



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización bioquímica de la serina acetiltransferasa
y cisteína sintasa del parásito *Trypanosoma cruzi***

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ÁLVAREZ AVALOS SAMANTHA



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA**

CIUDAD DE MÉXICO, 2022



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.

1. Datos del alumno

Álvarez

Avalos

Samantha

5544613988

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias Carrera

312125536.

2. Datos del tutor

Dra.

Saavedra

Lira

Emma Cecilia

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Segal

Kischinevzky

Claudia Andrea

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Landa

Piedra

Abraham

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Gallardo

Pérez

Juan Carlos

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Forero

Forero

Ángela Victoria

7. Datos del trabajo escrito.

Caracterización bioquímica de la serina acetiltransferasa y cisteína sintasa del parásito

Trypanosoma cruzi

71 páginas

2022

-

A mis padres, abuelos y familia

Quiero agradecer infinitamente a ustedes que siempre me brindaron su amor, confianza, paciencia, velaron por mí y me impulsaron a seguir siempre adelante, por todo su apoyo incondicional, aun cuando hubo algunas dudas y tropiezos. Hoy también gracias a ustedes me lleno de orgullo al dedicarles este trabajo que me ha permitido concluir mis estudios profesionales. Crecer como persona y cumplir objetivos en mi vida. Gracias.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo que a continuación se presenta se realizó en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez bajo la tutoría de la Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira. Quiero agradecer a esta institución y a su personal los recursos y el apoyo prestados, sobre todo al Dr. Juan Carlos Gallardo por brindarme la oportunidad de entrar al instituto y a la Dra. Emma por aceptarme como parte de su equipo en el laboratorio y por la confianza depositada en mí.

Esta tesis se realizó con recursos financieros de los donativos de CONACyT 272941 y 282663 los cuales fueron otorgados a la Dra. Emma Saavedra.

Se agradece al CONACyT el haber recibido beca de ayudante de investigador en el proyecto 272941 y como ayudante de investigador SNI3 (becario17800).

Quiero agradecer a él Dr. Zabdi Abraham González Chávez y la Biól. Rusely Encalada Oregón quienes fungieron como mis asesores técnicos, a Citlali, que son investigadores del mismo Departamento de Bioquímica. Por su dedicación al guiarme durante el recorrido de esta tesis, tanto en los periodos difíciles como en los de satisfacción. Gracias por el tiempo compartido durante mi estancia en el laboratorio, por ayudarme a crecer académicamente, ayudarme a resolverme las muchas dudas tanto teóricas como a nivel práctico, pero sobre todo por valorarme y apoyarme en todo

A todos mis demás compañeros del laboratorio Kevin, Marlen, Oswaldo, Ximena, por su apoyo en los comienzos en el laboratorio e iniciar el trabajo que me permitió continuar, por los consejos académicos y personales, y sobre todo por haber estado junto a mí poniéndole un poquito de humor a cada día en el laboratorio y sacando lo mejor de mí. Sé que me llevo a grandes amigos, que se quedaran para toda la vida. Gracias por esos buenos momentos compartidos y por saber animarme. En especial a Kevin por ser mi mejor amigo y compañero de tesis, por compartir conmigo desde el primer día en el que entramos a la vez todos los momentos tanto de alegría, como de frustración y estrés, por escucharme, por apoyarme y saber qué aconsejarme en cada momento. A las nuevas incorporaciones, Moises y el Dr. Javier Belmont, por el apredizaje, apoyo, enseñanza y a alegría aportada al laboratorio.

Gracias a mi familia, en especial a mis padres Adriana y Jesús por el esfuerzo y perseverancia en el camino para lograr los objetivos, la confianza y apoyo incondicional, por estar ahí cuando os he necesitado y por ser como son. A mis abuelitos Josefina y Ramiro, por ser mis segundos padres, por las enseñanzas, aprendizajes, cariño y amor; los amo con toda mi alma. Gracias a ustedes por ser los principales motores de mis sueños, gracias por siempre confiar en mí, creer en mí y en mis expectativas, gracias por que fueron mi guía en el transcurso de la carrera, y de mi vida. A mi hermana Johana por ser mi confidente y por estar a mi lado en todo momento. A mis tías Josefina y Yolanda, por su cariño y apoyo

incondicional a mis tíos por compartir el camino y los logros hasta ahora conseguidos y ser mis hermanos mayores.

A Paco, aunque te conocí a final de la carrera, quiero agradecer el coincidir, el tiempo hasta ahora compartido, por hacer mi vida más fácil y divertida, por el amor y apoyo. Gracias por estar conmigo en este proceso, por convertirte en ahora mi compañero, agradezco tus abrazos y simplezas, la motivación de seguir siempre adelante...Fuimos beneficiados por el azar, que el azar puro haya sido tan amable y generoso que nos pudimos encontrar, en el "Cosmos", ya sabes en la inmensidad del tiempo y el espacio...Nos vimos el uno al otro. Nos encontramos el no al otro en el cosmos, y eso fue maravilloso... Te amo.

Quiero agradecer también a mis amigos y compañeros de la Facultad de Ciencias, UNAM, por mencionar algunos: Xochilt, Noemi, Jeymy Maru, Fer, Pamela, Franklin, Kevin, ... por estar dispuestos en cualquier momento a echar una mano para cualquier cosa. Por hacer el tiempo en la facultad más entretenido y divertido, por seguirme en mis locuras, por las largas pláticas, y aun por las salidas y los encuentros excepcionales. En especial a Bere, me dejó una gran enseñanza de vida, gracias por ser una de mis mejores amigas en la carrera, donde quiera que te encuentres te mando amor y bendiciones. A mis demás compañeros de la carrera que hicieron mis clases y prácticas de campo especiales.

Un agradecimiento especial a mis sinodales, por formar parte de mi comité tutorial y brindarme la confianza para sacar este trabajo adelante.

INDICE

I. ABREVIATURAS	8
II. RESUMEN	9
III. INTRODUCCIÓN	11
III.1 Biología de <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
III.2 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
III.3 Enfermedad de Chagas	14
III.4 Tratamiento de la enfermedad	19
III.5 Sistema antioxidante de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
III.6 Síntesis de cisteína en <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
III.7 Biosíntesis <i>de novo</i> en <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
III.8 Características generales de la SAT	27
III.9 Características generales de la CS	28
IV. JUSTIFICACIÓN	29
V. OBJETIVOS	29
V.1 Objetivo general	29
V.2 Objetivos particulares	29
VI. METODOLOGÍA	30
VI.1 Amplificación de los genes SAT y CS	30
VI.1.1 Extracción de DNA	30
VI.1.2 Cuantificación y pureza del DNA	31
VI.1.3 Diseño de cebadores para PCR	32
VI.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa.....	33
VI.1.4 Purificación del producto de PCR.....	34
VI.2 Clonación de los genes SAT y CS.....	34
VI.2.1 Ligación al vector de clonación pJET.....	34
VI.2.2 Células competentes.....	35
VI.2.3 Transformación de células <i>E. coli</i> Top10	35
VI.2.4 Obtención de DNA plasmídico	36
VI.2.5 Reacción de restricción	37
VI.2.6 Ligación al vector de expresión pET28	38
VI.2.7 Secuenciación de los genes SAT y CS	39
VI.3 Enzimas recombinantes.....	39
VI.3.1 Obtención de las enzimas recombinantes SAT y CS.....	39
VI.3.2 Cuantificación de proteína.....	41
VI.4 Caracterización cinética.....	42
VI.4.1 Actividad de la SAT.....	42
VI.4.2 Actividad de la CS.....	43
VII. RESULTADOS	45
VII.1 Extracción y cuantificación de DNA.....	45
VII.1.2 Amplificación de los fragmentos de DNA.....	46
VII.1.3 Clonación de los genes de la SAT y CS en pJET.....	47
VII.1.4 Clonación de los genes de la SAT y CS en pET28.....	50
VII.1.5 Secuencia de los genes de la SAT y CS en pET28.....	52

