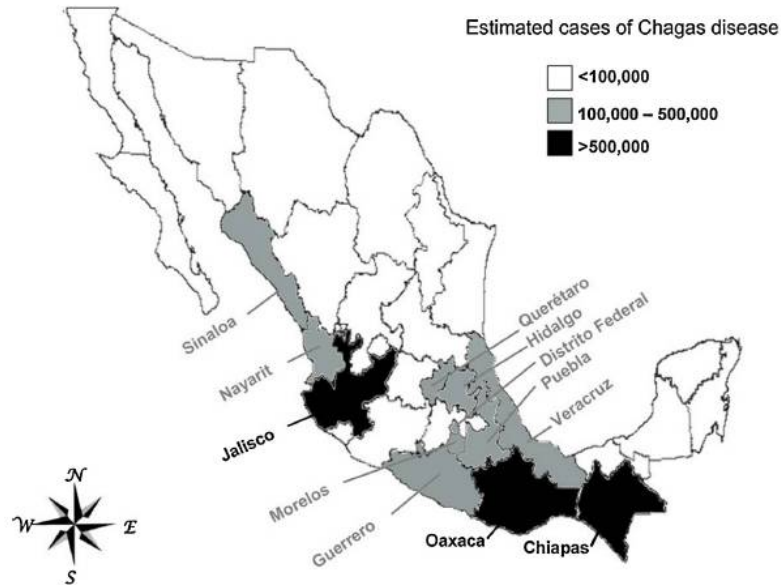


Figura 2. Número estimado de la enfermedad de Chagas [Cruz Reyes y Pickering-Lopez, 2006].

1.2.2. Patogenia

Tras la penetración de *T. cruzi* en el organismo, sigue un periodo de incubación que suele durar entre 4 a 14 días (Tay-Zavala *et al.* 1995), después del cual se distinguen dos fases:

Fase aguda:, en la mayoría de los casos no se presenta sintomatología, sin embargo entre el 10 y 15% de los pacientes desarrollan edema bupalperal unilateral (conocido como signo de Romaña-Mazzao) o bien un nódulo subcutáneo localizado en el sitio de penetración del parásito conocido como chagoma de inoculación, los cuales pueden durar hasta 30 días y posteriormente desaparecen espontáneamente. Además de estos dos signos también pueden presentarse síntomas como fiebre, dolor de cabeza, dolores musculares, anorexia, vómito, diarrea, agrandamiento de ganglios linfáticos, palidez, dificultad para respirar,

hinchazón y dolor abdominal o torácico. Si bien esta fase usualmente se resuelve en 2 a 4 meses, en algunos casos agudos (2-6%) se puede llegar a la muerte, principalmente debido a miocarditis o meningoencefalitis [Rassi *et al.*, 2010; Dumonteil, 1999].

Fase crónica: esta fase se divide en dos: la forma indeterminada, también llamada latente, y la forma sintomática. Entre el 50% y el 90% de los pacientes con enfermedad de Chagas permanecen en la forma indeterminada por 10 o 30 años, incluso de por vida; aunque con serología positiva (Rodrigues-Coura y Borges P., 2010). En la forma sintomática suele presentar daño irreversible principalmente al corazón, esófago e intestino, que se descubren por electrocardiografía o radiología. De los datos más sobresalientes están los trastornos cardiacos en hasta un 30% de los pacientes que presentan cardiomegalia, con insuficiencia cardiaca y alteraciones en el electrocardiograma, en un 10% presentan alteraciones digestivas como megaesófago o megacolon, así como alteraciones neurológicas o mixtas (Tay-Zavala *et al.* 1995). Con el paso de los años la infección puede causar una muerte súbita.

1.2.3. Diagnóstico

Para efectuar el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, es importante considerar la epidemiología y la clínica. En la epidemiología se toma en cuenta la residencia o procedencia del enfermo y posibles estancias en zonas endémicas. Toda persona que resida o provenga de zonas endémicas de la enfermedad, y que presente alguna cardiopatía es sospechosa de enfermedad de chagas; así como también en cuadros de megaesófago y megacolon (Tay-Zavala *et al.* 1995).

Durante la etapa aguda de la infección la presencia del parásito se comprueba mediante un examen directo de sangre, hemocultivo, inoculación de animales de laboratorio y el xenodiagnóstico, en cortes histológicos en autopsias y exámenes inmunológicos.

1.2.4. Formas de infección

Como se mencionó anteriormente la forma de infección más común es a través del vector, estos insectos se encuentran distribuidos por todo el Continente, desde Estados Unidos hasta Argentina. En México se han encontrados triatóminos con *T. cruzi* desde los 0 m hasta los 2200 m sobre el nivel del mar, es decir, en dos terceras partes del territorio nacional, siendo el género *Triatoma* el más importante para México, ya que cuenta con 26 especies y subespecies (Tay-Zavala *et al.* 1995). En México se les conoce con multitud de nombres dependiendo del estado de la República, por ejemplo “Pick” (en lengua maya), chinche hocicona, besucona, talaje, voladora y chinche de Compostela (figura 3). Además de la forma vectorial (80%-90%), la transmisión también puede ocurrir como resultado de un trasplante de órgano, transfusión de sangre (5%-20%), transmisión congénita (0.5%-8%) o como resultado de un accidente de laboratorio [Gutierrez *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2000].

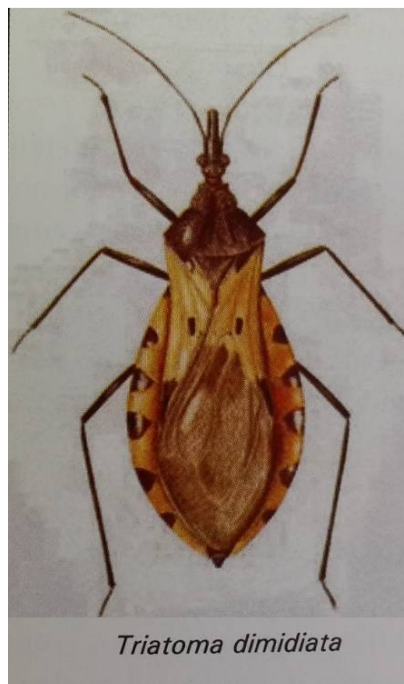


Figura 3. Fotografía de insecto *Triatoma dimidiata*. Tomado de Flisser *et al.*, 2006.

1.2.5. Tratamiento y mecanismo de acción de los fármacos.

Actualmente los fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el nifurtimox y el benznidazol, ambos son altamente efectivos durante la fase aguda de la enfermedad, disminuyendo su eficacia a medida que transcurre el tiempo desde el inicio de la infección. Las dosis recomendadas en la fase aguda es de 8-10 mg/Kg/día para el nifurtimox y de 5 mg/Kg/día para el benznidazol (Maya *et al.*, 2007). El promedio de duración del tratamiento es de alrededor de 60 días; pero en caso de reactivación de la infección (por ejemplo, por inmunosupresión, en niños que padecen infección congénita o en los pacientes al principio de la fase crónica) el tratamiento puede durar 5 meses o más. Sólo en casos accidentales y donde se sospecha la infección por medio del vector, transfusión de sangre o accidentes en el laboratorio, la duración profiláctica del tratamiento está limitada a 10 días (Maya *et al* 2007).

El nifurtimox y el benznidazol son tripanocidas en cualquier forma del parásito (Rodrigues Coura y de Castro, 2002); sin embargo, pueden causar toxicidad sistémica y efectos adversos que incluyen anorexia, náusea, vómito, dolor de cabeza, depresión del sistema nervioso central o síntomas maniáticos, convulsiones, vértigo, parestesia, polineuropatías periféricas y dermatitis. Adicionalmente hay reportes de mutagénesis y daño al ADN (Zahoor *et al.*, 1987), aunque en la mayoría de los pacientes tratados con estos fármacos no se han encontrado problemas relacionados con estos últimos puntos y por lo tanto el riesgo parece ser más teórico que clínico. Un elemento adicional que complica el tratamiento de la enfermedad, es la diferencia de susceptibilidad de las diferentes cepas del parásito a estos fármacos (Maya *et al* 2007).

El mecanismo de acción del nifurtimox y benznidazol es distinto (Figura 4); sin embargo el grupo nitro de ambos fármacos se reduce a un grupo amino por la acción de la NADPH-citocromo P-450 reductasa, produciendo un intermediario radical anión nitro ($R-NO_2^-$). Este radical puede ser oxidado por el oxígeno

molecular regenerando al fármaco y reduciendo parcialmente al O_2 generando el anión superóxido (O_2^-). Posteriormente el O_2^- al captar dos protones (H^+), genera O_2 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la acción catalítica de la superóxido dismutasa (SOD). El anión superóxido (O_2^-) y el H_2O_2 , en presencia de Fe^{3+} , forman el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el ion hidroxilo (OH^-) (reacción de Haber-Weiss). El OH^\cdot , se une a lípidos, proteínas y ADN, dañándolos y provocando la muerte de las células [Maya *et al.*, 2007].

Se ha visto que la concentración de nifurtimox a la cual se inhibe por completo el crecimiento de un cultivo de epimastigotes (20 μM), es similar a la que se requiere para la máxima producción de anión superóxido, y para que comience la salida del H_2O_2 de la célula [Docampo y Stoppani, 1979]. Esto sugiere que la reducción intracelular del nifurtimox generando el radical nitro, seguido de la producción del O_2^- y H_2O_2 , es el principal mecanismo de acción del nifurtimox contra *T. cruzi*.

El efecto tripanocida del benznidazol no depende de los radicales libres de oxígeno como lo hace el nifurtimox. No se ha observado la generación del O_2^- y el H_2O_2 a la concentración necesaria para inhibir el crecimiento de epimastigotes. Adicionalmente, los homogenados de *T. cruzi* expuestos a benznidazol generan una señal resonancia de espín electrónico débil correspondiente al anión nitro [Moreno *et al.*, 1982]. Esto probablemente indica que el metabolito reducido del benznidazol se une covalentemente con macromoléculas, y de esta manera ejerza su efecto tripanocida (figura 4) [Maya *et al.*, 2004].

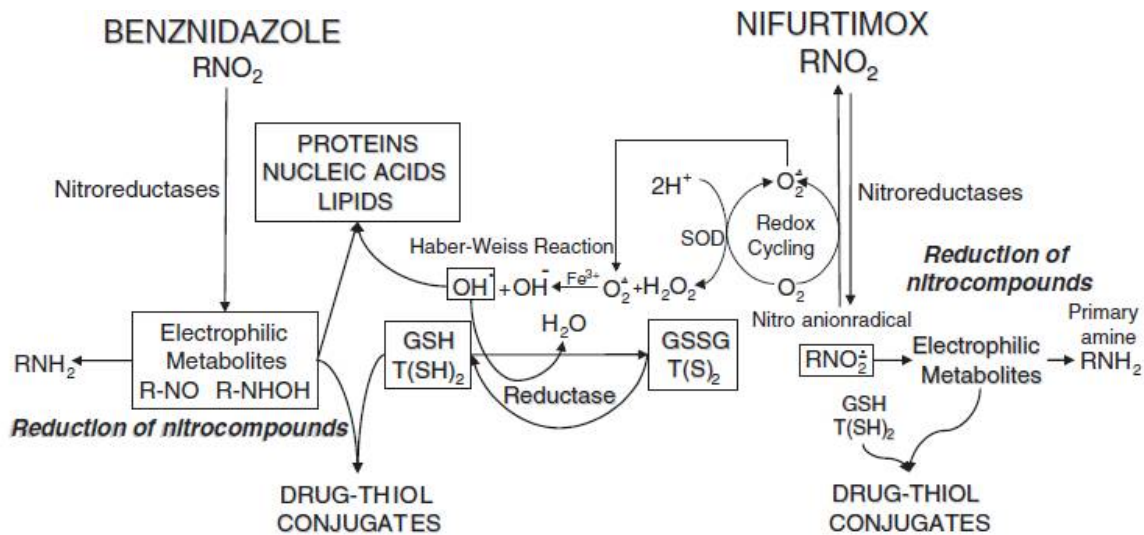


Figura 4. [Maya *et al* 2007]. **Mecanismo de acción del nifurtimox y benznidazol.** El grupo nitro de ambos fármacos se reduce por el citocromo p450 dentro de las células. El nifurtimox reducido puede oxidarse nuevamente por el oxígeno, generando radicales libres dañando las células. Además, la reducción de ambos fármacos genera metabolitos electrofílicos los cuales pueden unirse a glutatión (GSH) y tripanotión (T(SH)₂) (en el caso de los parásitos); con lo cual también se genera un estrés oxidante.

1.3. Diferencias entre el metabolismo antioxidante de las células de mamífero y *T. cruzi*

Las células de mamífero se defienden de diversas maneras contra los radicales libres, ya sea enzimática o no enzimáticamente [revisado en Gutteridge y Halliwell, 2000]. Los mecanismos no enzimáticos incluyen el uso de compuestos reductores como el α -tocoferol, el ascorbato, los β -carotenos, y el GSH. Los mecanismos de defensa enzimática incluyen el uso de la catalasa (Cat), la cual cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en oxígeno y agua; la SOD, la cual cataliza la dismutación del superóxido en oxígeno y H₂O₂, y algunas dependientes de GSH como la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa, y la glutatión-S-transferasas, las cuales se describen más adelante. El GSH es el tiol de bajo peso molecular más abundante en las células de mamífero, y actúa, entre

otras cosas, en la protección de desechos tóxicos producidos por compuestos altamente electrofílicos, además de ser un atrapador no enzimático de H_2O_2 y radicales libres [Jones *et al.*, 2003 a, b]. El GSH también interviene en reacciones catalizadas por la glutatión peroxidasa, la glutatión peroxidasa consume 2 moléculas de GSH por una de H_2O_2 , generando glutatión oxidado (GSSG) y dos moléculas de agua, ayudando en la protección contra los daños en la membrana lipídica [Hayes y McLellan, 1999, Kuhn y Borchert, 2002]; también es sustrato de la glutatión-S-transferasa, la cual conjuga el GSH con xenobióticos electrofílicos tales como metales pesados, herbicidas e insecticidas [Pastore *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2005].

El GSH se sintetiza por la acción sucesiva de las enzimas γ -glutamil-cisteína sintetasa (γ -ECS) y glutatión sintetasa. La enzima γ -ECS une una molécula de cisteína y una de glutamato para formar la γ -glutamil cisteína, y a esta molécula la glutatión sintetasa le une una molécula de glicina para formar el GSH. En los mamíferos, el GSSG se reduce por la GR, la cual es responsable de mantener alto el cociente GSH/GSSG. De hecho, esta enzima puede catalizar la reducción de complejos entre GSH y otras moléculas como γ -glutamilcisteína (γ -EC) o coenzima A [Fernandes y Holmgren, 2004].

En contraste, los mecanismos de defensa del parásito contra el estrés oxidante, no dependen, de Cat, GR o glutatión peroxidasa, ya que no se han detectado los genes o la actividad de estas enzimas en *T. cruzi* [Krauth-Siegel *et al.*, 2003; Turrens, 2004; Wilkinson y Kelly, 2003]. Sin embargo el parásito no solamente utiliza el GSH, sino que también sintetiza un conjugado de GSH con espermidina (Spd), el N^1, N^8 -bis-glutationil espermidina o $T(SH)_2$, el cual es característico de todos los tripanosomátidos [Ariyanayagam y Fairlamb, 2001].

El $T(SH)_2$ es un tiol de bajo peso molecular sintetizado por la tripanotión sintetasa (TryS), la cual une dos moléculas de GSH a través de una Spd [Krauth-Siegel *et al.*, 2003; Fairlamb y Cerami, 1992; Oza *et al.*, 2002] (figura 5). En

tripanosomátidos el T(SH)₂ tiene el papel equivalente al del GSH en los mamíferos, es decir, que actúa como un protector intracelular contra agentes oxidantes, el potencial redox del T(SH)₂ (-242 milivoltios) con respecto al del GSH (-250 milivoltios), es muy cercano sin embargo el conjugado ditiol del T(SH)₂ muestra propiedades físico- químicas que le confieren ventajas funcionales, la razón es que al ser un ditiol, la formación de la unión intramolecular tiol disulfuro es más rápida en T(SH)₂ que la unión intermolecular disulfuro entre dos moléculas de GSH . El T(SH)₂ puede reaccionar no enzimáticamente, de hecho forma conjugados con metales y fármacos [Maya *et al.*, 1997]. El T(SH)₂ también puede ser sustrato para reducir agentes oxidantes a través de sistemas enzimáticos, participar en la homeostasis de ascorbato, y en la síntesis de desoxiribonucleótidos [Revisado en Olin-Sandoval *et al.*, 2010].