VII.2 Obtención de las enzimas recombinantes.....	53
VII.2.1. Establecimiento del protocolo de sobreexpresión.....	53
VII.2.2. Purificación de las proteínas recombinantes.....	57
VII.2.3. Obtencion de genes SAT y CS.....	60
VII.3 Caracterización cinética de la SAT y CS.....	60
VII.3.1 Cinética de la SAT.....	60
VII.3.2 Cinética de la CS.....	63
VIII. DISCUSIÓN GENERAL.....	66
IX. CONCLUSIONES.....	68
X. PERSPECTIVAS.....	68
X1. LITERATURA CITADA.....	69

ABREVIATURAS

T(SH) ₂	tripanotión
GSH	glutati3n
Spd	espermidina
γ -ECS	gama-glutamilcisteína sintetasa
Cys	cisteína
Glu	glutamato
γ -EC	gamma-glutamilcisteína
Gly	glicina
GS	glutati3n sintetasa
GSH	glutati3n
TryS	tripanotión sintetasa
TXN	triparredoxina
TS ₂	tripanotión oxidado
<i>K_m</i>	constante de Michaelis-Menten
<i>V_{max}</i>	velocidad máxima de la enzima
PLP	fosfato de piridoxal
CBS	cistationina- β -sintasa
CGL	cistationina- γ -liasa
SAT	serina acetiltransferasa
CS	cisteína sintasa
OAS	oxígeno-acetilserina
CoA	coenzima A
par/mL	parásitos por mililitro
rpm	revoluciones por minuto
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
DNA	ácido desoxirribonucleico
Fw	oligo Forward
Rw	oligo Reverse
pb	pares de bases
PCR	reacci3n en cadena de la polimerasa
Tm	temperatura de alineamiento
GC	guaninas y citosinas
MgCl ₂	cloruro de magnesio
DMSO	dimetilsulf3xido
ADB	buffer de disoluci3n de agarosa
TCA	ácido tricloroacético
BSO	butionina sulfoximina
DTNB	ácido 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoico). Reactivo de Ellman II.

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es un protozooario flagelado causante de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana. Esta enfermedad es endémica de 21 países de América Latina y es potencialmente mortal. Se transmite a los humanos principalmente de manera vectorial por triatominos hematófagos como el *Triatoma infestans* (chinche besucona). De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud, se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *T. cruzi*, la mayoría de los casos son en América Latina; sin embargo, se tienen casos reportados en Estados Unidos, Canadá y algunos países europeos debido principalmente a la migración de personas infectadas.

El parásito al entrar al hospedero humano está sometido a estrés oxidante debido a la inducción de la respuesta inmune. Para contender contra dicho estrés, *T. cruzi* cuenta con un sistema antioxidante dependiente de tripanotión ($T(SH)_2$), el cual es un metabolito tiol presente solamente en organismos de la familia *Trypanosomatidae*. En el grupo de trabajo se han dado a la tarea de estudiar las enzimas del sistema antioxidante del parásito para identificar aquellas que controlan el flujo de síntesis de $T(SH)_2$ y con ello validar nuevos blancos terapéuticos. En estudios *in vivo* y mediante modelado computacional de la ruta metabólica se reportó que el flujo de síntesis de $T(SH)_2$ está controlado mayoritariamente por la gama-glutamilcisteína sintetasa (γ -ECS), la cual controla entre 60–74%; mientras que la tripanotión sintetasa (TryS) controla entre 15–31%. En el caso de la γ -ECS, el valor de control determinado incluye el control que tiene la propia enzima, así como el de las enzimas o procesos que la preceden en la vía tales como el que suministra de cisteína a la γ -ECS. Además, el grupo de trabajo reportó que al suministrar distintas concentraciones de cisteína a epimastigotes en cultivo, se incrementa hasta 6 veces la poza de $T(SH)_2$ intracelular. Estos datos sugieren que el suministro de cisteína limita la síntesis de $T(SH)_2$. Por esta razón, en esta tesis estamos interesados en analizar bioquímicamente a las enzimas que sintetizan cisteína en el parásito.

Existen tres vías por las cuales *T. cruzi* puede suministrar cisteína a esta vía: (1) mediante su transporte del medio extracelular; (2) la vía de transulfuración y (3) la vía de síntesis *de novo*. Esta última se caracteriza por implicar un proceso de reducción y fijación de sulfato inorgánico en aminoácidos orgánicos, por lo que también se le conoce como vía asimilatoria biosintética de cisteína, la cual se encuentra presente en algunos organismos como son protozoos, bacterias y plantas y está ausente en vertebrados. Al estar ausente en mamíferos, las enzimas que participan en la vía de síntesis *de novo* de cisteína podrían proponerse como dianas terapéuticas efectivas contra el parásito.

Este trabajo de tesis se enfocó en la caracterización cinética de las enzimas que participan en la vía de síntesis *de novo*: serina acetiltransferasa (SAT) y cisteína sintasa (CS) de la cepa Querétaro de *T. cruzi*. Ambos genes se amplificaron por PCR a partir de DNA genómico del parásito y los amplificados se clonaron en el vector pJET, se realizó un patrón de restricción, se clonaron en un vector de expresión bacteriano y los amplificados se secuenciaron para confirmar la identidad de los genes. Con los plásmidos conteniendo los genes se transformaron *E. coli* de la cepa Rosetta, se indujo la expresión de las proteínas y se purificaron por cromatografía de afinidad con metales. Las enzimas recombinantes se caracterizaron cinéticamente en ensayos espectrofotométricos.

La SAT tuvo una V_{max} de $7.3 \pm 3.2 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ y mostró un comportamiento sigmoideal para acetil-CoA con una $K_{0.5}$ de $2.9 \pm 1.8 \text{ mM}$, y un comportamiento hiperbólico para la serina con una $K_{m_{app}}$ de $0.34 \pm 0.06 \text{ mM}$. La CS tuvo un valor de V_{max} de $7.9 \pm 2.9 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, presentó un comportamiento hiperbólico para Na_2S con una $K_{m_{app}}$ $9.2 \pm 1.8 \text{ mM}$ y un comportamiento con inhibición por sustrato para la OAS con una $K_{m_{app}}$ de $10.4 \pm 3.3 \text{ mM}$.

Los datos de la evaluación cinética sugieren que es probable que la velocidad con la que estas enzimas trabajan en el parásito sea baja debido a los altos valores de K_m . Sin embargo, hace falta determinar las V_{max} de las enzimas en los parásitos, así como las concentraciones de sus sustratos para poder

predecir su función, ya que en otros reportes se ha encontrado que las proteínas de SAT y CS se expresan constitutivamente en las tres formas del parásito y la CS es la proteína que más se expresa en amastigotes de *T. cruzi*.