El T(SH)₂ al ser el principal mecanismo de defensa de *T. cruzi* contra estrés oxidante, debe mantenerse en su forma reducida, para lo cual el parásito utiliza a la enzima tripanotión reductasa (TryR), la cual obtiene los equivalentes reductores de la forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), es por esto que resulta esencial que el parásito tenga una vía segura para mantener la fuente de esta coenzima reducida. El NADPH proviene de diversas reacciones enzimáticas, tales como: 1) la oxidación del glutamato (Glu) por la glutamato deshidrogenasa, la cual utilizando nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada (NADP⁺) genera 2-oxoglutarato, amoníaco y NADPH [Juan *et al.*, 1978, Barderi *et al.*, 1998]; 2) la enzima málica cataliza la descarboxilación oxidativa del L-malato a piruvato, con la reducción de NADP⁺ a NADPH [Cannata *et al.*, 1979]; 3) la descarboxilación oxidativa del isocitrato, donde la isocitrato deshidrogenasa utiliza el NADP⁺ para genera 2-oxoglutarato y NADPH [Gupta, S.; Cordeiro, T, 2011]; y 4) las dos deshidrogenasas de la parte oxidativa de la vía de las pentosas fosfato (PPP por sus siglas en inglés), las cuales se cree que son las que principalmente proveen de poder reductor a la célula (Gupta, S.; Cordeiro, T, 2011).

No se ha publicado evidencia de la existencia de β -carotenos o α -tocoferol en el parásito [Aldunate y Morello, 1993]; sin embargo se ha descrito la actividad de la dehidroascorbato reductasa en *T. cruzi*, lo cual sugiere que el ácido ascórbico está involucrado en el mecanismo antioxidantes del parásito [Wilkinson *et al.*, 2002].

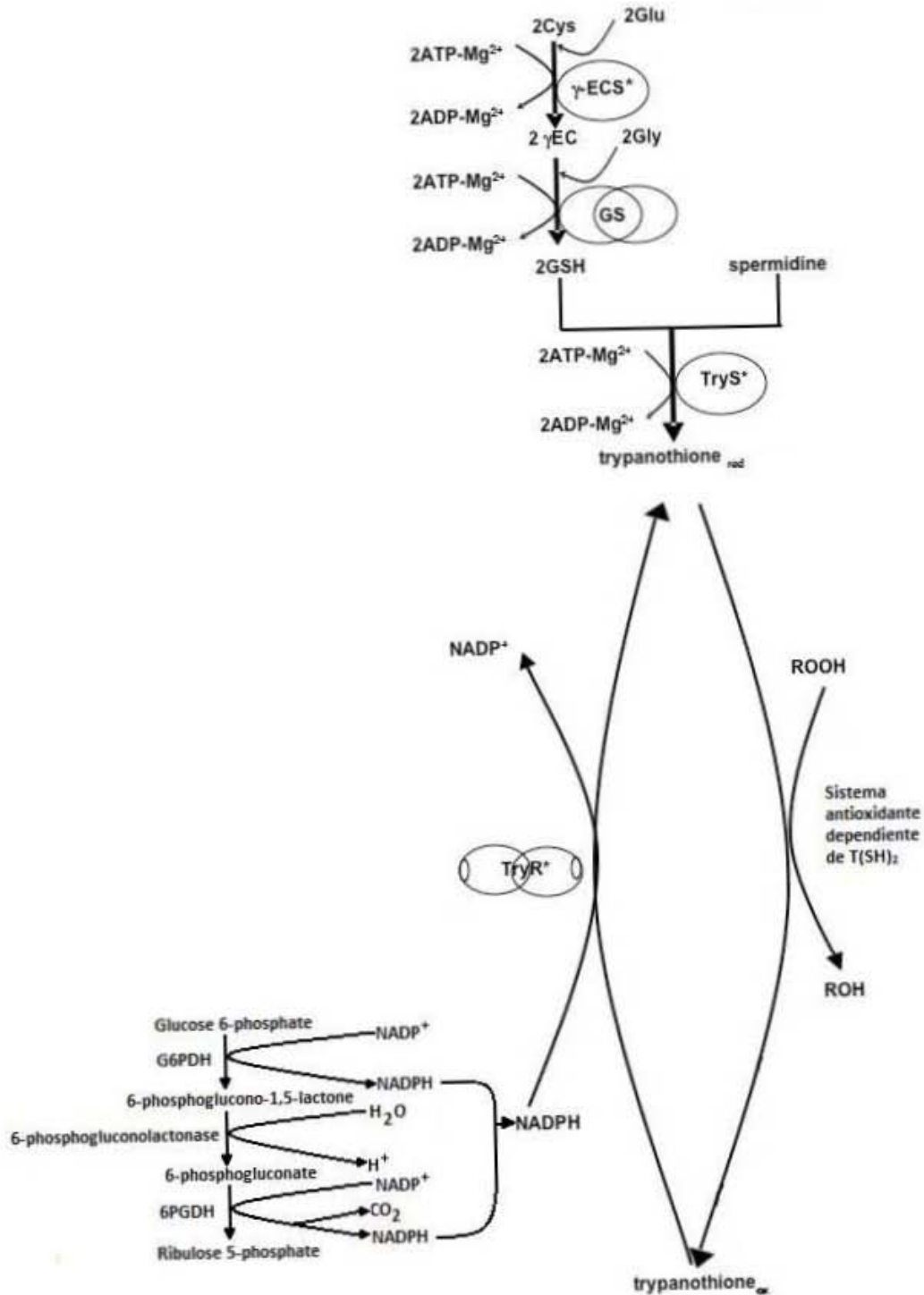


Figura 5. [Modificado de Olin-Sandoval 2010]. **Biosíntesis de T(SH)₂ en el parásito *T. cruzi*.** El GSH se sintetiza por la acción consecutiva de γ -glutamil-cisteína sintetasa y glutatión sintetasa dependientes de ATP. En el parásito *T. cruzi*, dos moléculas de GSH se conjugan con una de espermidina para sintetizar T(SH)₂. El T(SH)₂ sede sus equivalentes reductores a un sistema antioxidante por lo que se oxida, el tripanotión oxidado TS₂ se reduce nuevamente por la acción de la TryR, enzima dependiente de NADPH, cuyo suministro proviene principalmente de la fase oxidativa de la vía de la PPP.

1.4. Vía de las pentosas fosfato

En la mayoría de los organismos la glucosa se metaboliza a través de dos grandes vías: la vía glucolítica o Embden-Meyerhof y la PPP (figura 6). Esta vía consta de dos fases: una fase oxidativa la cual comienza con la glucosa-6-fosfato (G6P, proveniente de la glucólisis), en la cual se produce principalmente poder reductor en forma de NADPH y una fase no oxidativa en donde se lleva toda una serie de reacciones reversibles, el sentido de las cuales depende de la disponibilidad del sustrato, produciendo intermediarios como la ribulosa -5-fosfato requerida para la síntesis de ácidos nucleicos o la eritrosa-4-fosfato, un precursor de aminoácidos aromáticos y vitaminas.

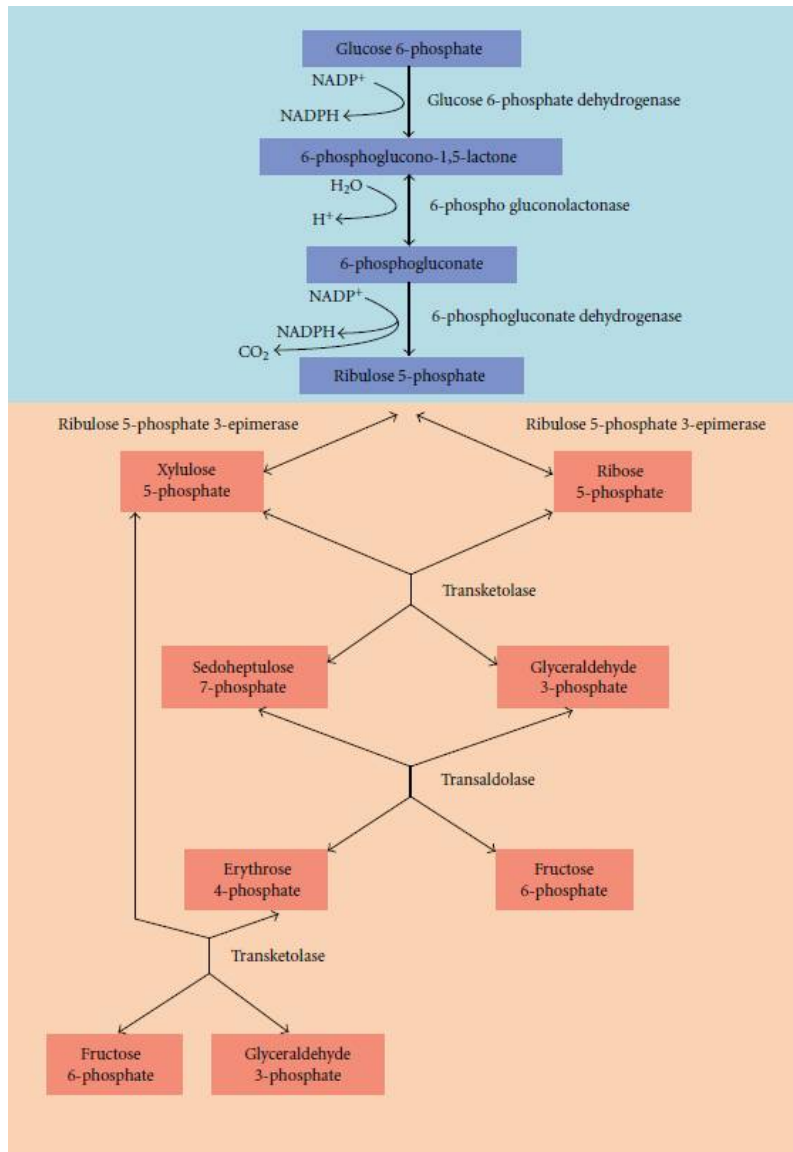


Figura 6. Vía de las pentosas fosfato. En el esquema se muestra con fondo azul la fase oxidativa y en fondo naranja la no oxidativa. Las enzimas involucradas son la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), 6-fosfogluconolactonasa (6PGL), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), ribosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa (RPE), transaldolasa, y la transcetolasa.

Maugeri y Cazzulo (2004) reportaron que el 10% de la glucosa consumida en un cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* en condiciones normales se metaboliza por la PPP. Se han realizado ensayos similares en *L. mexicana*, mostrando que alrededor de 5.7% de la glucosa consumida se metaboliza por la PPP [Maugeri *et*

al., 2003]. Atamna *et al.* (1994) observaron que el flujo de glucosa a través de la PPP en *Plasmodium falciparum* se incrementa al agregar azul de metileno, el cual genera estrés oxidante al consumir el NADPH, oxidándolo en NADP⁺. En un cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* en presencia de 0.2 mM de azul de metileno, el flujo de glucosa a través de la PPP aumentó hasta un 20%, y esto se relaciona con una disminución en el cociente NADPH/NADP⁺, liberando así la inhibición que ejerce la NADPH en la primera enzima de la vía, la G6PDH [Maugeri y Cazzulo, 2004, Igoillo y Cazzulo, 2006].

En la tabla 1 se muestra la actividad de las siete enzimas de la PPP en los 3 estadios del ciclo biológico de *T. cruzi* (cepa CL Brener), epimastigotes, tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos y amastigotes. Casi todas las otras enzimas de la PPP presentan una actividad específica mayor en tripomastigotes metacíclicos, a excepción de la RPE, la cual tiene una actividad específica más alta en epimastigotes y amastigotes. Es importante notar que la G6PDH (la enzima que en muchos sistemas se conoce como la que regula a la vía) es un orden de magnitud menor en epimastigotes que en otros estadios. Esto sugiere que la PPP puede ser más activa en los estadios presentes en los hospederos mamíferos y/o durante la invasión [Maugeri y Cazzulo, 2004], debido a que el parásito necesita una mayor cantidad de NADPH para combatir con el estrés oxidante.

Enzyme ^a	Epimastigotes	Amastigotes	Metacyclic trypomastigotes	Cell-culture trypomastigotes
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	69 ± 2	767 ± 81	1030 ± 150	541 ± 42
6-Phosphogluconolactonase	1020 ± 10	1190 ± 490	2060 ± 110	793 ± 81
6-Phosphogluconate dehydrogenase	289 ± 8	346 ± 39	1130 ± 80	289 ± 5
Ribose-5-phosphate isomerase	93 ± 4	21 ± 2	108 ± 4	76 ± 8
Ribulose-5-phosphate epimerase	527 ± 24	517 ± 16	255 ± 18	385 ± 11
Transketolase (ribose-5-phosphate)	166 ± 4	87 ± 5	376 ± 27	168 ± 6
Transketolase (erythrose-4-phosphate)	194 ± 3	140 ± 7	529 ± 9	225 ± 6
Transaldolase	45 ± 2	70 ± 8	204 ± 18	135 ± 6

Tabla 1. Actividades enzimáticas de enzimas de la PPP. Obtenidas en homogenizados de parásitos. Las velocidades se expresan en nmoles min⁻¹ mg de proteína⁻¹. [Tomado de Maugeri y Cazzulo, 2004].

Se sabe que en tripanosomátidos existe el llamado glicosoma, el cual es un organelo (parecido al peroxisoma) que en los Kinetoplastida albergan de forma única 6 de las enzimas de la vía glucolítica, la hexocinasa, la glucosa-6-fosfato isomerasa, la fosfofructocinasa, la aldolasa, la triosafosfato isomerasa y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, siendo la hexocinasa la enzima que produce la glucosa-6-fosfato, sustrato necesario para iniciar la PPP. [Maugeri y Cazzulo, 2004]. Por su parte, las actividades que se muestran en la tabla 1 son predominantemente citosólicas, con un posible pequeño componente glicosomal [Maugeri y Cazzulo, 2004].

1.5. Cinética enzimática

Los principios generales de la cinética de las reacciones químicas son aplicables a las reacciones catalizadas por las enzimas, en los seres vivos. No obstante, éstas muestran un rasgo característico que no se observa en los catalizadores no enzimáticos, se trata de la saturación por el sustrato, entendida en términos de ocupación de los centros activos de la enzima.

Estudiar el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de una enzima no es sencillo, si pensamos que lógicamente la concentración del sustrato disminuye según avanza la reacción. Una simplificación en los experimentos cinéticos consiste en medir la velocidad inicial (V_i). Si el tiempo es suficientemente corto la disminución de sustrato será mínima y ésta podrá considerarse, por tanto, casi constante. La figura 8 muestra el efecto de distintas concentraciones de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción catalizada por un enzima.

Este comportamiento es característico de la mayoría de las enzimas y fue estudiado por Michaelis y Menten en 1913. En la cinética enzimática de la figura 8 se distinguen tres fases:

- Para una concentración baja de sustrato, la velocidad de la reacción es directamente proporcional a la concentración del sustrato (relación lineal), la cinética es de primer orden.
- Para una concentración alta de sustrato, la velocidad de la reacción se hace prácticamente constante e independiente de la concentración de sustrato, la cinética se considera de orden cero.
- Para concentraciones de sustrato intermedias la velocidad del proceso deja de ser lineal, y a esta zona se la denomina de cinética mixta.

La velocidad de una reacción catalizada (V) nos indica la cantidad de sustrato consumido, o producto formado, por unidad de tiempo. En el Sistema Internacional se designa por "U" (unidad de actividad enzimática) y corresponde a los μ moles de sustrato consumidos en 1 min, o bien a los μ moles de producto formado en 1 min.

La curva que expresa la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad inicial tiene la misma forma para la mayoría de las enzimas; se trata de una hipérbola rectangular, cuya expresión algebraica viene dada por la ecuación de Michaelis-Menten, $v_i = V_m * [S] / (K_m + [S])$, donde muestra la relación entre la velocidad inicial (V) y la concentración de sustrato, $[S]$.

Los términos V_m (*velocidad máxima*) y K_m (*constante de Michaelis*) son dos parámetros cinéticos característicos de cada enzima, que pueden determinarse experimentalmente.

La V_m se obtiene cuando la velocidad de reacción se hace independiente de la concentración de sustrato, cuando esto ocurre la velocidad alcanza un valor máximo. Este valor depende de la cantidad de enzima que tengamos.

La K_m nos indica la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. Este parámetro es independiente de la concentración de enzima, y es característico de cada enzima según el sustrato

utilizado (si tiene varios). La K_m también indica la afinidad que posee la enzima por el sustrato, siendo ésta mayor, cuanto menor es la K_m . Cuanto menor sea la K_m menor será la cantidad de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima, por lo que mayor será la afinidad del enzima hacia ese sustrato.

A partir de la ecuación de Michaelis-Mente podemos explicar matemáticamente las tres fases de la curva de la figura 8, así:

- A baja $[S]$, es decir si $K_m \gg [S]$, el término $K_m + [S]$ podemos aproximarlo a la K_m , quedando un expresión del tipo:

$$V = k' [S]$$

Esta es una cinética de primer orden, que se caracteriza por una variación lineal de la V respecto al tiempo, como tiene lugar en la primera fase.

- A altas $[S]$, es decir, $K_m \ll [S]$, despreciaríamos K_m frente a $[S]$, con lo que $V = V_m$ (que sería constante); la cinética es de orden cero y se habría alcanzado la saturación por sustrato, como ocurre en la fase final.

El tramo intermedio, en el que la $[S] \approx K_m$ correspondiente a una cinética de orden mixto y se ajusta a la ecuación de Michaelis [Nuñez de Castro, 2001].

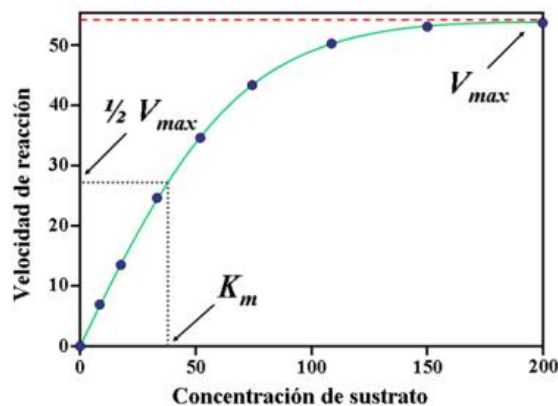


Figura 8. Curva de saturación por sustrato. Se puede observar la evolución de la velocidad de la reacción, con respecto a la concentración de sustrato; al

aumentar el sustrato aumenta la velocidad de reacción hasta alcanzar su velocidad máxima. La concentración donde se alcanza la mitad de la V_m es el valor de K_m .

1.6. Enzimas deshidrogenasas

Las deshidrogenasas son enzimas capaces de catalizar la oxidación o reducción de un sustrato por sustracción o adición de dos átomos de hidrógeno (deshidrogenación), empleando un par de coenzimas que actúan como aceptores o como donadores de electrones y protones; las principales coenzimas implicadas en estas reacciones redox son los pares $NAD^+/NADH$ (dinucleótido de nicotinamida) y $NADP^+/NADPH$. Las enzimas deshidrogenasas siguen un mecanismo ordenado donde la unión del primer sustrato provoca un cambio conformacional en la enzima, con lo cual se abre el sitio de unión para el otro sustrato (figura 7). Muchas enzimas deshidrogenasas que requieren NAD^+ o $NADP^+$ siguen un mecanismo ordenado bisustrato, en el que la coenzima es el primer sustrato [Voet, 2007].



Figura 7. Ecuación de un mecanismo ordenado

1.7. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

En *T. cruzi* CL Brener, la G6PDH está codificada por varios genes localizados en tres cromosomas del parásito que genera una enzima dimérica con un peso molecular de 113 kilo Daltones (kDa) [Igoillo y Cazzulo, 2006]. El análisis por inmunofluorescencia de la localización subcelular de la G6PDH revela que la enzima se encuentra principalmente en el citosol, con una pequeña fracción glicosomal [Igoillo, 2005]; además algunos experimentos con digitonina sugieren que existe una fracción muy pequeña en el retículo endoplásmico, como se ha reportado en células de mamífero [Igoillo y Cazzulo, 2004]. Se han identificado dos

pseudogenes y varios otros que, por su gran parecido en regiones de codificación (98%), podrían estar agrupados en tres grupos, pero tienen diferencias considerables en las secuencias río arriba y río abajo de sus marcos abiertos de lectura (ORF por sus siglas en inglés), aunque la mayoría de los cambios de los aminoácidos son conservativos, además de que no están involucrados en residuos importantes para la catálisis. Los genes de G6PDH de *T. cruzi* y *T. brucei* tienen dos posibles codones de inicio, separados por 111 pares de bases (pb), mientras que en *L. major* sólo existe un único codón de inicio. La región entre los dos codones de inicio codifica para una extensión N-terminal de 37 residuos; la forma larga de las enzimas de *T. cruzi* y *T. brucei* codifican para cadenas polipeptídicas de 555 y 557 residuos respectivamente, mientras que la de *L. major* es de 562 residuos. Las secuencias entre los genes de *T. cruzi* y *T. brucei* o *L. major* muestran un 69% y 64% de identidad respectivamente. Un análisis por Western blot utilizando anticuerpos contra el péptido N-terminal de la G6PDH de *T. cruzi* mostró que la forma larga de la enzima es la que se expresa principalmente en los 4 estadios del parásito [Igoillo y Cazzulo, 2006].

Interesantemente se ha visto que la forma larga y corta de la G6PDH de *T. cruzi* presentan varias diferencias cinéticas. La enzima recombinante purificada en su forma larga y corta tienen valores de (K_m) para la G6P de 190 y 98 μM respectivamente, mientras que para la nativa es de 288 μM (tabla 2). En contraste, los valores de K_m para el NADP^+ no difirieron entre ambas enzimas (4.0 y 3.6 μM respectivamente). Una característica particular de la enzima nativa es la pérdida de actividad en presencia de agentes reductores, como el β -mercaptoetanol (β -ME), el GSH y el ditioneitol (DTT). El efecto predominante se obtuvo cuando la enzima se incubó en presencia de 25 mM DTT, obteniendo 90% de inhibición después de 15 min. Cuando la enzima se incubó con β -ME o GSH a la misma concentración durante el mismo tiempo, la inhibición únicamente fue del 30 y 50 % respectivamente. Contrariamente, la forma corta de la enzima se activó hasta en un 80% con 15 mM GSH después del mismo tiempo de incubación [Igoillo y Cazzulo, 2006]. La inhibición de la forma larga de la enzima por agentes

reductores se correlaciona con la presencia de los residuos 8 y 35 de cisteína (Cys) en la extensión N-terminal de la proteína, el cual también se observa en la G6PDH de cloroplastos de plantas y cianobacterias [Wenderoth *et al.*, 1997]. La región correspondiente a la extensión N-terminal de la G6PDH de *Leishmania spp.* no contiene estos residuos de Cys, lo cual concuerda con ensayos en los que la enzima no es inhibida por el DTT. [Igoillo y Cazzulo, 2006]. Es por eso que se sugiere que la G6PDH de *T. cruzi* podría estar regulada por el estado redox de la célula, como en el caso de la enzima de plantas y cianobacterias. En efecto, los estudios cinéticos de las dos formas de la enzima purificada, muestran que la forma larga es 4 veces más sensible a la inhibición por producto que la forma corta, lo que sugiere que esta actividad está regulada por el cociente NADPH/NADP⁺ en los compartimientos de la célula en donde la enzima está localizada (citosol, glicosoma y retículo endoplásmico), lo cual se ha propuesto para la enzima de *Anacystis nidulans* [Cs'eke *et al.*, 1981].

	<i>Trypanosoma cruzi</i> G6PDH-S (+DTT)			<i>Trypanosoma cruzi</i> G6PDH-L (-DTT)			<i>T. brucei</i> G6PDH	Human G6PDH		
	app K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	app K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	app K_m	app K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m
G6P	98.4 ± 13.8	99.3 ± 24.4	1.01	189.9 ± 11.2	190.0 ± 64.0	1.0	138 ± 18	100	190	1.9
NADP	4.0 ± 1.2	88.4 ± 7.4	22.1	3.6 ± 1.7	132.5 ± 17.1	36.8	5.3 ± 0.7	10	190	19

Tabla 2. Constantes cinéticas de la G6PDH. Los valores de K_m y la contante catalítica (k_{cat}) están expresados en $\mu\text{M s}^{-1}$, respectivamente [Igoillo y Cazzulo, 2006].

La relevancia de la G6PDH en el mecanismo de defensa de *T. cruzi* contra el estrés oxidante se demuestra con el siguiente experimento: se incubaron tripomastigotes metacíclicos a diferentes concentraciones de H_2O_2 y se observó que después de 6 horas (h) de incubación en presencia de 70 μM del agente oxidante, la actividad específica de la G6PDH incrementa 46 veces; además, este incremento corresponde con un aumento en los niveles de proteína determinados por Western blot. (Figura 9). Por otro lado el mismo experimento desarrollado en epimastigotes, el estadio que naturalmente no está en contacto con la respuesta del hospedero, revela un decremento de la actividad específica de G6PDH con

respecto al tiempo, así como una disminución de la cantidad de proteína [Igoillo y Cazzulo, 2006].

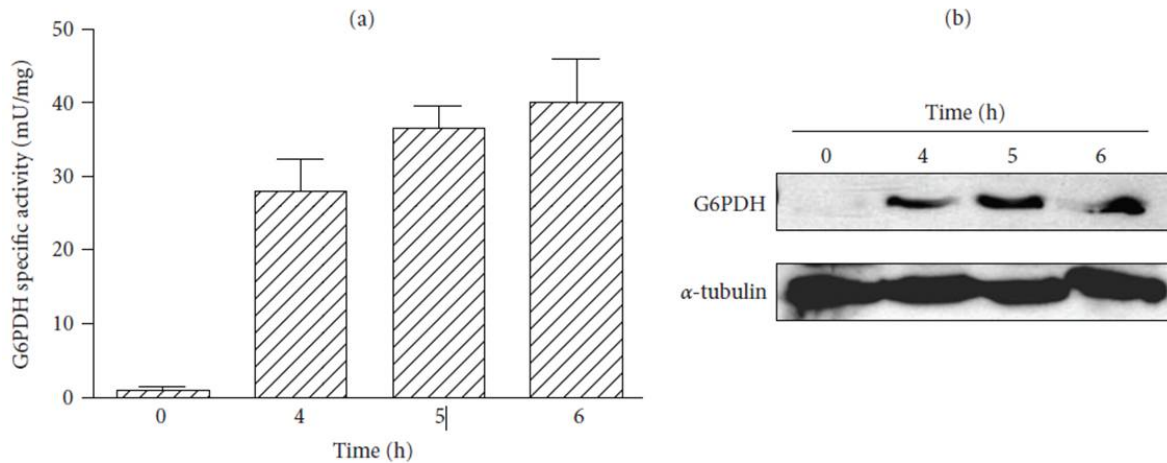


Figura 9. Inducción en la expresión de G6PDH. La cantidad de proteína y la actividad de la G6PDH de *T. cruzi* aumentó al incubar tripomastigotes metacíclicos durante 4 a 6 h en presencia de 70 μ M de H_2O_2 . Tomado de Igoillo y Cazzulo (2006).

Estos resultados muestran que los tripomastigotes metacíclicos al poder sobreexpresar la G6PDH, pueden contender mejor con el estrés oxidante siendo el estadio que naturalmente está más expuesto a él, por ser el encargado de la invasión de las células del hospedero.

1.8. 6-fosfogluconato deshidrogenasa

El gen de la 6PGDH de *T. cruzi* está codificada en una sola copia por genoma haploide en CLBrener, y genera una enzima dimérica con un peso de 93 kDa [Igoillo y Cazzulo, 2004]. El análisis por inmunofluorescencia de la localización subcelular de la 6PGDH, revela que la enzima se encuentra principalmente en el citosol, con una pequeña fracción glicosomal [Igoillo-Esteve M., 2005], además algunos experimentos con digitonina sugieren que existe además una fracción

muy pequeña en el retículo endoplásmico, como se ha reportado en células de mamífero [Igoillo y Cazzulo, 2004].

Se ha reportado que tanto la enzima 6PGDH nativa como la recombinante de *T. cruzi* son inestables al tiempo (inactivación del 40% de su actividad después de 24 h), así como a la dilución debido a la débil interacción entre sus monómeros, lo cual ha dificultado su caracterización; sin embargo, tal inestabilidad no ha sido reportada para la enzima de *T. brucei* con la cual tiene un 78.6% de identidad. Phillips *et al.* (1998), hicieron un análisis estructural del dímero de la 6PGDH de *T. brucei* y determinaron que existen 5 puentes salinos entre las subunidades, los cuales son esenciales para la estabilización de la actividad de la enzima dimérica.

A partir de estos datos, Igoillo y Cazzulo (2004), realizaron una comparación entre la 6PGDH de *T. cruzi* y *T. brucei*, y se observó que la de *T. cruzi* tiene dos puentes salinos menos que la de *T. brucei*, que se relaciona con la inestabilidad de la primera. En ese mismo trabajo se realizó una mutagénesis sitio dirigida (haciendo una doble mutante), para generar una proteína que de acuerdo con el modelo computacional tendría los cinco puentes salinos. Por un análisis en filtración en gel se pudo determinar que esta mutante permanece como un dímero, aún en condiciones en que la enzima no mutante tendría una disociación significativa; posteriormente también se demostró que la enzima mutante es más estable que su contraparte nativa o la recombinante. Esto permitió su estudio cinético.

Se determinó que la 6PGDH de *T. cruzi* tiene una K_m por 6-fosfogluconato (6PG) similar a su contraparte en humano (con la cual comparte el 32.1% de identidad), pero la K_m por NADP^+ ($5.9 \mu\text{M}$) (Tabla 3), es 4 veces mayor que la de *T. brucei* pero 5 veces más baja que la reportada en humanos ($30\mu\text{M}$) [Igoillo y Cazzulo, 2004].

	<i>Trypanosoma cruzi</i>			<i>Trypanosoma brucei</i>			Human		
	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m
6PG	22.2	98	4.4	3.5	27	7.7	20	13	0.7
NADP	5.9	98	16.6	1.5	27	18	30	13	0.4

Tabla 3. Comparación de los parámetros cinéticos de 6PGDH. Los valores de K_m y k_{cat} están expresados en μM y s^{-1} , respectivamente. Todos los parámetros se determinaron a pH 7.5. [Igoillo y Cazzulo, 2004].

2. Hipótesis:

Si tanto la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa como la 6-fosfogluconato deshidrogenasa suministran NADPH a partir del NADP⁺, entonces la enzima menos eficiente será aquella que, en condiciones cercanas a las fisiológicas, tenga menor afinidad, se encuentre limitada por el otro sustrato y/o tenga una menor actividad *in vivo*, y por lo tanto estará limitando el suministro de NADPH en la célula.

3. Objetivos:

3.1. Objetivo general:

- Caracterizar cinéticamente a las enzimas G6PDH y 6PGDH de *T. cruzi* en condiciones fisiológicas de pH y temperatura

3.2. Objetivos particulares:

- Amplificar por PCR y clonar los genes de las enzimas G6PDH y 6PGDH
- Sobre expresar y purificar las enzimas recombinantes.
- Caracterizar ambas enzimas en condiciones fisiológicas de pH y temperatura

4. Metodología:

4.1. Diseño de oligonucleótidos

A partir de las secuencias reportadas para la G6PDH y 6PGDH en GenBank de *T. cruzi* cepa CL Brener, se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos de los extremos 5' y 3' de los genes a los cuales se les adicionaron sitios de corte para enzimas de restricción en sus extremos (*Nhe I /HindIII* y *Nde I / HindIII*, respectivamente).

La secuencia de los oligonucleótidos se muestra a continuación:

G6PDH sentido

5' CGTACATATGAGTGGATCGGAGAATCG 3'

G6PDH antisentido

5' TAGCAAGCTTTTACGCGTTTGAGCAC 3'

6PGDH sentido

5' CGTAGCTAGCGACGTTGGCATTGTTG 3'

6PGDH antisentido

5' TAGCAAGCTTTCAGTGTAGCTCCGGCC 3'

Los sitios de restricción se marcan con un cuadro.