INTRODUCCIÓN

Biología de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozoario flagelado perteneciente a la familia *Trypanosomatidae* que es el causante de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana. El parásito se caracteriza por poseer un solo flagelo y una única mitocondria, en la cual se encuentra almacenado el cinetoplasto, que corresponde al DNA mitocondrial (Martins *et al.*, 2012). El parásito se puede diferenciar en tres estadios morfológicos: epimastigote, tripomastigote y amastigote. Cada uno de los estadios del parásito se desarrolla dependiendo de dónde se encuentren los parásitos durante su ciclo de vida: si se encuentran dentro del insecto vector (chinche) se van a desarrollar los estadios de epimastigote y tripomastigote metacíclico, mientras que en el hospedero mamífero (incluyendo al humano) se desarrollan los estadios de amastigote y tripomastigote (Brenner, 1973).

El epimastigote corresponde a la forma replicativa dentro del tracto digestivo del vector. En este estadio el cinetoplasto se encuentra entre el núcleo y el flagelo, y este último emerge de la parte media del parásito, forma una membrana ondulante y es de menor tamaño que en los tripomastigotes (fig.1) (Cevallos y Hernández, 2004).

Tripomastigote es la forma infectiva, de forma fusiforme, mide entre 12 y 30 μm ; el flagelo inicia en la parte posterior del parásito y emerge en el extremo anterior, estando en forma libre no pegada al cuerpo. En este estadio el cinetoplasto se encuentra localizado posterior al núcleo y en la parte más extrema del parásito (fig.1) (Cevallos y Hernández, 2004).

Amastigote es el estadio intracelular y replicativo dentro del hospedero mamífero. Es de forma esférica, mide entre 1.5 y 4.0 μm , no tiene flagelo. Aquí el cinetoplasto se puede apreciar como un cuerpo oscuro cerca del núcleo (fig.1) (Cevallos y Hernández, 2004).

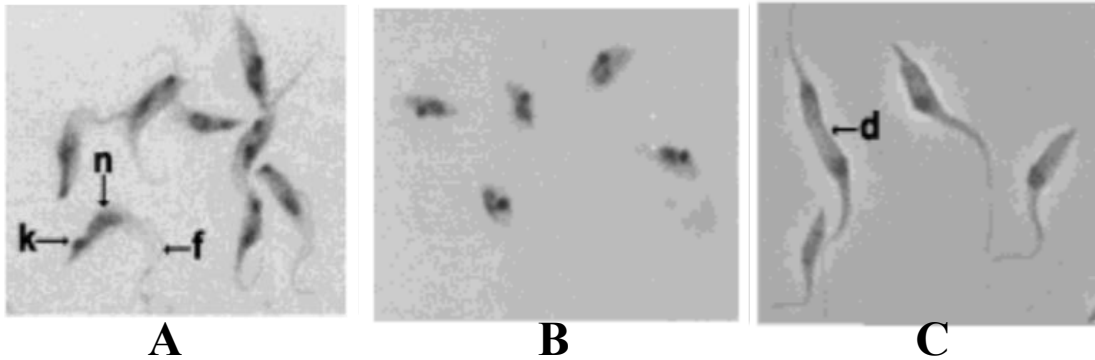


Figura 1. Estadios de *Trypanosoma cruzi*. A) Tripomastigotes de cultivo de tejidos. B) Células de amastigogénesis. C) Epimastigotes. Imagen obtenida (Paba *et al.*, 2004)

Se ha propuesto la evolución de *T. cruzi* a través de trabajos de filogenia molecular. Se plantea que este protozoo se originó a partir de un tripanosoma de murciélago, puesto que el pariente más cercano genéticamente caracterizado es *Trypanosoma marinkellei*, un parásito de murciélagos Sudamericanos. En una hipótesis se plantea que esos tripanosomátidos cambiaron de hospederos, de quirópteros a mamíferos terrestres, debido a la interacción de vectores invertebrados que se alimentaban de ambos (Steverding, 2014), separándose el ancestro originado de *T. marinkellei* hace aproximadamente 6 millones de años quedando como subespecies *T. cruzi* y *T. cruzi marinkellei* (Tomasini y Diosque, 2015).

Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es transmitido por chinches del género *Triatoma*. El ciclo de vida inicia cuando un triatomino se alimenta de la sangre de un hospedero infectado (principalmente mamíferos incluyendo al humano), que son portadores de la forma tripomastigote metacíclico (forma infectiva) del parásito (fig. 2).

La infección de los hospederos ocurre cuando entran en contacto con las formas metacíclicas infecciosas del parásito, las cuales se eliminan junto con las heces de los triatomíneos después de la alimentación. De acuerdo a esto existen dos tipos de tripanosomatidos, los salivarios como *T. brucei*, en donde la infección se da por medio de la saliva del vector; y los estercorearios, como *T. cruzi*, donde la infección se da por medio de las heces (Tuñón, 2013). Este contacto puede ocurrir a través de las mucosas o por alguna lesión preexistente o como resultado de la picadura del vector (fig. 2).

Los tripomastigotes metacíclicos entran al hospedero cubiertos por una vacuola parasitófora endocítica, secretada por él mismo; ahí pueden infectar distintos tipos celulares, sin embargo, al encontrarse en torrente sanguíneo sus principales células blanco son las células fagocíticas y macrófagos (Montiel y Díaz, 2002). Al entrar en contacto con estas células, los tripomastigotes se dirigen al citosol, donde se lisa la vacuola parasitófora, se diferencian en amastigotes y proliferan mediante fisión binaria. Después de aproximadamente nueve ciclos replicativos, se diferencian nuevamente en tripomastigotes, lisan la membrana de la célula huésped y son liberados otra vez al torrente sanguíneo, donde pueden diseminarse a través de la sangre e infectar otras células del hospedero, principalmente nerviosas y musculares. El ciclo continúa cuando triatomíneos no infectados ingieren sangre del hospedero infectado (Fernandes y Andrews, 2012). En el tracto digestivo de los triatomíneos, los tripomastigotes se diferencian en epimastigotes, que es la forma replicativa en el insecto vector y posteriormente, en la porción final del intestino, se transforman en tripomastigotes metacíclicos. (Rassi *et al.*, 2012) (fig. 2).

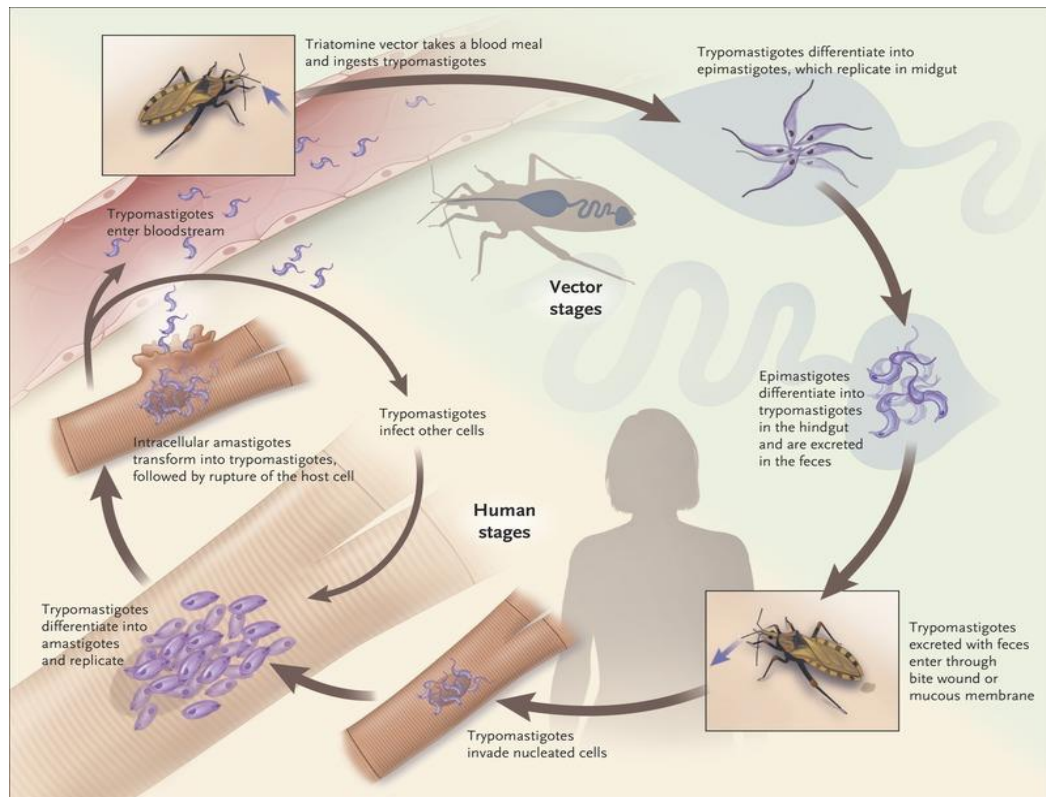


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Dentro del vector: tripomastigote metacíclico se diferencia en epimastigote, este epimastigote se reproduce por fisión binaria y viaja al tracto digestivo, donde se diferencia a tripomastigote metacíclico. En el hospedero: introducción al torrente sanguíneo del hospedero por rascado, los tripomastigotes metacíclicos infectan células, se diferencian a amastigotes y se reproducen por fisión binaria. Posteriormente se diferencian a tripomastigotes y lisan la célula, liberación al torrente sanguíneo (Cortez *et al.*, 2012).

Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es considerada una de las 14 enfermedades de rezago en la lista de la Organización Mundial de la Salud y constituye la parasitosis más grave en América Latina (Murillo, 2018).

El registro más antiguo de la enfermedad de Chagas en humanos data de hace 9,000 años en una momia de la cultura Chinchorro; los Chinchorros fueron las primeras personas identificadas en asentarse en el sur de Perú y el norte de Chile. El registro que le sigue en edad es de un fragmento de hueso hallado en el Valle de Perú a Brasil que data de hace 4,500 a 7,000 años. Con base en estudios paleoparasitológicos se plantea la hipótesis de que esta enfermedad se originó en la región Andina (Steverding, 2014).

Por otro lado, existe información que sugiere que Charles Darwin pudo contraer la enfermedad de Chagas durante su viaje en el Beagle por América del Sur. Se encontró una nota que escribió en su diario del 25 de marzo de 1835 donde describe su encuentro con lo que podría ser una chinche y sus consecuentes síntomas gástricos y nerviosos; sin embargo, se dice que algunos de los síntomas ya los presentaba antes de que iniciara su viaje (Steverding, 2014). Su fallecimiento en el año 1882 fue debido a problemas cardiológicos causados, posiblemente por dicha enfermedad.

En 1906 Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas de origen brasileño y médico de formación, fue el que describió la enfermedad de Chagas. Él fue invitado a trabajar al instituto "Oswaldo Cruz" de donde fue enviado a una población cerca de Río de Janeiro para tratar de erradicar la malaria y otras enfermedades que arrasaban la zona. Chagas se interesó principalmente en unos insectos hematófagos (*Panstrongilus magistus*) de los cuales había sido informado por trabajadores ferrocarrileros, debido a que se encontraban en gran masa en las viviendas de la población y se alimentaban de la sangre de las personas y animales domésticos. Chagas se dedicó a estudiar la biología del insecto para investigar si se trataba de un vector que pudiera transmitir algún parásito del hombre a cualquier vertebrado. Lo que encontró fue que los insectos estaban parasitados de protozoarios flagelados por lo que envió algunos de ellos al Dr. Oswaldo Cruz, quién infectó a diversos animales de laboratorio exponiéndolos a la picadura del insecto. Posteriormente examinaron la sangre de los animales inoculados, y descubrieron que se trataba de un tipo de tripanosoma. Al principio pensaron que se trataba de *T. minasense*; sin embargo, el nuevo tripanosoma presentaba caracteres diferentes a este y a los demás ya descritos, lo que los llevó a pensar que se trataba de una nueva especie. Esto lo corroboraron días después, cuando Chagas se encontró a una niña de esa población que presentaba fiebres elevadas, agrandamiento de brazo, hígado e inflamación en algunos ganglios y rostro. La niña estaba posiblemente infectada, debido a que se encontraba expuesta a las picaduras de los insectos y gatos infectados por los mismos; le tomaron muestras sanguíneas, y estas fueron sometidas a exámenes microscópicos, donde se reveló

la presencia de parásitos. Chagas los analizó y gracias a esto pudo caracterizar la morfología del parásito, nombrándolo como *Trypanosoma cruzi* en honor a su mentor el Dr. Oswaldo Gonzales Cruz, y así se comprobó la existencia de una nueva tripanosomiasis del humano (Ruiz, 2007). El ciclo de vida intracelular del parásito fue descrito por Gaspar de Oliveira Vianna y el modo de transmisión fue establecido por Alexandre Joseph Émile Brumpt en 1912 (Steverding, 2014).

La enfermedad de Chagas es transmitida a los humanos por triatominos hematófagos pertenecientes a la familia *Reduviidae* y al orden *Hemiptera* (chinchas) tal como el *Triatoma infestans* (chinche besucona o vinchuca) (Salazar *et al.*, 2016). Esta enfermedad es endémica de 21 países del continente americano, desde México hasta Argentina. Sin embargo, en los últimos años se tienen casos reportados en el sur de Estados Unidos, Canadá, Australia y algunos países europeos, e inclusive se ha registrado un aumento en el número de casos reportados en países no endémicos (Schmunis y Yadon, 2010) debido principalmente a fenómenos migratorios de humanos infectados (fig. 3).

De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud se calcula que en el mundo hay entre 8 y 11 millones de personas infectadas por *T. cruzi* y arroja una estimación de hasta 12 mil muertes al año, la mayoría de los casos son en América Latina (OMS, 2019). El principal mecanismo de transmisión es por medio del insecto vector y el segundo es mediante la transfusión sanguínea. Aunque en México solo existe un caso reportado a partir de 2012, ya se implementó el protocolo obligatorio de realizar el análisis parasitológico de la sangre utilizada en transfusiones o técnicas terapéuticas en instituciones correspondientes como bancos de sangre. Otros mecanismos menos frecuentes, pueden ser por trasplante de órganos u otros tejidos no sanguíneos, por la vía trasplacentaria (madre a hijo), los accidentes en laboratorio y la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas con el parásito (Zuñiga *et al.*, 2002; Salazar *et al.*, 2016).