4.2. Amplificación de los genes

Los genes se amplificaron por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico de *T. cruzi* de la cepa ninoa, la reacción contiene (volumen final de 50 µL):

2 mM MgSO₄

100 µM desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs)

2% DMSO

10 ng (albúmina bovina sérica) BSA

200 ng cebador Fw

200 ng cebador Rw

650 ng ADN

1.25 U Polimerasa Pfu

Para amplificar se utilizó es el siguiente programa: 95 grados Celsius (°C) por 5 min para desnaturalizar el ADN; 30 ciclos conformados por: 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de alineamiento a 54°C para la G6PDH y a 60°C para la 6PGDH y 1 min de extensión a 72°C; por último se dio un lapso de 5 min a 72°C.

Posteriormente el producto de la PCR se le realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Esta técnica nos permite separar las moléculas de acuerdo a su movilidad en un campo eléctrico, obedeciendo a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa; de este modo, las moléculas de ADN cargadas negativamente, migran hacia el ánodo, y lo harán con mayor velocidad aquellas con un menor peso molecular. Las muestras se corren a 100 volts y posteriormente se observan en un transiluminador en el cual se exponen a luz UV. Con esto es posible observar las bandas de ADN debido a que el gel de agarosa contiene bromuro de etidio (5 µg/mL), el cual se intercala en los ácidos nucleicos emitiendo una fluorescencia al exponerlo a luz UV.

Los fragmentos que corresponden al peso esperado de cada enzima, 1668 y 1434 para la G6PDH y 6PGDH respectivamente, se cortaron y purificaron utilizando el kit (Zymoclean™). Primeramente se disuelve la agarosa a 55°C, con un amortiguador que contiene ioduro de sodio el cual evita que la agarosa se resolidifique. Posteriormente se transfiere a una columna que contiene una matriz en donde el ADN se adsorbe, se centrifuga a 20817 x g / 30 s y la matriz se lava dos veces con amortiguador adicionado con etanol a una concentración final del 70 %. Finalmente el ADN se eluye con 6µL de agua, en un tubo limpio.

4.3. Ligación al vector de clonación pJet 1.2/blunt

Los fragmentos purificados se ligaron a un vector de clonación (pJet 1.2/blunt), el cual es un vector lineal que confiere resistencia a ampicilina, la reacción contiene:

6 μ L producto de PCR purificado
5U de ADN ligasa
50 ng pJet 1.2/blunt Cloning Vector
3U T4 ADN polimerasa
Agua c.b.p. 20 μ L

Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, y con el producto se transformaron células competentes de *E. coli* Top10 por choque térmico. Se mezclaron 10 μ L de la reacción de ligación con 50 μ L de células competentes, se incubó en hielo durante 30 min y posteriormente se colocó en un baño a 42°C durante 40 s. Las muestras se transfirieron inmediatamente al hielo para inducir el choque térmico y se incubaron durante 3 min. Transcurrido ese tiempo se agregó 1 mL medio líquido Luria-Bertani (LB) y se incubó a 37°C durante una hora para lograr su estabilidad membranal. Las células se cosecharon por centrifugación a 450 x g y se plaquearon en medio LB sólido con 100 μ g/mL de ampicilina. Para seleccionar las bacterias que lograron transformarse de aquellas que no, se utiliza la ampicilina. Además el vector pJET tiene interrumpida la secuencia que codifica para la endonucleasa *eco47IR*, una enzima letal; en caso de que el vector se circularizara sin el fragmento deseado, se expresaría la enzima letal y la célula moriría.

Se seleccionaron 5 colonias y se cultivaron en 5mL de medio LB a 37 °C con 100 μ g/mL ampicilina durante toda la noche. Posteriormente, las células se cosecharon y se aisló el ADN plasmídico por el método de miniprep con el kit Wizard Plus SV Minipreps ADN Purification System. El cultivo se centrifugó a 450 x g por 5 min, obteniendo así la pastilla celular, que se resuspendió en 250 μ L de solución de

resuspensión celular (50 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), 100 µg/mL RNasa A), se lisaron agregando 250 µL de solución de lisis celular (0.2 M NaOH, 1% SDS) junto con 10 µL de solución de proteasa alcalina la cual inactiva a las endonucleasa y otras proteínas de forma no específica liberadas durante la lisis de la bacteria que pueden afectar la calidad del ADN, esta mezcla se incubó por 5 min. Las proteasas alcalinas se neutralizaron con un agente desnaturante agregando 350 µL de solución de neutralización (4.09 M hidrocloreuro de guanidinio, 0.759 M acetato de potasio, 2.12 M ácido acético glacial, pH 4.2). La mezcla se centrifugó a 16000 x g por 10 min. El sobrenadante se decantó en una columna y se centrifugó durante 1 min donde el ADN se adsorbe a la matriz. El filtrado se descartó y la columna se lavó dos veces con 750 o 250 µL de solución de lavado (60 mM acetato de potasio, 8.3 mM Tris-HCl pH 7.5, 40 µM EDTA pH 8.0, 60% etanol). Finalmente, el ADN se eluyó adicionando 100 µL de agua libre de nucleasas a la columna y se centrifugó a 16000 x g por 1 min.

4.4. Identificación del gen. Análisis de restricción y secuenciación

Con el ADN plasmídico purificado de las 5 transformantes, se realizó una restricción con las enzimas que liberan el inserto del plásmido siendo *NdeI* y *HindIII* para la G6PDH y *NheI* y *HindIII* para la 6PGDH. A las transformantes que contenían el plásmido se les realizó una restricción con diferentes enzimas; para la G6PDH se utilizaron las enzimas *AvaI* y *HindIII*, mientras que para la 6PGDH se utilizaron *PstI* y *HindIII*, estas reacciones de restricción se llevaron a cabo en 20 µL y contenían:

- 10 µL muestra de ADN plasmídico
- 2 µL amortiguador 2 (50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT)
- 10 U de cada enzima de restricción
- 0.02 µg de BSA únicamente para la restricción que lleva *NheI*

Las reacciones se incubaron a 37°C durante 2 h.

Por otra parte, cada uno de los insertos se secuenciaron en un secuenciador automático en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, para compararlas posteriormente con las secuencias reportadas en el GenBank para la cepa CL Brener de *T. cruzi*.

4.5. Ligación de los genes al vector de sobreexpresión

Una vez confirmada la identidad de los fragmentos, los genes se subclonaron en el vector pET 28, éste confiere resistencia a kanamicina y permite la sobreexpresión de proteínas recombinantes en células *E. coli*. (BL21 DE3). La característica de estas células es que contienen el gen que codifica a la T7 RNA polimerasa (proveniente del bacteriófago T7) en su genoma, el cual está regulado por el promotor *lacUV5*, cuya expresión se induce por medio de del inductor isopropyl- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), un análogo de la lactosa. En este sistema, el vector utilizado para la expresión de la secuencia codificante de la proteína de interés, incorpora una región promotora reconocida por la T7 RNA polimerasa, también regulada por el promotor *lacUV5* de manera que tras la adición del IPTG, la T7 RNA polimerasa expresada desde el cromosoma bacteriano induce la expresión de la proteína codificada en el vector.

Así se logra mantener el gen blanco transcripcionalmente silenciado en ausencia del inductor. La Figura 10 muestra cómo se da el control de la expresión de cada uno de los genes.

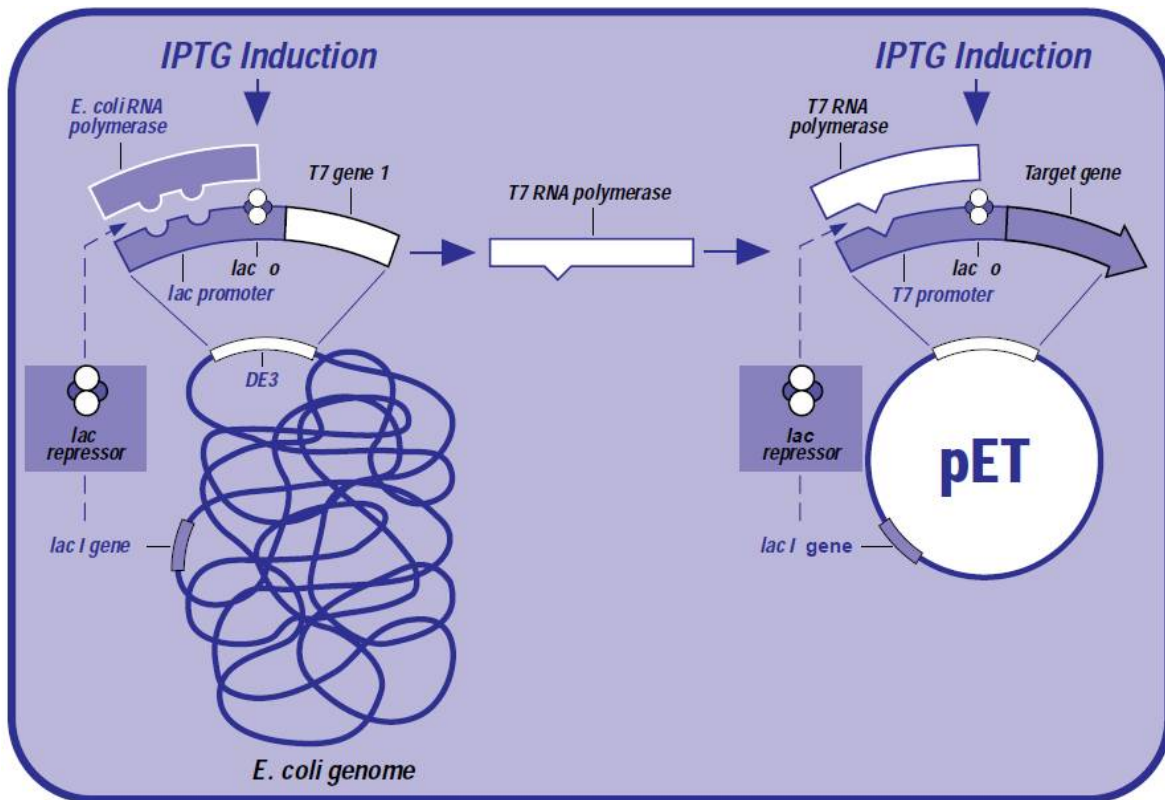


Figura 10. Mecanismo de control del sistema pET. Por medio de la inducción del IPTG el represor Lac I no se une a la región operadora *lac O*, permitiendo a la célula expresar la T7 RNA polimerasa, de igual forma ocurre en el plásmido, donde se encuentra el gen blanco, precedido por el promotor T7. Modificado de pETSystem Tutorial tomado de: www.ebiotrade.com/buyf/productsf/Novagen/C183-002.pdf

Se realizó la restricción tanto de los plásmidos pJet 1.2/blunt que contienen los genes de interés como del plásmido de sobreexpresión pET28. Se utilizaron las enzimas *NdeI* y *HindIII* para la G6PDH y *NheI* y *HindIII* para la 6PGDH. El vector pET28 se desfosforiló con fosfatasa alcalina para evitar su recircularización. Los fragmentos obtenidos a partir de las restricciones del vector pJet 1.2/blunt se purificaron y ligaron al vector pET28 cortado con las mismas enzimas. Para ligar los fragmentos al vector pET28 se realizó una reacción a 16°C durante toda la noche la cual contenía:

- 5 μL pET28 (>50 ng/ μL)
- 10 μL inserto (>25 ng/ μL)
- 2 μL amortiguador de reacción (200 mM Tris-Cl pH 7.6, 10 mM MgCl_2 , 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ albúmina bovina sérica acetilada)
- 1 μL T4 ADN ligasa (0.2 U)

Se tomaron 10 μL de la ligación para transformar células de *E. coli* BL21(DE3). Las células se plaquearon en medio LB sólido con 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina y se incubaron a 37°C toda la noche.

4.6. Sobreexpresión de proteínas

Para identificar las clonas capaces de sobreexpresar la proteína de interés, se seleccionaron 5 transformantes junto con un control (bacterias sin el plásmido), las cuales se inocularon en 5 mL de medio LB líquido con 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina, a 37 °C en agitación, el cultivo se monitoreó hasta llegar a una densidad óptica (DO) a 600nm de entre 0.6 y 0.8. En ese momento se indujo la expresión de la enzima con la adición de IPTG a una concentración final de 0.4 mM, y se incubaron en agitación a 25°C durante toda la noche.

La sobreexpresión de las enzimas en cada uno de los diferentes cultivos de las transformantes se confirmó por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE: por sus siglas en ingles sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), tomando 20 μL del cultivo a los que se añadió 5 μL de amortiguador de carga (10% glicerol, 10% SDS, 0.02% azul de bromofenol, 5% β -ME) para posteriormente romperlas en ebullición durante 5 min. Las muestras se cargaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 12% junto con un estándar de peso molecular para proteínas. Las proteínas se separaron a 100 volts. El gel se tiñó con una solución de azul de coomassie (50% MetOH, 7.5% ácido acético, 0.2% azul brillante de coomassie R-250) y se destiñó con una solución desteñidora (50% MetOH, 7.5% ácido acético) revelando de esta manera las células que sobreexpresan a las enzimas.

A partir del paso anterior se cultivaron células control y células que sobreexpresaban en abundancia a cada enzima, realizando cultivos de 25 mL de medio LB líquido con kanamicina, en las condiciones descritas anteriormente, las células se cosecharon a 2547 x g durante 10 min y se resuspendieron en 10 mL de amortiguador de lisis (100 mM trietanolamina), 300 mM NaCl, 2 mM imidazol). Posteriormente se rompieron por sonicación aplicando 5 ciclos de 1 min de sonicación al 15 % de output total y 1 min enfriamiento. El lisado celular se centrifugó a 12000 x g durante 15 min. el sobrenadante y el precipitado se separaron por decantación y el precipitado se resuspendió en 10 mL de amortiguador de lisis. Se tomaron 20µL de cada uno y se trataron como se describió anteriormente para cargarlos en un gel SDS-PAGE. A partir del gel se pudo determinar si las enzimas de interés quedaban en la sobrenadante o en el precipitado, pues se compararon con un marcador de peso molecular.

4.7. Purificación de proteínas

Se prepararon cultivos de 250 mL de células sobreexpresantes de cada enzima, de la manera descrita anteriormente. Las células se cosecharon y se resuspendieron en 10 mL de amortiguador de lisis, se sonicaron por 5 ciclos y el lisado se centrifugó como se describió anteriormente.

Con base en el mapa del vector pET28, las proteínas recombinantes se expresan en la bacteria con una etiqueta de 6 histidinas en sus extremos N-terminal, lo cual facilita su purificación por cromatografía de afinidad a cobalto. El sobrenadante se mezcló con 1 mL de una resina TALON metal-affinity resin (Clontech) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente bajo agitación lenta. Transcurrido este tiempo, la resina se centrifugó a 832 x g durante 5 min a 4°C para separarla del sobrenadante, el cual no contiene a la enzima. Se realizaron tres lavados a la resina (para eliminar el pegado inespecífico de proteínas) con 10 mL de amortiguador de lisis, incubando 10 min con agitación suave y centrifugando

igualmente a 832 x g durante 5 min a 4°C para colectar la resina. En el tercer lavado, la resina se vertió en una jeringa de 15 mL con un filtro en la parte inferior. El cuarto lavado se realizó con 10 mL de amortiguador de lisis con una concentración de 10 mM de imidazol y finalmente la proteína se eluyó con 10 mL de amortiguador de lisis con 100 mM de imidazol, éste eluido se concentró por medio de filtros tipo Amicon (Millipore) con un corte de 30 kDa, los cuales se centrifugaron 450 x g durante media hora a 4°C. Al concentrado de la enzima se le agregó glicerol a una concentración final del 50% y se guardó a -20°C.

4.8. Cuantificación de proteínas

Las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry, para esto se tomaron por duplicado 5-20 µL de las proteínas purificadas a las cuales agregamos ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final de 13% para precipitar las proteínas, esta mezcla se incubó durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación se centrifugaron las muestras durante 15 min a 20817 x g a 4°C, la proteína precipitada se resuspendió en 100 µL de SDS al 1%. Se construyó una curva patrón con BSA de 0, 5, 10, 20, 40,60 y 80 µg en un volumen final de 100 µl de SDS al 1%, posteriormente se les agregó 1.0 mL de una mezcla 1:50 de solución B (0.4% CuSO₄) y de solución A (1% SDS, 2% Na₂CO₃, 0.4% NaOH y 0.16% de tartrato de Na-K) respectivamente y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente, en seguida se les agregaron 100 µL de reactivo de folin-Ciocalteaus diluido 1:2 y se incubaron durante 30 min. Para la cuantificación, se midió la absorbancia a 660 nm utilizando como blanco la muestra sin BSA de la curva patrón.