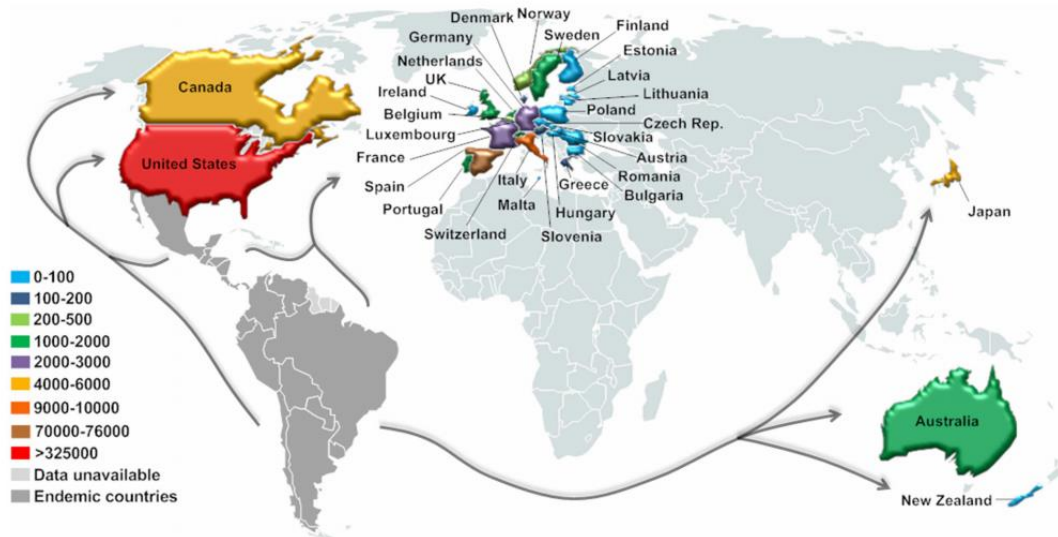


Figura 3. Número estimado de inmigrantes con infección por *T. cruzi* en países no endémicos. Distribución de la enfermedad de Chagas a países no endémicos, mostrando un aumento en la incidencia de personas infectadas, del año 2006 al 2012. Imagen obtenida de Lidani *et al.*, 2019.

En México se estima que existen 1.1 millones de personas infectadas, lo que indica un problema de salud pública (OMS, 2019). De acuerdo con monitoreos de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud en México, para los años 2000 a 2007 se mostró una incidencia en el número de casos reportados, arrojando un rango entre 0.07 y 0.37 infectados por cada 100 habitantes, mientras que para los años 2008 al 2012 se mostró un aumento entre 0.61 y 0.70 y se mantuvieron en ascenso los datos hasta el año 2015. Para el año 2016 y hasta el 2018 se observó un decremento en el número de casos, mostrando una incidencia entre 0.2 a 0.8 por cada 100 habitantes; sin embargo, para el año 2017 en el estado de Yucatán se reportó la incidencia más alta de 3.96 por cada 100 habitantes (Rojo *et al.*, 2018).

Para el año 2015 en la república mexicana se identificaron 8 géneros y 31 especies de triatominos, algunos de importancia epidemiológica asociados a cardiopatías y dilataciones de órganos del tracto digestivo, los cuales son: *Triatoma barberi*, *T. dimidiata*, *T. pallidipennis* (*Meccus pallidipennis*), *T. longipennis* (*Meccus longipennis*), *T. infestans*, *T. mazzotti* (*Meccus mazzotti*), *T. mexicana*, *T. gearslaeckeri*, *T. picturata* (*Meccus picturatus*), *Rhodnius prolixus*, *Dipetalogaster*

maxima y *Panstrongylus* spp. De éstas, las especies más abundantes son *T. longipennis*, *T. pallidipennis* y *T. dimidiata* (Rojo *et al.*, 2018) (fig. 4)

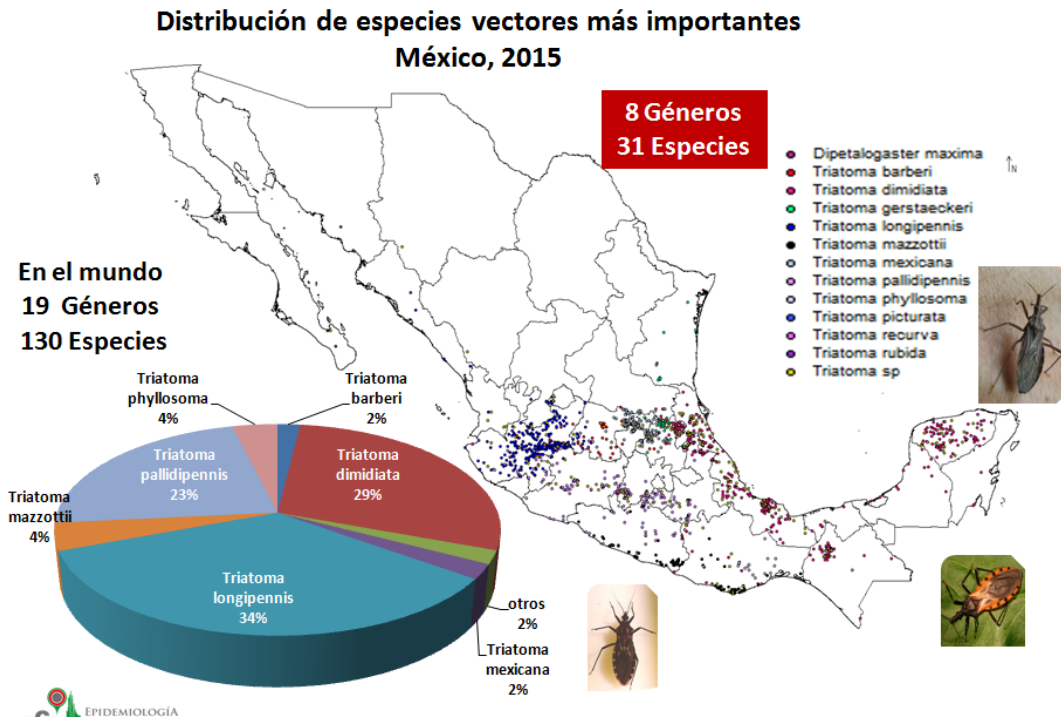


Figura 4. Distribución de triatóminos en México 2015. Especies de triatóminos presentes en la república mexicana y el porcentaje de las más abundantes. Imagen obtenida de Rojo *et al.*, 2018

La enfermedad de Chagas comprende dos fases, una aguda y una crónica. La fase aguda dura entre 4 y 10 semanas y se desarrolla inmediatamente después de la infección por el parásito, donde éste viaja por el torrente sanguíneo infectando las células del hospedero. Esta fase puede ser asintomática, sin embargo, en el caso de que se lleguen a presentar síntomas, estos son leves o inespecíficos como fiebre, inflamación en el sitio de inoculación (como en el signo de Romaña donde se produce una inflamación de la conjuntiva debido a la picadura) o inflamación interna como en los ganglios linfáticos, hígado y bazo, principalmente. Se estima que sólo del 1 al 5 % de infectados presenta síntomas y el porcentaje restante no los manifiesta, por este motivo los pacientes asintomáticos se vuelven el grupo con mayor número de incidencia (Pérez y Molina, 2018).

La fase crónica se desarrolla entre los 10 y 30 años después de que se contrajo la enfermedad y empieza con una forma indeterminada en la que los pacientes presentan una serología positiva pero sin síntomas. Posteriormente

puede progresar a una forma determinada, donde los síntomas son graves y las complicaciones severas; aquí los parásitos se encuentran alojados en diferentes tejidos y órganos, en particular corazón y el sistema digestivo, causando principalmente hipertrofia, fibrosis crónica, necrosis, degeneración granular y edema interfibrilar; megacolon, megaesófago y degeneración de ganglios (Pérez y Molina, 2018; Nguyen y Waseem, 2019). La OMS reporta que solamente un 30% de personas en fase crónica padecen trastornos cardíacos y un 10% presenta problemas digestivos, además de alteraciones neurológicas o una combinación de ambos (OMS, 2019).

Tratamiento de la enfermedad

Actualmente existen dos fármacos en la clínica utilizados para combatir la enfermedad, el benznidazol y el nifurtimox, los cuales tienen efecto tripanocida principalmente en la fase aguda de la enfermedad (Werner *et al.*, 2008). El mecanismo de acción principal de estos fármacos es mediante la formación de radicales libres y metabolitos electrofílicos (fig. 5), que actúan sobre el metabolismo de *T. cruzi* debido a que es susceptible al daño celular inducido por estos fármacos (Maya *et al.*, 2006).

El nifurtimox es un análogo de los nitrofuranos y actúa sobre la forma de amastigote y tripomastigote del protozoario; se ha visto que en la etapa aguda tiene una cura parasitológica del 76% mientras que en la fase crónica es más bajo y variable. Se ha propuesto que el mecanismo de acción del nifurtimox se basa en una alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que lleva al parásito a un estrés oxidante. Por otro lado, los intermediarios de la nitrorreducción del benznidazol actúan uniéndose de forma covalente a macromoléculas del parásito como DNA, lípidos y proteínas, siendo más efectivo en la fase aguda y poco en la fase crónica de la enfermedad. Sin embargo, ambos fármacos presentan efectos colaterales importantes en los pacientes, que van desde daños dermatológicos como erupciones cutáneas, hasta pérdida de peso, epigastrilia y depresión de la médula ósea con trombocitopenia, que es de las afectaciones más graves e incluso puede tener un compromiso neurológico, como el producir

parestesia y/o polineuritis periférica (Werner *et al.*, 2008). Es por ello que continúa la búsqueda de fármacos alternativos para el tratamiento de esta enfermedad, los cuales deben ser efectivos para el parásito y no tener efectos secundarios en los pacientes.

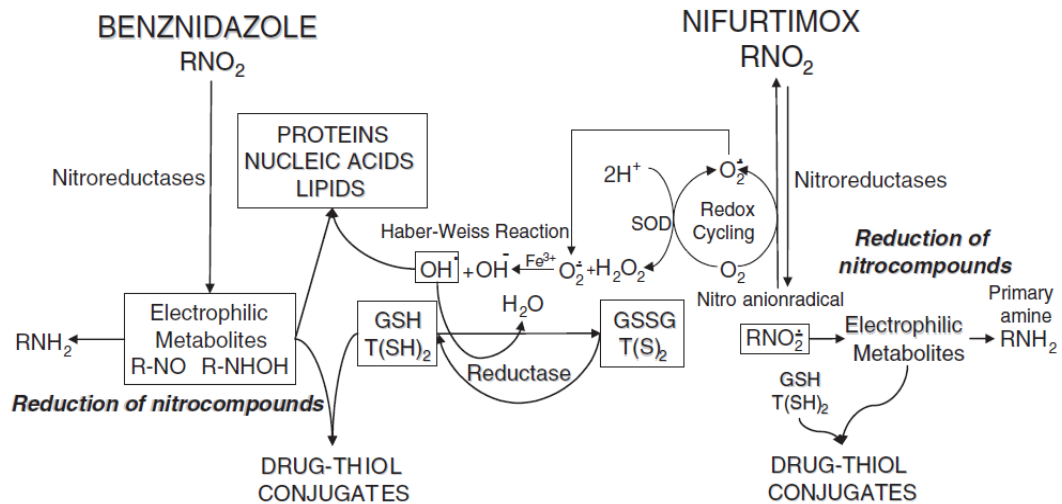


Figura 5. Mecanismo de acción del nifurtimox y beznidazol. El grupo nitro de ambos fármacos se reduce a radicales libres o metabolitos electrofílicos por nitrorreductasas del parásito *T. cruzi*. Los radicales libres derivados de nifurtimox pueden producir especies reactivas de oxígeno, mientras que los metabolitos derivados del benznidazol se unen a macromoléculas intracelulares; ambos fármacos dañan al parásito. Estos pueden ser neutralizados por la oxidación del GSH o T(SH)₂ reducidos (Maya *et al.* 2006).

Sistema antioxidante de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi presenta una vía antioxidante dependiente del tripanotión (T(SH)₂), que le confiere una defensa contra el estrés oxidante al que se ve sometido al entrar en contacto con células del hospedero y su respuesta inmune o contra los efectos de los tratamientos farmacológicos. El T(SH)₂ es un metabolito conjugado de dos moléculas de glutatión (GSH) unidos por una espermidina (Spd), que dona sus equivalentes reductores al sistema enzimático que es el responsable de desintoxicar a las especies oxidantes como los peróxidos (Olin *et al.*, 2010). El T(SH)₂ no está presente en los mamíferos, solamente se encuentra en tripanosomátidos como *T. cruzi*, y reemplaza las funciones que tiene el GSH en las células del hospedero.

La vía de síntesis de $T(SH)_2$, comienza con la acción de la enzima γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -ECS), la cual a partir de cisteína (Cys) y glutamato (Glu) forma γ -glutamilcisteína (γ -EC). A esta molécula se le une una glicina (Gly) por acción de la glutatión sintetasa (GS) para formar glutatión (GSH). El $T(SH)_2$ se sintetiza por la tripanotión sintetasa (TryS) a partir de dos moléculas de GSH y una de Spd. El $T(SH)_2$ dona sus electrones para reducir a la triparredoxina (TXN), la cual a su vez los transfiere a diferentes enzimas peroxidasas que reducen distintos peróxidos (Olin *et al.*, 2010). El tripanotión oxidado (TS_2) que se generó, vuelve a su forma reducida por acción de la tripanotión reductasa (TryR) con gasto de NADPH (fig. 6).



Figura 6. Vía antioxidante de *Trypanosoma cruzi*. El $T(SH)_2$ se sintetiza a partir de dos moléculas de GSH y una Spd por la acción de la TryS. A partir de Cys, Glu y Gly por la acción sucesiva de γ -ECS y GS se sintetiza el GSH; la Spd puede ser sintetizada por el parásito o importada del medio extracelular. El $T(SH)_2$ dona sus electrones al sistema de reducción de peróxidos; termina oxidado como disulfuro (TS_2) y es reducido por la tripanotión reductasa (TryR) con gasto de NADPH. Modificado de Vázquez *et al.* 2017

El estudio de la vía antioxidante de *T. cruzi* es de interés biológico y farmacológico debido a las diferencias que presenta con respecto al sistema antioxidante de humano, por lo que sus enzimas se han propuesto como dianas terapéuticas. Debido a que se ha determinado que todas las enzimas de la vía son esenciales para la supervivencia o resistencia a estrés del parásito, se requiere aplicar criterios adicionales para validarla e identificar las enzimas más convenientes de inhibir en esta ruta metabólica (Saavedra *et al.*, 2019; González-Chávez *et al.*, 2019). Al respecto, el grupo de la Dra. Emma Saavedra en el Instituto Nacional de Cardiología (INCar), donde realicé mi tesis de licenciatura, se ha dado a la tarea de estudiar las enzimas de esta vía para revelar aquellas que controlan el flujo de síntesis de $T(SH)_2$ y con ello identificar y validar nuevos blancos terapéuticos (González *et al.*, 2019). El objetivo a largo plazo es ayudar a seleccionar las

enzimas blanco para el diseño y/o la selección de fármacos que puedan ser más efectivos contra el parásito y con menores efectos secundarios para los pacientes.

El grupo de trabajo reportó en estudios *in-vivo* y mediante modelado computacional de la ruta metabólica, que el flujo de síntesis de T(SH)₂ está controlado entre 60–74% por la γ -ECS, mientras que la TryS controla entre 15–31% (González *et al.*, 2019). En el caso de la γ -ECS, el valor de control determinado incluye tanto el control de la propia enzima como el de las enzimas o procesos que suministran de Cys a esta enzima y por lo tanto a la síntesis del T(SH)₂. El glutamato y ATP, que son los otros dos sustratos de la γ ECS, están en concentraciones saturantes en el parásito (Olin-Sandoval *et al.*, 2012).