4.9. Ensayos enzimáticos

Los ensayos enzimáticos se realizaron en celdas de 1mL a 37°C en un espectrofotómetro con arreglo de diodos (Agilent), las mediciones se obtuvieron monitoreando la formación de NADPH a 340 nm. La mezcla estándar de reacción

contenía: amortiguador (40 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.4, 140 mM KCl). El ensayo se realizó bajo condiciones de velocidad inicial manteniendo limitante la enzima a medir en ausencia de producto, variando la concentración de su sustrato mientras el otro sustrato estaba a concentración saturante. Para llegar a los ensayos enzimáticos estándar fue necesario determinar previamente la concentración en la que se obtiene la V_m , por lo que se hizo al menos una curva de saturación para cada enzima y por cada sustrato, con base en los valores reportados en la literatura. Para obtener los parámetros cinéticos de G6PDH se utilizó una concentración saturante de 220 μM NADP^+ o 3 mM de G6P, para determinar la Km_{G6P} se varió la concentración de G6P de 5 a 260 μM y para la Km_{NADP^+} el NADP^+ se varió de 15 a 7000 μM agregando 0.26-0.4 μg de la enzima recombinante. Por su lado para determinar los parámetros cinéticos de la 6PGDH las concentraciones saturantes utilizadas fueron 160 μM de NADP^+ y 220 μM de 6PG. . Para obtener la Km_{6PG} se usaron concentraciones de 6PG entre 5 y 1200 μM mientras que para la Km_{NADP^+} el NADP^+ se varió de 5 a 300 μM agregando entre 0.15 y 0.77 μg de la enzima recombinante.

Para medir la actividad de las enzimas en el extracto, la mezcla estándar de reacción fue la descrita en el párrafo anterior a concentraciones saturantes de sustratos, y se varió la cantidad de proteína del extracto entre 0.04 y 0.38 mg para la G6PDH y entre 0.026 y 0.25 mg para la 6PGDH.

4.10. Obtención de extractos celulares

Se cultivaron epimastigotes de *T. cruzi* en 10 mL de medio LIT (0.5 % NaCl, 0.04 % KCl, 0.75 % Na_2HPO_4 , 0.5 % triptosa, 0.3 % de extracto de levadura, 0.3 % de infusión de hígado, ajustado a pH 7.2) a 28 °C. El cultivo se escaló hasta llegar a 150 mL a una concentración de 10 a 15 millones de parásitos/mL. Los parásitos se cosecharon por centrifugación a 450 x g durante 10 min a 4°C, y se realizaron dos lavados resuspendiendo la pastilla celular en amortiguador PBS (137 mM de NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , ajustado a pH 7.4), y centrifugando

nuevamente; para el primer lavado se utilizaron 10 mL y 1 mL para el segundo. Finalmente se resuspendió la pastilla en amortiguador de lisis de tripanosomas (20 mM Hepes, 1.0 mM EDTA, 0.15 mM KCl, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) y las células se rompieron por congelación con nitrógeno líquido/descongelación a 37 °C, 3 veces. El lisado celular se centrifugó (20817 x g por 10 min a 4°C) para obtener la fracción citosólica.

5. Resultados:

5.1. Amplificación de los genes que codifican para la G6PDH y 6PGDH de *T. cruzi*

Con base en las secuencias de los genes que codifican para la G6PDH y 6PGDH reportadas en el banco del genoma de *T. cruzi* cepa CL Brener, se diseñaron cebadores y se amplificaron los genes por PCR utilizando como templado ADN genómico de *T. cruzi* cepa Ninoa. La figura 11 muestra la electroforesis en gel de agarosa de que cada amplificado, en donde el tamaño de los genes concuerda con el tamaño esperado con base en la secuencia de los genes de la cepa de *T. cruzi* CL Brener.

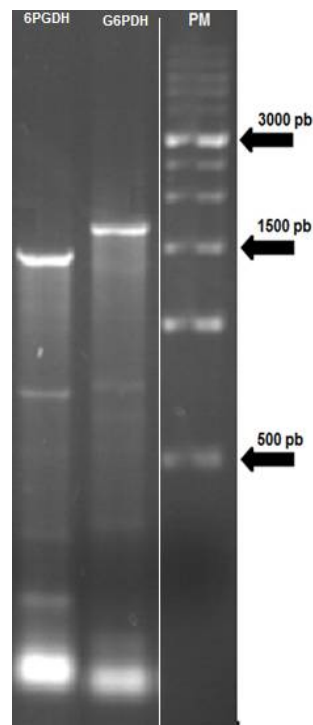


Figura 11. Electroforesis de los productos de la reacción de PCR. Foto de un gel de agarosa al 0.8% donde se aprecian las bandas correspondientes a los genes de la G6PDH (1668 pb) y 6PGDH (1434 pb). Se compararon con un marcador de peso molecular de ADN (PM).

5.2. Clonación de los fragmentos y transformación en bacterias

A partir del gel se cortaron y purificaron los fragmentos de ADN correspondientes a cada gen y se ligaron al vector de clonación pJet 1.2/blunt. Con la ligación se transformaron células *E. coli* top 10, para obtener de esta manera suficientes copias de cada plásmido. Se seleccionaron las clonas que contuvieran el plásmido, de la manera descrita en 4.3. y se identificaron aquellas clonas que contenían al plásmido con el inserto, se realizaron digestiones con las enzimas que liberan los inserto, *NdeI* y *HindIII* para la G6PDH y *NheI* y *HindIII* para la 6PGDH. Una vez identificadas las clonas con el inserto, seleccionamos una y confirmamos con el análisis de restricción que se trata del inserto. En la figura 12 se muestra el patrón de restricción de la clona seleccionada para cada enzima:

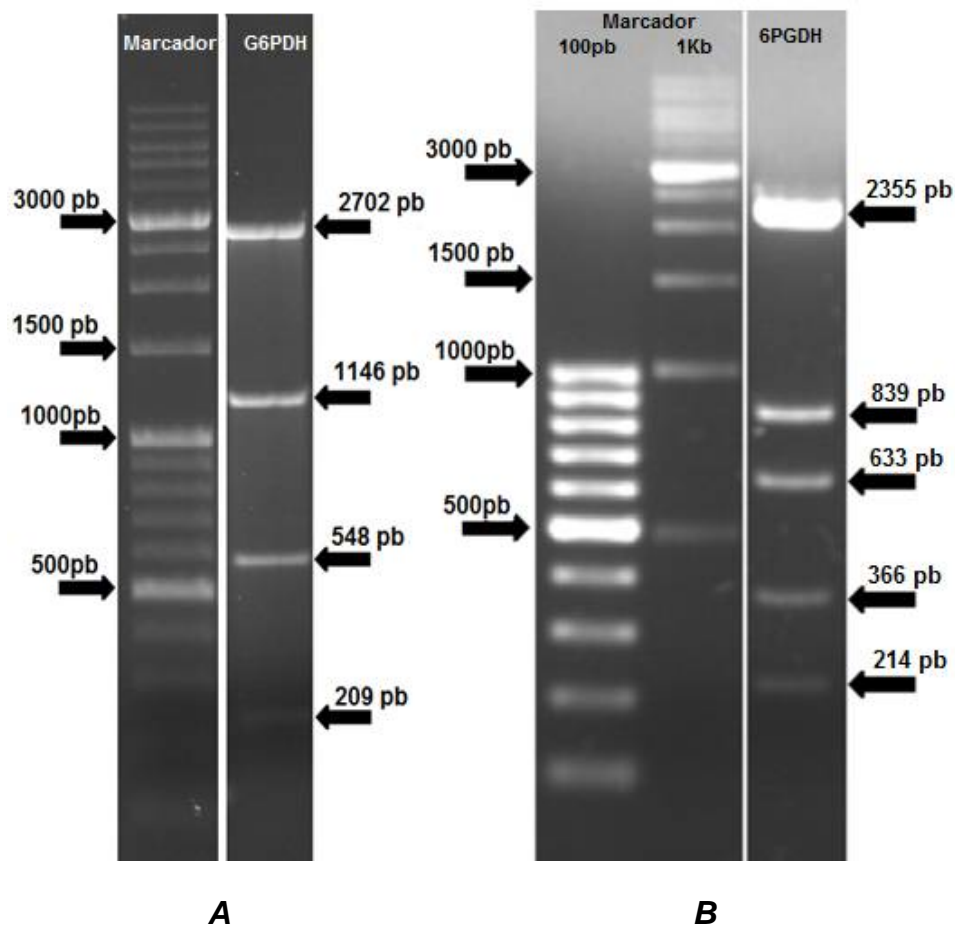


Figura 12. Restricción del plásmido. Gel de agarosa 0.8% en el que se observan las bandas correspondientes a los fragmentos esperados, de acuerdo al análisis de restricción con las enzimas de restricción utilizadas. **A:** para la G6PDH se utilizaron las enzimas *AvaI* y *HindIII*. **B:** para la 6PGDH se utilizaron *PstI* y *HindIII*.

5.3. Análisis de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos

Posteriormente la clona en la que confirmamos el inserto para cada enzima se secuenció en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las secuencias obtenidas se tradujeron a secuencias de aminoácidos, y se realizó una comparación por alineamiento con las secuencias reportadas para las enzimas de *T. cruzi* CL Brener y en el caso de la G6PDH con las tres secuencias reportadas.

La secuencia de aminoácidos de la G6PDH tuvo un 99.0% de identidad y 99.4% de similitud para la G6PDH 1, mientras que la 6PGDH 99.8% de identidad y 100% de similitud con respecto a los genes de la cepa CL Brener reportados en el banco del genoma de *T. cruzi* (Figuras 13 y 14).

5.4. Secuencia de la G6PDH

G6PDH1	1	SPELR S RALTIIVVLGASGDLAKKKTFFALFQLYCNGMLPRDVNILGYARSTMEDVEKWKK
G6PDH2	1	SPELR S RALTIIVVLGASGDLAKKKTFFALFQLYCNGMLPRDVNILGYARSTMEDVEKWKK
G6PDH.	1	SPELR S RALTIIVVLGASGDLAKKKTFFALFQLYCNGMLPRDVNILGYARSTMEDVEKWKK
G6PDH3	1	SPELR S RALTIIVVLGASGDLAKKKTFFALFQLYCNGMLPRDVNILGYARSTMEDVEKWKK
G6PDH1	61	DTLAGFFTRLDERGCHVGNFLRRISYMTGSYDRDEDFARLNERILRMEEAFQGPEKGGN
G6PDH2	61	DTLAGFFTRLDERGCHVGNFLRRISYMTGSYDRDEDFARLNERILRMEEAFQGPEKGGN
G6PDH.	61	DTLAGFFTRLDERGCHVGNFLRRISYMTGSYDRDEDFARLNERILRMEEAFQGPEKGGN
G6PDH3	61	DTLAGFFTRLDERGCHVGNFLRRISYMTGSYDRDEDFARLNERIL S RMEEAFQGPEKGGN
G6PDH1	120	RLFYALPPSVFVGVCRGLSKGAMQKPELGWRLIVEKPFGRDTETSEQLSNQLKPLFN
G6PDH2	120	RLFYALPPSVFVGVCRGLSKGAMQKPELGWRLIVEKPFGRDTETSEQLSNQLKPLFN
G6PDH.	120	RLFYALPPSVFVGVCRGLSKGAMQKPELGWRLIVEKPFGRDTETSE S QLSN-----
G6PDH3	120	RLFYALPPSVFVGVCRGLSKGAMQKPELGWRLIVEKPFGRDTETSEQLSNQLKPLFN

```

G6PDH1  179  ERQVFRIDHYLGKEMVQNIIVTRFANRVFSALWNSNSIACVQITFKKEKIGTAGRGGYFD
G6PDH2  179  ERQVFRIDHYLGKEMVQNIIVTRFANRVFSALWNSNSIACVQITFKKEKIGTAGRGGYFD
G6PDH.  172  -----
G6PDH3  179  ERQVFRIDHYLGKEMVQNIIVTRFANRVFSALWNSNSIACVQITFKKEKIGTAGRGGYFD

G6PDH1  238  SIGIIRDVIQNHLTQILSLLTMEKPRSLSAEDIRDEKVQVLRQVVPANPAEVLGQYTA
G6PDH2  238  SIGIIRDVIQNHLTQILSLLTMEKPRSLSAEDIRDEKVQVLRQVVPANPAEVLGQYTA
G6PDH.  172  -----QILSLLTMEKPRSLSAEDIRDEKVQVLRQVVPANPAEVLGQYTA
G6PDH3  238  SIGIIRDVIQNHLTQILSLLTMEKPRSLSAEDIRDEKVQVLRQVVPANPAEVLGQYTA

G6PDH1  297  SADGSTPGYLDDPSVPGKSHCPTFAVLRRLHVNNDRWHGVPFIIIRAGKALEERLLDIRIQ
G6PDH2  297  SADGSTPGYLDDPSVPGKSHCPTFAVLRRLHVNNDRWHGVPFIIIRAGKALEERLLDIRIQ
G6PDH.  217  SADGSTPGYLDDPSVPGKSHCPTFAVLRRLHVNNDRWHGVPFIIIRAGKALEERLLDIRIQ
G6PDH3  297  SADGSTPGYLDDPSVPGKSRCPFAVLRRLHVNNDRWHGVPFIIIRAGKALEERLLDIRIQ

G6PDH1  356  FKDEIRPFGESTQRNELVIRAQPSEAMYLKLTAKTPGLLNDTHQTELDLTYERRYDVTL
G6PDH2  356  FKDEIRPFGESTQRNELVIRAQPSEAMYLKLTAKTPGLLNDTHQTELDLTYERRYDVTL
G6PDH.  276  FKDEIRPFGESTQRNELVIRAQPSEAMYLKLTAKTPGLLNDTHQTELDLTYERRYDVTL
G6PDH3  356  FKDEIRPFGESTQRNELVIRAQPSEAMYLKLTAKTPGLLNDTHQTELDLTYERRYDVTL

G6PDH1  415  PDAYESLIHEALLGNSTNFVRVDELDAAWRIYTPLLHAIDRGEVKVLPYAAGSCGPEEA
G6PDH2  415  PDAYESLIHEALLGNSTNFVRVDELDAAWRIYTPLLHAIDRGEVKVLPYAAGSCGPEEA
G6PDH.  335  PDAYESLIHEALLGNSTNFVRVDELDAAWRIYTPLLHAIDRGEVKVLPYAAGSCGPEEA
G6PDH3  415  PDAYESLIHEALLGNSTNFVRVDELDAAWRIYTPLLHAIDRGEVKVLPYAAGSCGPEEA

G6PDH1  474  QEFIRSSGYKTTNGNAYKCSNA
G6PDH2  474  QEFIRSSGYKTTNGNAYKCSNA
G6PDH.  394  QEFIRSSGYKTTNGNAYKCSNA
G6PDH3  474  QEFIRSSGYKTTNGNAYKCSNA

```

Figura 13. Alineamientos de secuencias de CL Brener y Ninoa para la G6PDH. La G6PDH se trata de la secuencia obtenida para la cepa ninoa, mientras que la G6PDH1, G6PDH2 y la G6PDH3 son las tres secuencias reportadas en la cepa CL Brener. La secuencia de aminoácidos con la que se tuvo un mayor porcentaje de identidad (99.0%) y similitud (99.4%), fue la G6PDH 1 de la cepa CL Brenner; las letras con fondo negro representan los cambios en la secuencia de aminoácidos.

5.5. Secuencia de la 6PGDH

```
Ninoa      1  FIKEHASAPFAANLKAYETMKSFIMAIAKKPRKIFILVQAGAATDATIEQLKGVLEKDDII
CLBrener   1  FIKEHASAPFAANLKAYETMKSFIMAIAKKPRKIFILVQAGAATDATIEQLKGVLEKDDII

Ninoa      61  VDTGNAHFQDQTRRAEQLEAAGLRFGLMGISGGEEGARKGPAFFPGGTLVWKEIQPVV
CLBrener   61  VDTGNAHFQDQTRRAEQLEAAGLRFGLMGISGGEEGARKGPAFFPGGTLVWKEIQPVV

Ninoa      120 E  AAAAKADDGRPCVTMNGRGGAGSCVKMYHNAGEYAVLQVWGEAFDVLAMGLSNDEVA
CLBrener   120 E  AAAAKADDGRPCVTMNGRGGAGSCVKMYHNAGEYAVLQVWGEAFDVLAMGLSNDEVA

Ninoa      179 AV  FEDWKAKGFLTSYMLDISIVAARAKVADGSHLSEHVKDCIGSKGTGLWSAQEALVVG
CLBrener   179 AV  FEDWKAKGFLTSYMLDISIVAARAKVADGSHLSEHVKDCIGSKGTGLWSAQEALVVG

Ninoa      238 VPA  PSLNMAVLSRQMTMYKSERELNAKTLPFVLKVPGYAIKDKSSANAPEIRQLYHAVSI
CLBrener   238 VPA  PSLNMAVLSRQMTMYKSERELNAKTLPFVLKVPGYAIKDKSSANAPEIRQLYHAVSI

Ninoa      297 AIIA  CYAQMFQCLRALDKVYDFGLDLPATIATFRAGCILKGYLLQPMTEAFKLVKLSN
CLBrener   297 AIIA  CYAQMFQCLRALDKVYDFGLDLPATIATFRAGCILKGYLLQPMTEAFKLVKLSN

Ninoa      356 LLCAF
CLBrener   356 LLCAF
```

Figura 14. Alineamientos de secuencias de 6PGDH cepas CL Brener y Ninoa. La secuencia de la cepa Ninoa tuvo un 99.8% de identidad con la reportada para CL Brener, y 100% de similitud. El único cambio fue una prolina por una alanina, sin embargo ambos aminoácidos son neutros no polares; las letras con fondo negro representan los cambios en la secuencia de aminoácidos.

5.6. Sobreexpresión de las proteínas

Los genes se ligaron al vector de sobreexpresión pET28, con el que se transformaron células de *E. coli* cepa BL21(DE3). Nuevamente se seleccionaron las clonas que contuvieran el plásmido con el inserto (por análisis de restricción liberando los insertos). Posteriormente se realizó el cultivo de 5 mL y se indujo la expresión de la proteína adicionando IPTG (0.4 mM) e incubando a 25°C toda la

noche. Las células se rompieron por sonicación y se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12% para separar las proteínas, comparándolas contra el patrón proteico de células control (BL21) no transformadas con el plásmido y contra un marcador de peso molecular (figura 15).

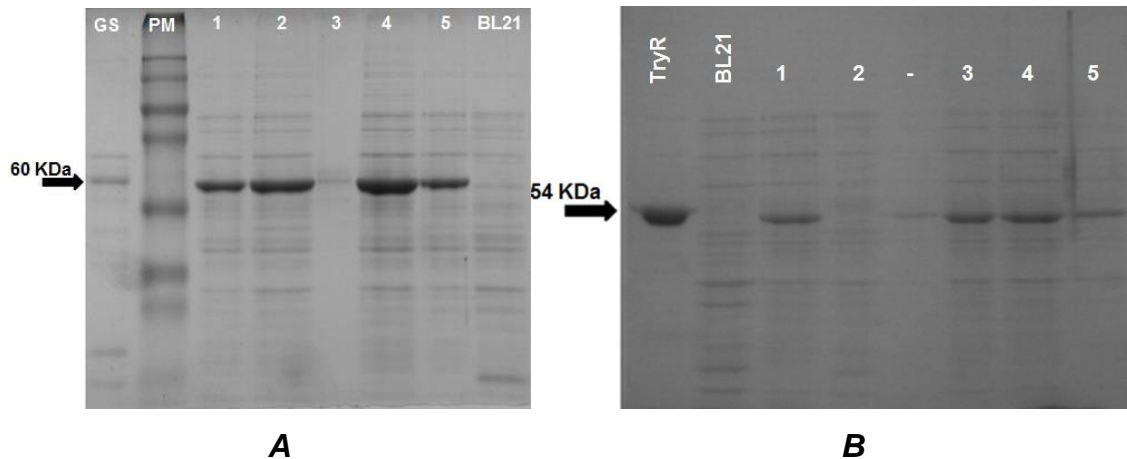


Figura 15. Sobreexpresión de las proteínas en células de *E.coli* BL21 (DE3). SDS-PAGE de alícuotas de 5 diferentes cultivos que sobreexpresan las proteínas de interés (**A:** G6PDH; **B:** 6PGDH), las cuales se señalan con una flecha que indica su tamaño, las células BL21 indica a las células control no transformadas, se utilizó un marcador de peso molecular PM y a la glutatión sintetasa de un peso de 60 KDa cercano al de la G6PDH (63KDa) y la TryR con un peso igual al de la 6PGDH de 54KDa.

A partir de estos geles seleccionamos la clona que mejor sobreexpresara cada proteína, con ésta se determinó posteriormente si la proteína se expresaba en forma soluble o insoluble, creciendo un cultivo de 50 mL en medio líquido LB con kanamicina, se indujo la sobreexpresión, se cosecharon las células y se rompieron por sonicación; el lisado celular se centrifugó para separar la fracción soluble de la insoluble (precipitado). La figura 16 muestra los geles de poliacrilamida-SDS en se comparan las fracciones soluble (sobrenadante) e insoluble (precipitado) de células control no transformadas y células sobreexpresantes. En la figura 16-A se

muestra que la sobreexpresión de la G6PDH la cual queda principalmente en la fracción insoluble posiblemente por la formación de cuerpos de inclusión, sin embargo se logró purificar de la fracción soluble. En la figura 16-B se muestra la sobreexpresión de la 6PGDH la cual se expresa preferentemente en la parte soluble.

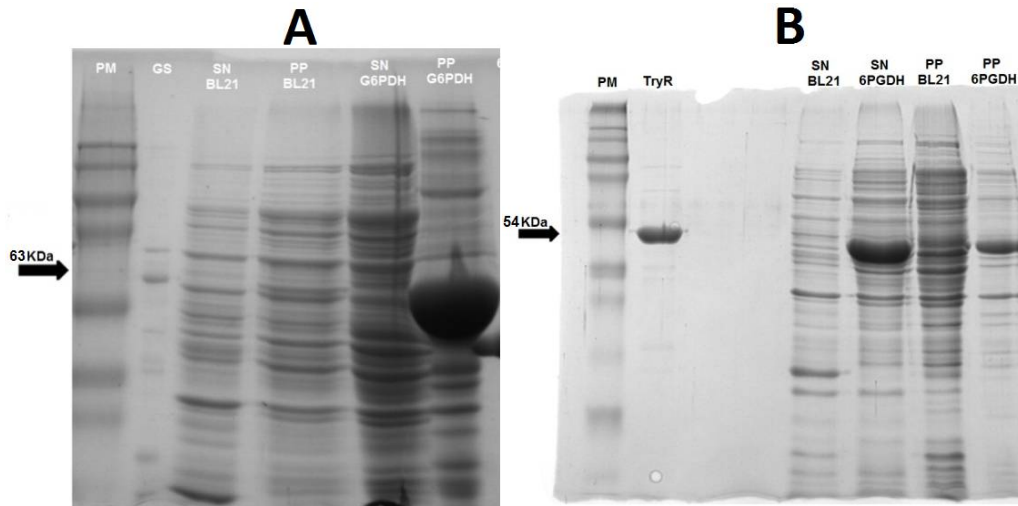


Figura 16. Sobreexpresión de las proteínas en forma soluble. SDS-PAGE de las fracciones solubles (sobrenadante) e insolubles (precipitado) de los extractos celulares. Las flechas indican las bandas que corresponden a las proteínas de interés y su peso.

A: sobreexpresión de la G6PDH, **B:** sobreexpresión de la 6PGDH. BL21 muestra las fracciones de células no transformadas. (PM) marcador de peso molecular, (SN) sobrenadante, (PP) precipitado, (Ft) eluido que no se unió a la columna, (L1, L2, L3, L4) número de lavado, TryR recombinante (utilizada como marcador de 54 KDa).

5.7 Purificación de las proteínas.

La purificación de las proteínas se realizó utilizando la fracción soluble de las células que expresaron las proteínas, la cual se incubó con una resina acoplada a cobalto, y después de una serie de lavados, la proteína se eluyó con imidazol. La

figura 17 muestra el gel de poliacrilamida-SDS con los diferentes pasos del proceso de purificación, se puede observar que las bandas que no corresponden a la proteína fueron desapareciendo conforme se realizaron los lavados, para finalmente obtener la proteína pura. El análisis densitométrico del gel indicó que las proteínas alcanzaron en promedio un 95% de pureza al final del proceso de purificación.

Para calcular el rendimiento de la purificación, se cuantificó la proteína por el método de Lowry de acuerdo a la metodología descrita en el punto 4.8., obteniendo 1 mg de G6PDH por cada 500 mL de cultivo celular. A pesar de que la mayoría se pierde en la parte insoluble (probablemente porque la enzima es tóxica para la bacteria), la fracción de enzima que queda soluble es suficiente para determinar los parámetros cinéticos. Por otro lado la 6PGDH tuvo un rendimiento de 12 mg por cada 250 mL de cultivo celular.

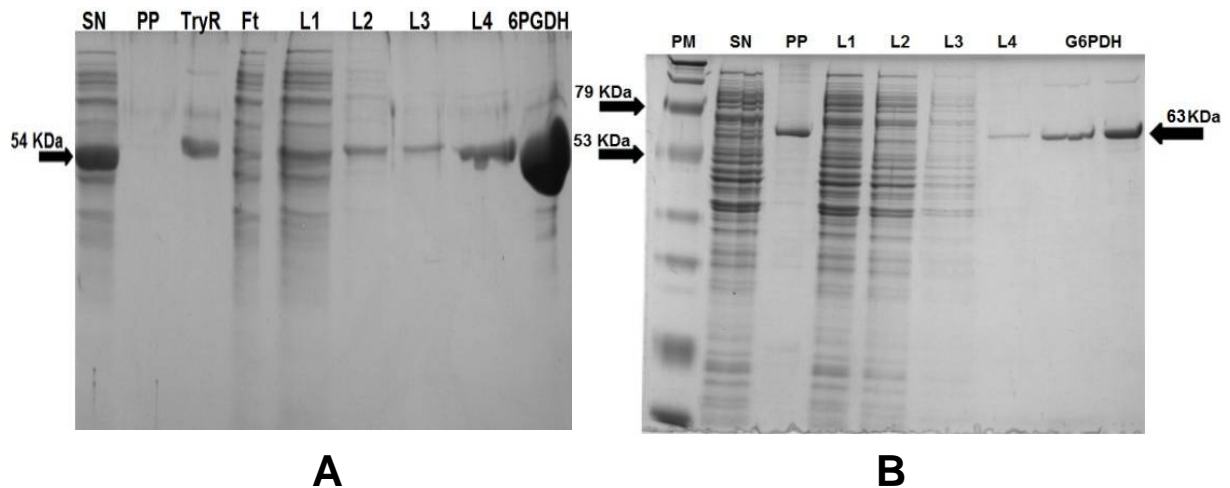


Figura 17. Perfil de proteínas en su purificación por cromatografía de afinidad a metales. **A:** purificación de 6PGDH, **B:** purificación de G6PDH. (PM) marcador de peso molecular, (SN) sobrenadante, (PP) precipitado, (Ft) eluido que no se unió a la columna, (L1, L2, L3, L4) número de lavado, TryR recombinante (utilizada como marcador de 54 KDa). En ambos casos, la pureza es mayor al 95%.

5.8. Caracterización cinética

Una vez que se obtuvieron las enzimas purificadas, se determinaron los parámetros cinéticos K_m y V_m , realizando un ensayo cinético en condiciones fisiológicas de pH (7.4) y temperatura (37°C), en donde se mantiene saturante la concentración de uno de los sustratos mientras se varia la concentración del otro sustrato. Para ello se monitoreó espectrofotométricamente la formación de NADPH a 340 nm como se describió en la metodología.

5.9. Propiedades cinéticas de la G6PDH

Primeramente se realizaron los ensayos de linealidad variando la cantidad de proteína, y midiendo su actividad para determinar la cantidad de proteína con la que se realizarían el resto de los ensayos.

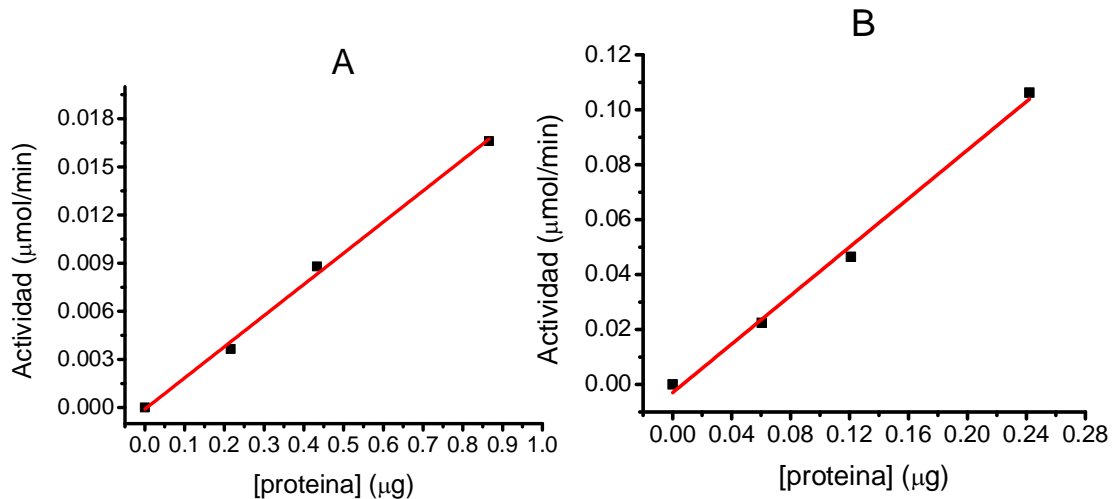


Figura 18. Dependencia de la actividad a distintas concentraciones de enzima. (A) Linealidad de la G6PDH; (B) Linealidad de la 6PGDH. Ambos medidos a 37 °C en amortiguador HEPES 40mM/1mM EDTA pH 7.4, 140mM KCl con $[NADP^+]$ 220µM, $[G6P]$ 2500µM y $[6PG]$ 220µM, $[NADP^+]$ 160µM respectivamente.

Anteriormente Igoillo y Cazzulo (2006) determinaron los parámetros cinéticos de la enzima G6PDH, para lo cual utilizaron Mg^{2+} dentro de la mezcla de reacción a una concentración de 5mM posiblemente por la activación que se ha visto en la enzima (Tang *et al.* 1994); en este trabajo se evaluó la posible activación de la enzima por el Mg^{2+} de acuerdo a la metodología descrita en el punto 4.9., sin embargo no se observó efecto de activación por Mg^{2+} hacia la G6PDH (figura 19).

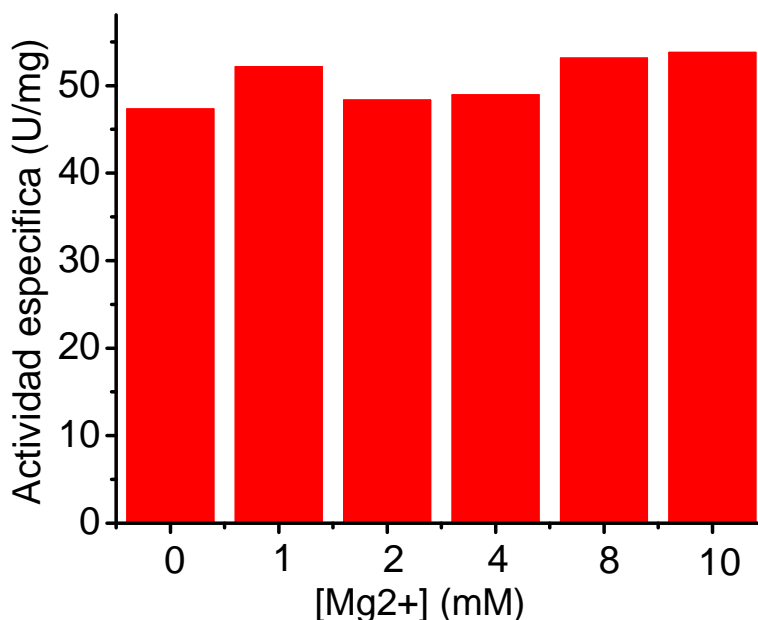


Figura 19. Evaluación del efecto de activación del Mg^{2+} en la G6PDH. Condiciones amortiguador HEPES 40mM/1mM EDTA pH7.4, 140mM KCl, $NADP^+$ 220 μ M, G6P 1000 μ M, 37°C, 0.4 μ g de G6PDH.