Además, el grupo de trabajo reportó que el suministro de Cys determina de manera importante las pozas de T(SH)₂ del parásito. En un estudio realizado por Vázquez *et al.*, 2017, se reportó la importancia de los tioles como la Cys y el GSH a la síntesis de T(SH)₂. Se suplementaron epimastigotes en cultivo con 0.1 mM de Cys y 1 mM de GSH, se midieron los tioles intracelulares, y se obtuvo como resultado que las pozas de T(SH)₂ aumentaron entre 4 y 6 veces al suplementar con respecto al control sin suplementación (fig. 7). Estos resultados indicaron que ambos sustratos, principalmente la Cys, son limitantes en la vía y por lo tanto, son muy importantes en la síntesis de T(SH)₂.

Otro estudio realizado por González *et al.*, 2019, reportó el efecto que tenían los tioles, poliaminas y la combinación de ambas en el aumento en la síntesis de T(SH)₂ (fig. 8). Para ello se suplementaron cultivos de epimastigotes *wild type* y sobreexpresantes de γ -ECS con 0.1 mM de Cys y 0.1 mM de Spd y su combinación. Los resultados mostraron que al suplementar con Cys las pozas de T(SH)₂ aumentaban entre 3 y 6 veces con respecto al control, mientras que al suplementar sólo con Spd no se mostró un aumento. Asimismo, la combinación de Cys y Spd sí mostró un aumento, el cual no fue mayor a lo obtenido cuando se suplementó solo con Cys.

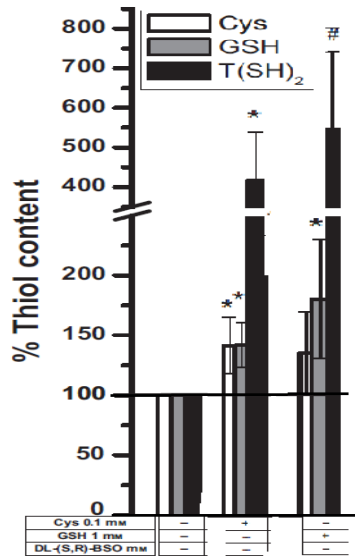


Figura 7. Efecto de la suplementación de epimastigotes en cultivo con Cys y GSH. Aumento en el contenido de metabolitos de tiol en epimastigotes tratados durante 24 h con 0.1 mM Cys o 1 mM GSH. Los contenidos de Cys, GSH y TSH2 se determinaron por HPLC en extractos de los parásitos. Modificado de Vázquez *et al.* 2017.

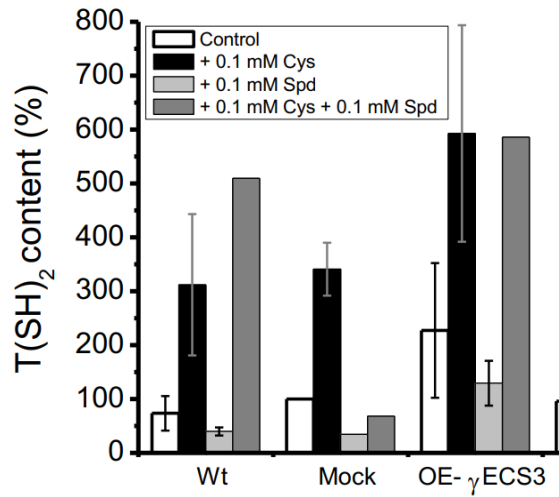


Figura 8. Efecto de la suplementación de epimastigotes en cultivo con Cys y Spd. Aumento en las pozas de T(SH)₂ de epimastigotes suplementados con 0.1 mM de Cys o 0.1 mM de Spd ó su combinación. Las células corresponden a epimastigotes Wt (tipo silvestre); mock (células transformadas con plásmido vacío); y parásitos sobrepresantes de γECS3 (OE-γ-ECS clon 3). Modificado de González-Chavez *et al.* 2019

Estos datos sugieren que el suministro de Cys limita la síntesis de T(SH)₂. Por esta razón, estamos interesados en analizar bioquímicamente a las enzimas que sintetizan Cys en el parásito.

Síntesis de Cys en *Trypanosoma cruzi*

La Cys es un aminoácido semiesencial sintetizado por los seres vivos, se caracteriza por ser un componente proteinogénico, el cual contiene un grupo tiol (o sulfidriilo -SH) en su estructura, lo que le confiere una mayor reactividad. El grupo tiol es el que participa en las reacciones producidas por la Cys; además se puede oxidar para formar un puente disulfuro entre dos cisteínas mediante un enlace covalente, esto para dar estructura, estabilidad al plegamiento y función a las proteínas. También se ha visto que este enlace puede sufrir procesos de óxido-reducción, lo que produce un mecanismo de regulación redox (Álvarez *et al.*, 2010; Gotor, 2010).

Por otro lado, la Cys es la molécula precursora que puede producir metabolitos azufrados esenciales para la supervivencia de todos los organismos, incluyendo *T. cruzi* (Canepa *et al.* 2009), ya que dan origen a moléculas antioxidantes como el GSH y el T(SH)₂. También se ha visto que la Cys forma agrupaciones sulfoféricas (uniones de átomos de hierro con azufre), las cuales se unen de forma covalente a proteínas esenciales para la vida, como las que participan en el proceso de respiración en la mitocondria o en el proceso de la fotosíntesis en el cloroplasto de las plantas (Gotor, 2010). Cys es un precursor de vitaminas como la tiamina B1 y la biotina B7 y como ya ha sido descrito antes, es uno de los sustratos necesarios para la biosíntesis de proteínas y como precursor del T(SH)₂ con un papel esencial en el mecanismo de la defensa antioxidante de *T. cruzi*.

Existen tres vías por las cuales *T. cruzi* puede proveerse de Cys: (1) mediante el transporte del medio extracelular; (2) mediante su síntesis por la vía de transulfuración y (3) la vía de síntesis *de novo* por asimilación de azufre.

El transporte de Cys constituye una vía de incorporación de L-cisteína del medio extracelular, el cual se ha demostrado que es activo en epimastigotes de *T. cruzi* (Canepa *et al.* 2009). Se ha reportado que es un transporte altamente específico para L-Cys y se regula por la inanición de aminoácidos, pH extracelular y por las fases del crecimiento del parásito (exponencial y estacionaria). El transporte de L-cisteína mostró una *K_m* aparente de 49.5 µM y una *V_{max}* de 13 pmol/min por 10⁷ células (Canepa *et al.* 2009) lo que equivale a 250 pmoles/min*mg prot celular. Este transporte tiene un gran ahorro energético debido a que no utiliza ATP o gradiente de iones; sin embargo, esto no es tan efectivo, ya que el transporte depende completamente de la cantidad de Cys que se encuentre en el medio extracelular, además de que se tiene muy poca información sobre los elementos involucrados en los mecanismos reguladores de este transporte. Asimismo, no se ha determinado la identidad molecular del transportador.