Una vez que observamos que no había efecto activador del magnesio seguimos con las curvas de saturación.

La figura 20 muestra las curvas de saturación de la G6PDH para sus sustratos G6P y $NADP^+$, en las cuales se puede ver que los datos se ajustan a una hipérbola. La tabla 4 contiene los parámetros cinéticos determinados en este trabajo. La K_m de la G6PDH por $NADP^+$ y G6P es de 34 μ M y 252 μ M (n=2) respectivamente, los cuales son similares a los reportados por Gupta *et al.* (2011)

de 22 μM por NADP^+ y 206 μM G6P. Esta pequeña diferencia probablemente se deba a las condiciones de pH y temperatura a las cuales se realizó la caracterización de cada una; en este trabajo lo realizamos a 37°C y pH 7.4, mientras que Gupta *et al.* (2011) lo realizaron a 30 °C y pH 7.5, por lo tanto podemos considerar que los cambios no son importantes.

Por otro lado la V_m mostró una gran diferencia entre lo reportado y lo determinado en este trabajo. Al estudiar cuál podría ser la causa de esta diferencia, logramos notar que las diferentes purificaciones realizadas, mostraron distintos niveles de pureza, por lo que este parámetro se ve afectado entre ensayo y ensayo.

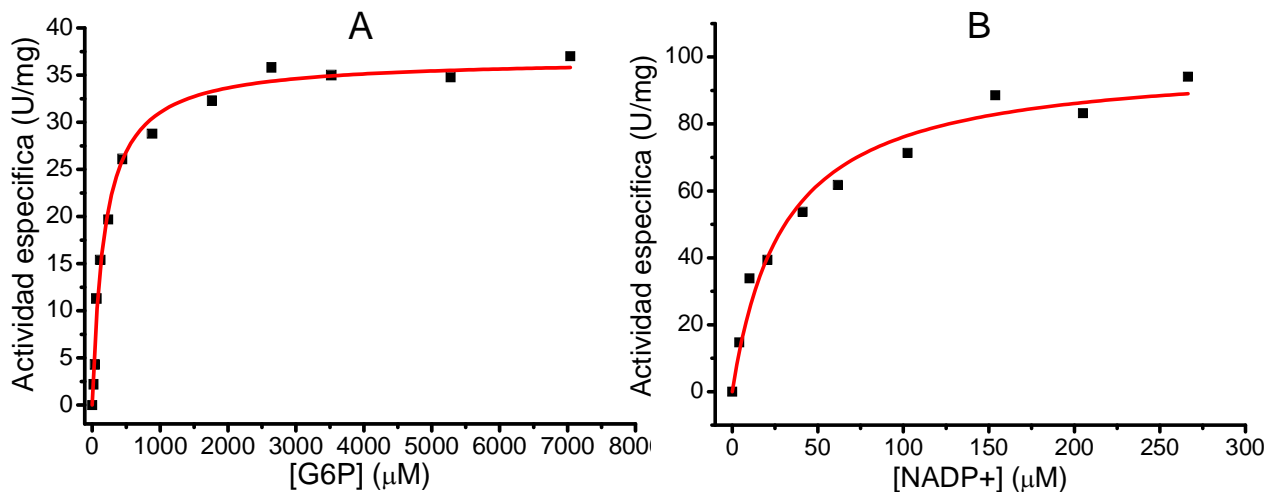


Figura 20. Curvas de saturación de la G6PDH por sus sustratos. A: Curva de saturación de G6PDH con respecto a la concentración de G6P: amortiguador HEPES 40mM/1mM EDTA pH7.4, 140mM KCl, 220 μM NADP^+ , G6P 0-7000 μM , 37°C, 0.26-0.40 μg de G6PDH ; B: Curva de saturación de G6PDH con respecto a la concentración de NADP^+ : Amortiguador HEPES 40mM/1mM EDTA pH7.4 , 140mM KCl, [NADP^+] 0-220 μM , G6P 7000 μM , 37°C, 0.26-0.40 μg de G6PDH.

5.10. Propiedades cinéticas de la 6PGDH

Igoillo y Cazzulo (2004) caracterizaron cinéticamente a la 6PGDH en presencia de Mg^{2+} , por lo que en este trabajo se evaluó su efecto sobre la actividad de 6PGDH (figura 21).

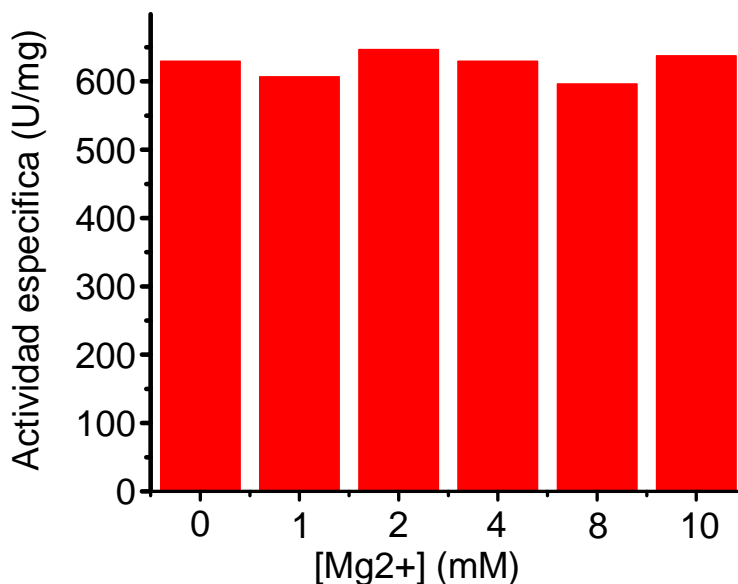


Figura 21. Evaluación del efecto de activación del Mg^{2+} en la 6PGDH. Condiciones de amortiguador HEPES 40mM/1mM EDTA pH7.4, 140mM KCl, $NADP^+$ 160 μ M, G6P 220 μ M, 37°C, 0.5 μ g de G6PDH.

No se observó efecto activador del magnesio. Igoillo y Cazzulo (2004) demostraron que la 6PGDH es inestable a la dilución, debido a la rápida disociación del dímero (forma activa de la enzima). En dicho trabajo, se logró estabilizar a la enzima por mutagénesis sitio dirigida, tomando como base la estructura de la 6PGDH de *T. brucei*, la cual contiene 5 puentes salinos que estabilizan el dímero, por lo que es más estable que la 6PGDH de *T. cruzi* [Igoillo y Cazzulo, 2004].

En este trabajo se buscaron distintos métodos para estabilizar la forma silvestre de la enzima. Una de las maneras incluyó el uso de DMSO (10 – 30% en la reacción);

esto estabilizó la enzima por unos pocos segundos, sin embargo no se logró encontrar la concentración de DMSO adecuada. Finalmente se concluyó que debido a que el DMSO favorece un ambiente no polar, se evita la interacción iónica entre las subunidades, y por lo tanto el efecto observado no fue una estabilización. En este sentido, se evaluó el efecto del KCl en la reacción, el cual aumenta la fuerza iónica en el medio, permitiendo mantener unidos a los tres puentes salinos que existen entre los dos monómeros que conforman a la enzima silvestre. Se evaluó la concentración de 140 mM por ser la concentración fisiológica intracelular de mamíferos (Moreno-Sánchez *et al.* 2012). Con esta concentración se vio un efecto de estabilización de la enzima. En la figura 22 se muestra el efecto de estabilización de la enzima, al agregar 140 mM de KCl en la reacción. En azul podemos observar que en ausencia de KCl, la actividad específica aumenta con respecto a la cantidad de proteína, por la inestabilidad a la dilución; de hecho, la actividad se pierde por completo a una concentración <0.5 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, las barras en rojo muestran que la actividad específica de la enzima se mantiene, incluso a concentraciones por debajo de 0.5 $\mu\text{g/mL}$.

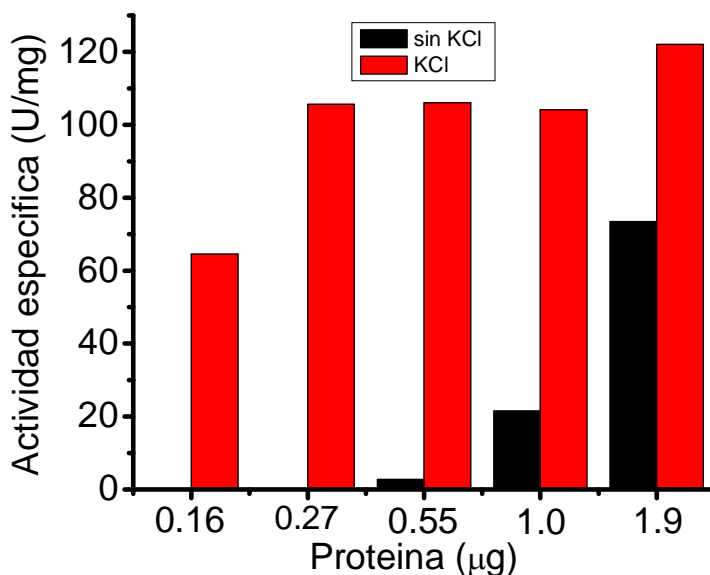


Figura 22. Estabilización de 6PGDH con KCl. Condiciones de amortiguador HEPES 40mM/1mM EDTA pH7.4, NADP^+ 160 μM , G6P 220 μM , 37°C, 0.4 μg de G6PDH + 140mM de KCl para las barras en rojo.

Después de haber encontrado las condiciones para estabilizar a la enzima, se continuó con la determinación de los parámetros cinéticos. Los valores de K_m de la 6PGDH se reportan en la tabla 4. Es importante notar que si bien los valores de los parámetros cinéticos obtenidos difieren de los reportados anteriormente, puede deberse principalmente a que realizaron una manipulación genética para estabilizarla. Entre estas diferencias está el hecho de que en este trabajo la enzima tiene menor afinidad por ambos sustratos ($K_{m_{NADP^+}} = 5.6$ vs. 21 ± 3.6 , $K_{m_{6PG}} = 22.2$ vs. 51 ± 14); por otro lado, la V_m obtenida en este trabajo (620 ± 275 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, tabla 4.) es 10 veces mayor que la reportada (62.9 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$), por lo que el avance en cuanto a la caracterización de esta enzima fue significativamente importante, ya que se logró estabilizar sin necesidad de modificarla genéticamente, y por lo tanto evitamos comprometer así sus características cinéticas.

Se realizaron curvas de saturación de la 6PGDH para sus sustratos $NADP^+$ y 6PG (Figura 23).

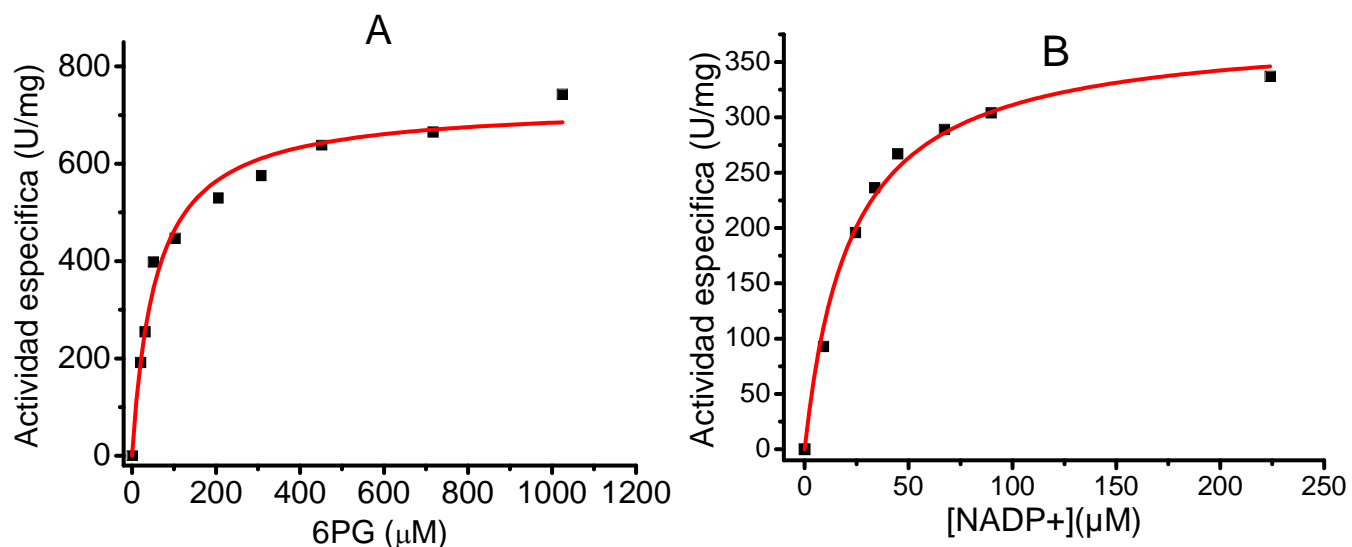


Figura 23. Curvas de saturación de la 6PGDH por sus sustratos. (A) Curva de saturación de 6PGDH con respecto a la concentración de 6PG: amortiguador HEPES 40mM/1mM EDTA pH7.4, $[NADP^+]$ 220 μM , $[6PG]$ 0-220 μM 37°C, 0.15-0.77 μg de 6PGDH ; (B) Curva de saturación de G6PDH con respecto a la

concentración de NADP⁺: amortiguador HEPES 40mM/1mM EDTA pH7.4, [NADP⁺] 0-220μM, [6PG] 220μM 37°C, 0.15-0.77 μg de 6PGDH.

Enzima	Recombinante				Extractos		
	Km (μM)		Vm (μmol/min*mg)	k _{cat} (s ⁻¹)	Vm/Km (L/min*mg)	Vm (nmol/min*mg)	Vm/Km (L/min*mg)
	Sustrato específico	Coenzima					
G6PDH	252 (2)	34 (2)	54 (2)	128	1.6	39 ± 15 (4)	1.1
	206 ^a	22 ^a	99 ± 9.1 ^a	190 ± 64 ^a	4.5 ^a	69 ± 2 ^c	3.13 ^c
6PGDH	51 ± 14 (4)	21 ± 3.6 (4)	620 ± 275 (4)	1076 ± 476	29.5	43 ± 15 (3)	2.0
	22.2 ^b	5.6 ^b	62.9 ^b	98 ^b	11.23 ^b	289 ± 2 ^c	5.6 ^c

Tabla 4. Parámetros cinéticos de las enzimas. Entre paréntesis se muestra el número de experimentos realizados con distintas preparaciones de proteína y el superíndice indica la referencia, ^aGupta y Cordeiro, 2011, ^bIgoillo y Cazzulo, 2004, ^cMaugeri y Cazzulo, 2004.

5.11. Propiedades cinéticas de G6PDH y 6PGDH en extractos celulares

Nuevamente se realizaron los ensayos de linealidad variando la cantidad de proteína y midiendo su actividad para determinar la cantidad de proteína con la que se realizarían los ensayos con los extractos celulares.

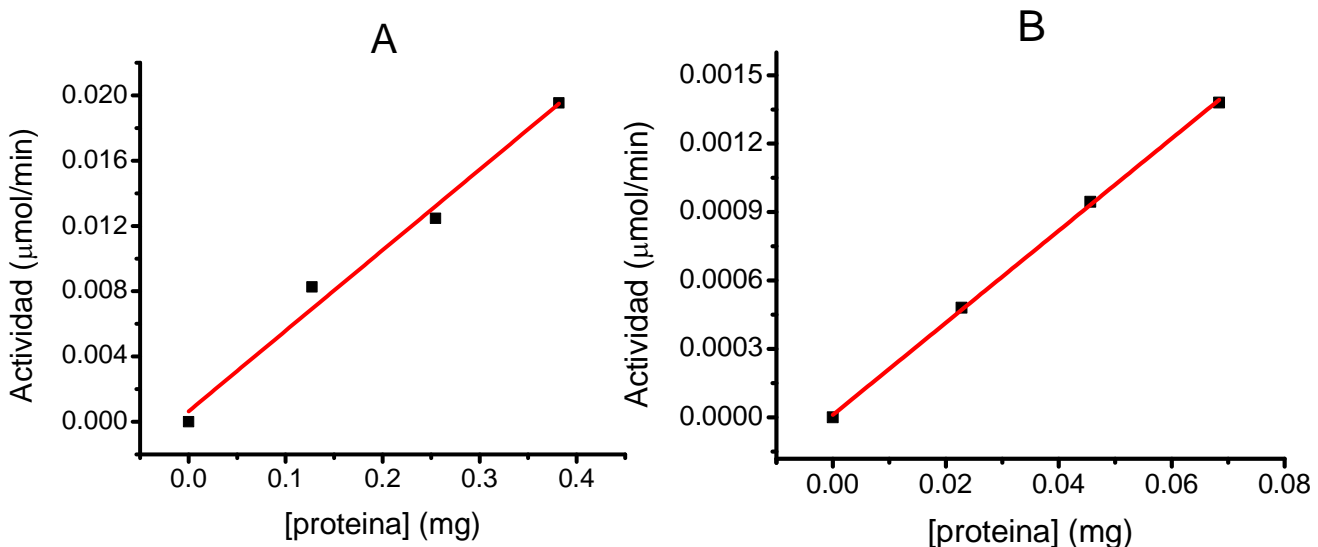


Figura 24. Dependencia de la actividad con respecto a la cantidad de proteína. (A) Linealidad de la G6PDH en extractos; (B) Linealidad de la 6PGDH en extractos. Datos obtenidos a 37 °C en amortiguador HEPES 40mM/1mM EDTA pH 7.4, 140mM KCl con [NADP⁺] 220μM, [G6P] 2500μM (para A) o [NADP⁺] 160μM, [6PG] 220μM, (para B).

Newman *et al.* (1995) reportaron que la forma larga de la G6PDH presenta inactivación por agentes reductores como el β-ME, el GSH, y el DTT, probablemente debido a la presencia de 2 residuos de Cys en la extensión N-terminal, los cuales están ausentes en la forma corta de la enzima. Este representa un mecanismo de regulación de la actividad de las formas de G6PDH presentes en cloroplastos, plantas y cianobacterias. Ambos residuos de Cys deben estar en forma oxidada para mantener su actividad enzimática. Por ejemplo, se ha visto que la G6PDH en presencia de 4 y 62.5 mM de DTT al incubarse 10 min pierde el 50% y el 85% de actividad respectivamente. Después de 20 min de incubación, la actividad se pierde por completo [Igoillo y Cazzulo, 2004]. En este trabajo el extracto se preparó adicionando 1 mM de DTT (concentración final) en el amortiguador de lisis, por lo que se cuidó que las determinaciones de la actividad en extractos se realizaran inmediatamente después de su obtención para no subestimar su actividad; sin embargo, al parecer aparentemente el tiempo transcurrido entre la preparación del extracto y la determinación de la actividad, fue suficiente para que el valor de *V_m* obtenido en este trabajo fuera 44% menor al reportado. Este trabajo deja la ventana abierta para determinar posteriormente si el DTT es un inhibidor o un inactivador de la enzima, modificando los tiempos de incubación y las concentraciones de DTT.

Por otro lado, Igoillo y Cazzulo (2004) reportaron que la 6PGDH recombinante perdía su actividad hasta en un 50% después de 5 min en amortiguador 50 mM de trietanolamina (pH 7.5) con 5mM de MgCl₂, 0.5mM NADP⁺ y 1mM de 6PG. Esto se evitó agregando 4mM de DTT a la enzima recombinante concentrada a los extractos, que junto con una concentración 100 mM de imidazol, evitaban la

pérdida de actividad. Esta protección por el DTT puede estar relacionada con mantener reducidos uno o más grupos SH importantes, ya que la débil interacción entre los monómeros de la enzima puede exponer algunos residuos de Cys, y por lo tanto, que sean más sensibles a la oxidación, tal como se ha reportado en *Candida utilis*.

Para este trabajo el extracto se preparó con amortiguador de lisis que contenía 1 mM de DTT (concentración final), y la reacción se llevó a cabo con 140mM de KCl (en el ensayo). Además se cuidó que las determinaciones de la actividad en extractos se realizaran inmediatamente después de la obtención del extracto para no subestimar su actividad. Se logró observar que la actividad permanecía constante aún después de 4 h de preparar el extracto. Si bien el tiempo transcurrido entre la preparación del extracto y la determinación de la actividad siempre fue menor a 1 hora, el valor de V_m obtenido en este trabajo es 6 veces menor al reportado (43 ± 15 vs. 289 ± 2 , Tabla 4), por lo que probablemente existe un efecto de inactivación que no logramos determinar.

En este caso también se queda una ventana abierta para que posteriormente se determine la concentración óptima de DTT e imidazol para evitar la pérdida de la actividad.

6. Discusión general:

La fase oxidativa de la PPP tiene como principal producto poder reductor en forma de NADPH, éste es producido por la enzimas G6PDH y 6PGDH. El NADPH es esencial para *T. cruzi* debido a que su principal sistema antioxidante es dependiente de éste. Hasta el momento se había sugerido que la enzima menos eficiente es la G6PDH y además por tratarse de la primera enzima de la vía, es la que mantiene el control en la producción del NADPH. Sin embargo no se habían estudiado ambas enzimas en condiciones cercanas a las fisiológicas. Es importante recordar que existe un paso entre ambas enzimas (6-fosfogluconolactonasa), no obstante esta enzimas es muy rápida (Maugeri y

Cazzulo, 2004, $V_m=1020$ nmol/min*mg), por lo que este paso no es limitante en la vía.

La eficiencia catalítica de la 6PGDH en la fracción citosólica es mayor a la de la G6PDH; sin embargo, debido a que la V_{m6PGDH} del extracto podría estar subestimada (por la presencia de DTT durante la preparación del extracto), no es posible determinar con precisión cuantas veces es mayor su eficiencia, únicamente podemos indicar que la diferencia es más del doble.

Los datos obtenidos en este trabajo nos dan una idea más cercana del comportamiento de la vía de las pentosas fosfato en *T. cruzi*, la cual se encarga de la producción de poder reductor necesario para proteger las células en contra del estrés oxidante. Esta vía se autorregula a través del cociente NADPH/NADP⁺ el cual se ve disminuido por el estrés oxidante causado por las ROS, esto activa e induce la expresión al menos a una enzima de esta vía, la G6PDH. No obstante es importante mencionar que es complicado proponer a esta vía como un buen blanco terapéutico, ya que también se encuentra presente en el hospedero, mientras que existen enzimas dentro de la vía antioxidante que no se comparten con el hospedero por lo que aquellas serían mejores blancos terapéuticos desde este punto de vista.

7. Conclusiones:

Obtuvimos los parámetros cinéticos V_m y K_m bajo condiciones fisiológicas de pH y temperatura de la G6PDH recombinante y determinamos su valor de V_m en los extractos, igualmente obtuvimos los parámetros cinéticos V_m y K_m bajo condiciones fisiológicas de pH y temperatura de la 6PGDH recombinante que logramos estabilizar y obtuvimos un valor mínimo de V_m en extractos. La 6PGDH es la enzima más eficiente catalíticamente. En el caso de las proteínas recombinantes alrededor de 18 veces, mientras que en el extracto únicamente 2 veces más eficiente en condiciones pseudofisiológicas por lo que la enzima que

limita la producción de NADPH es la G6PDH. Estos datos servirán para extender el modelo cinético de la vía antioxidante dependiente de T(SH)₂ de *T. cruzi* el cual es la principal línea de investigación que se desarrolla en el laboratorio.

8. Referencias:

1. Aldunate, J., Morello, A., 1993. Free radicals in the mode of action of parasitic drugs. In: Aruoma, O.I. (Ed.), Free Radicals in Tropical Diseases. Harwood Academic Publishers, Switzerland, pp. 137–165.
2. Ariyanayagam, M.R., Fairlamb, A.H., 2001. Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115, 189–198.
3. Atamna H., Pascarmona G. y Guinsburg H. 1994. Hexosemonophosphate shunt activity in intact *Plasmodiumfalciparum* – infected erythrocytes and in free parasites. *Mol.Biochem.Parasitol.* 67: 78–89.
4. Barderi P., Campetella O., Frasch A.C., Santomé J.A., Hellman U., Pettersson U. y Cazzulo J. J. 1998. The NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: sequence, genomic organization and expression. *Biochem J* 330: 951–958.
5. Cabarin-Lima A. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update, *Acta Tropica* 127 (2013), 126– 135.
6. C. Cs'েকে, A. Balogh, and G. L. Farkas, "Redox modulation of glucose-6-P dehydrogenase in *Anacystisnidulans* and its 'uncoupling' by phage infection," *FEBS Letters*, vol. 126, no.1, pp. 85–88, 1981.
7. Cannata J.J.B., Frasch A.C.C., Cataldi D.E., Flombaum M.A., Segura E. L. Cazzulo J.J., 1979. Two forms of malic enzyme with different regulatory properties in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 184: 409–419.
8. Cevallos A. M., Hernández R. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). En: Martínez E., Martínez J. C. (editores) *Microbios en línea*. Libro virtual <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>.

9. Cruz-Reyes, A., Pickering-Lopez, J.M., 2006. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years—a review. *Mem. Inst.Oswaldo Cruz* 101, 345–354.
10. Dias, J.C., 2000. Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Cad. Saude Publica* 16 (Suppl. 2), 43–59.
11. Docampo, R., Stoppani, A.O., 1979. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Arch. Biochem. Biophys.* 197, 317–321.
12. jones10–16.
13. Dumonteil, E., 1999. Update on Chagas' disease in Mexico. *Salud Pública Mex.* 41, 322–327.
14. Fairlamb, A.H., Cerami, A., 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 695–729.
15. Fernandes, A.P., Holmgren, A., 2004. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid. Redox Signal.* 6, 63–74.
16. Flisser Steinbruch Ana, *Aprendizaje de la Parasitología basado en problemas, editores de textos mexicanos*, 2006, pp.411-428
17. Gupta, S.; Cordeiro, T.A.; Michels, P.A.M. Glucose-6-phosphate dehydrogenase is the target for the trypanocidal action of human steroids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2011, 176, 112–115.
18. Gutierrez, F.R., Guedes, P.M., Gazzinelli, R.T., Silva, J.S., 2009. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 31, 673–685.
19. Gutteridge, J.M., Halliwell, B., 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 899, 136–147.
20. Hayes, J.D., McLellan, L.I., 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 31, 273–300.

21. Igoillo Esteve M. y Cazzullo J. J. 2004. The 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: the absence of two inter-subunit salt bridges as a reason for enzyme instability. *Mol. Biochem. Parasitol.* 133: 197–207.
22. Igoillo Esteve M. y Cazzullo J. J. 2006. The glucose- 6-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: its role in the defense of the parasite against oxidative stress. *MolBiochemParasitol* 149: 170–181.
23. Igoillo Esteve M., 2005. Clonado, expresión caracterización y localización subcelular de las dos dehidrogenasas de la vía de las pentosas fosfato en *Trypanosoma cruzi* (Glucosa 6-fosfato dehidrogenasa y 6-fosfogluconato dehidrogenasa). Tesis Doctoral, Universidad Nacional de General San Martín, Argentina.
24. Jones, C.M., Lawrence, A., Wardman, P., Burkitt, M.J., 2003a. Kinetics of superoxide scavenging by glutathione: an evaluation of its role in the removal of mitochondrial superoxide. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1337–1339.
25. Jones, S.P., Hoffmeyer, M.R., Sharp, B.R., Ho, Y.S., Lefer, D.J., 2003b. Role of intracellular antioxidant enzymes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol, Heart Circ. Physiol.* 284, H277–H282.
26. Juan S. M., Segura E. L. y Cazzullo J. J. 1978. Purification and some properties of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Int J Biochem* 9: 395–400.
27. Krauth-Siegel, R.L., Meiering, S.K., Schmidt, H., 2003. The parasite-specific trypanothione metabolism of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Biol. Chem.* 384, 539–549.
28. Kuhn, H., Borchert, A., 2002. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 154–172.
29. Maugeri D. y Cazzullo J. J., 2004. The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS MicrobiolLett* 234: 117–123.

30. Maugeri D. y Cazzulo J. J., Burchmore R.J.S., Barrett M.P. y Ogbunude P.O. J. 2003. Pentose phosphate metabolism in *Leishmania mexicana*. Mol. Biochem. Parasitol. 130: 117–125.
31. Maya, J.D., Cassels B. K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira J., Faúndez, M., Galanti, N., Ferreira, A., Morello, A., 2007. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 146 pp. 601-620.
32. Maya, J.D., Repetto, Y., Agosin, M., Ojeda, J.M., Téllez, R., Gaule, C., Morello, A., 1997. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 86, 101–106.
33. Maya, J.D., Rodríguez, A., Pino, L., Pabon, A., Ferreira, J., Pavani, M., Repetto, Y., Morello, A., 2004. Effects of buthioninesulfoximine nifurtimox and benznidazole upon trypanothione and metallothionein proteins in *Trypanosoma cruzi*. Biol. Res. 37, 61–69.
34. Moreno, S.N., Docampo, R., Mason, R.P., León, W., Stoppani, A.O., 1982. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. Arch.Biochem. Biophys. 218, 585–591.
35. Moreno-Sánchez R., Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez J. C., Quezada H., Encalada R, Rodríguez-Enríquez S, Saavedra E. Phosphofructokinase type 1 kinetics, isoform expression, and gene polymorphisms in cancer cells. J Cell Biochem. 2012 May; 113(5):1692-703.
36. Newman J, Karakaya H, Scanlan DJ, Mann NH. A comparison of gene organization in the zwf region of the genomes of the cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7942 and *Anabaena* sp. PCC 7120. FEMS Microbiology Letters 1995; 133:187–93.
37. Nuñez de Castro Ignacio, *Enzimología, editores pirámide*, 2001, pp.102-123

38. Olin-Sandoval V, Moreno-Sánchez R, Saavedra E., 2010, Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites. *Curr Drug Targets*. Dec;11(12):1614-30.
39. Oza, S.L., Tetaud, E., Ariyanayagam, M.R., Warnon, S.S., Fairlamb, A.H., 2002. A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 277, 35853–35861.
40. Parker ER, Sethi A. 2011. Chagas disease: coming to a place near you. *Dermatol Clin.* Jan; 29 (1):53-62.
41. Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F., 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta* 333, 19–39.
42. Phillips C., Dohnalek J., Gover S., Barrett M. P. y Adams M. J. 1998. A 2.8 Å resolution structure of 6-phosphogluconate dehydrogenase from the Protozoan parasite *Trypanosoma brucei*: comparison with the sheep enzyme accounts for differences in activity with coenzyme and substrate analogues. *J Mol Biol* 282: 667–681.
43. Rassi Jr., A., Rassi, A., Marin-Neto, J.A., 2010. Chagas disease. *Lancet* 375, 1388–1402.
44. Rodrigues Coura J., Borges Pereira J., 2010 Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta tropica* (115), 5-13
45. Rodrigues Coura, J., de Castro, S.L., 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 3–24.
46. Tang TK, Yeh CH, Huang CS, Huang MJ. 1994. Expression and biochemical characterization of human glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Escherichia coli*: a system to analyze normal and mutant enzymes. *Blood*. Mar 1; 83(5): 1436-41.
47. Tay-Zavala J., Lara-Aguilera R., Velasco-Castrejón O., Gutiérrez-Quiroz M. *Parasitología médica*. México D.F. Mendez Editores S.A. de C.V. 5ª edición 1995.

48. Turrens, J.F., 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol. Aspects Med.* 25, 211–220.
49. Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161–1208.
50. Voet Donald, *Fundamentos de bioquímica* 2ª edición editorial Médica panamericana, España 2007, pp. 369-370
51. Wenderoth I., Scheibe R. y Von Schaewen A. 1997. Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J Cell Biol* 272: 26985–26990.
52. WHO, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>, Fecha de acceso: 05/07/13
53. Wilkinson, S.R., Kelly, J.M., 2003. The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biol. Chem.* 384, 517–525.
54. Wilkinson, S.R., Obado, S.O., Mauricio, I.L., Kelly, J.M., 2002. *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13453–13458.
55. Zahoor, A., Lafleur, M.V., Knight, R.C., Loman, H., Edwards, D.I., 1987. DNA damage induced by reduced nitroimidazole drugs. *Biochem. Pharmacol.* 36, 3299–3304.