Biosíntesis *de novo* de *Trypanosoma cruzi*

Otra de las vías por la cual se sintetiza Cys en las células es por la síntesis *de novo* (fig. 10). Esta vía ocurre principalmente en bacterias, plantas y algunos protozoarios y está ausente en vertebrados como los mamíferos. Se caracteriza porque implica un proceso de reducción y fijación de sulfato inorgánico a aminoácidos orgánicos, por lo que también se le conoce como vía asimilatoria biosintética de Cys (Romero *et al.* 2014). La síntesis *de novo* de Cys, comienza con la acción de la serina acetiltransferasa (SAT) que cataliza una reacción de transferencia del acetilo del acetil-coenzima A al hidroxilo de la serina para formar O-acetilserina (OAS). Posteriormente, la OAS reacciona con sulfuro por la acción de la cisteína sintasa (CS) para producir Cys (fig. 10) (Williams *et al.*, 2009).

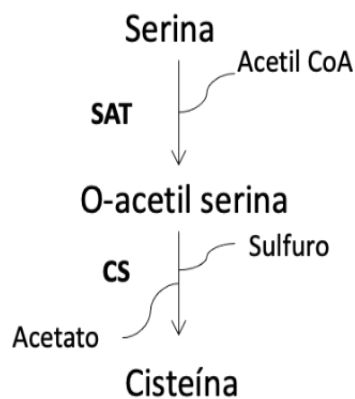


Figura 10. Vía de síntesis *de novo* de cisteína de *Trypanosoma cruzi*. En la biosíntesis *de novo*, la cisteína se sintetiza a partir de la serina y acetil-CoA, O-acetilserina y sulfuro, por acción de la serina acetil-transferasa (SAT), y la cisteína sintasa (CS). Modificado de Singh *et al.* 2016

Esta tesis se enfocó en el estudio de esta vía, debido que al conocer el mecanismo de acción que tienen las enzimas SAT y CS en la vía podremos determinar su relevancia en la síntesis de T(SH)₂, además de que al estar ausente en mamíferos, estas enzimas podrían proponerse como posibles dianas terapéuticas efectivas contra el parásito, disminuyendo los efectos secundarios en los pacientes.

Características generales de la SAT

La serina acetiltransferasa participa en vía de síntesis *de novo* de Cys. El hidroxilo de la serina realiza un ataque nucleofílico al carbonilo del acetil-CoA para formar OAS y liberando coenzima A:



Se tiene muy poca información reportada sobre esta enzima en *T. cruzi*. Nozaki y colaboradores (Nozaki *et al.*, 2001) reportaron una caracterización parcial de la SAT, purificaron la enzima de forma recombinante y evaluaron parámetros cinéticos. El estudio se realizó monitoreando la disminución de la absorbancia a 232 nm, debido al rompimiento del enlace tioéster de la acetil-coenzima A. Se determinó que la enzima sigue una cinética hiperbólica, con una Km_{app} para L-serina de 0.24 ± 0.1 mM (en presencia de 0.1 mM de acetil-CoA) y una Km_{app} para acetil-CoA de 0.92 ± 0.3 mM (en presencia de 10 mM L-serina). No se reportó el valor de su $Vmax$. También se determinó que la SAT de *T. cruzi* presenta inhibición alostérica por L-cisteína, L-cistina y, en menor medida por glutatión (Nozaki *et al.*, 2001). Sin embargo, estos datos se obtuvieron a un pH 8 y una temperatura de 25°C, los cuales son diferentes de las condiciones fisiológicas de pH intracelular (pH 7.4) y de temperatura de crecimiento de las formas infectivas de los parásitos (37°C).

Características generales de la CS

La CS cataliza el paso final de la síntesis *de novo*. El OAS sufre una esterificación, y posteriormente se forma un enlace tioéter dado por la alquilación del sulfuro con el OAS resultante de la esterificación para producir Cys y acetato.



En el año 2012, se publicó una caracterización parcial de la CS (Marciano *et al.*, 2012). Se purificó la enzima de forma recombinante y se evaluaron parámetros cinéticos midiendo la formación de Cys mediante un ensayo colorimétrico con ninhidrina. Se determinó que la enzima sigue una cinética sigmoideal, con una V_{max} de $307 \pm 21 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$, una $K_{0.5 \text{ OAS}}$ $7.8 \pm 0.6 \text{ mM}$ (en condiciones saturantes de sulfuro) y una $K_{0.5 \text{ sulfuro}}$ de $8.2 \pm 0.5 \text{ mM}$ y con un valor de cooperatividad de 3 (Marciano *et al.*, 2012). Se ha propuesto que al menos a nivel de proteína, la CS es más abundante en amastigotes que en epimastigotes (Marciano *et al.*, 2012). Sin embargo, hacen falta más estudios de la enzima para corroborar ese resultado.

JUSTIFICACIÓN

La Cys es un metabolito precursor del T(SH)₂ y resultados previos del laboratorio indican que un suministro adecuado de Cys determina las pozas de T(SH)₂ en el parásito. Por lo anterior se requiere analizar cada una de las rutas que participan en el suministro de Cys en *T. cruzi*.

Para este proyecto de tesis, se analizará cinéticamente las enzimas que participan en la vía de síntesis *de novo* de Cys, esta información nos permitirá determinar su relevancia en la síntesis de T(SH)₂ en *T. cruzi*.

Al no estar presente en los mamíferos, el análisis de esta vía podría ayudar en la validación de un blanco terapéutico para el diseño y la selección de un fármaco, cumpliendo la regla de que debe ser efectivo para el parásito y no deberá presentar efectos secundarios en los pacientes.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar bioquímicamente a la serina acetiltransferasa y cisteína sintasa de la vía de síntesis *de novo* de cisteína del parásito *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos particulares

- Obtener las enzimas serina acetiltransferasa (SAT) y cisteína sintasa (CS) de manera recombinante.
- Obtener los parámetros cinéticos *K_m* y *V_{max}* de cada una de las enzimas en condiciones similares a las fisiológicas, pH 7.4 y 37 °C de temperatura.

METODOLOGÍA

El plan de trabajo general es

(1) Amplificar por la técnica de PCR los genes de la SAT y CS a partir de DNA genómico de *T. cruzi*,

(2) Clonar los genes amplificados en el vector de clonación pJET, y posteriormente en el vector de expresión pET28.

(3) Sobrexpresar las enzimas en bacterias *E. coli* (DE3) y posteriormente purificar las proteínas en su forma recombinante.

(4) Realizar la caracterización cinética de las enzimas recombinantes por espectrofotometría para obtener los parámetros cinéticos de cada una de ellas.

Amplificación de los genes SAT y CS

Extracción de DNA

Se preparó un cultivo de 20 mL de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Querétaro en medio LIT (liver infusion-tryptose) a una concentración de 1×10^6 parásitos/mL y se incubó a 28°C por 5 días. Posteriormente, se realizó un conteo celular en una cámara de Neubauer en el microscopio asegurando que los parásitos se encontraran a una concentración final de 200×10^6 par/mL en los 20 mL totales del cultivo, debido a que es la cantidad de parásitos necesaria para la obtención del DNA. Posteriormente se cosecharon los parásitos por centrifugación a 3,500 rpm por 10 min. En condiciones de esterilidad se realizaron dos lavados con 10 mL de buffer salino de fosfatos (PBS), entre cada lavado se centrifugó a 3,500 rpm por 10 min. Al finalizar los lavados se agregó 500 μ L de buffer de lisis (0.3 M de NaCl, 10% de trietanolamina e imidazol al 0.002%) y 6 μ L de RNasa (10 mg/mL). Se incubó a 37°C durante 1 hora en un baño de agua. Transcurrido el tiempo se pasó el contenido a un tubo de polipropileno estéril de 1.5 mL y se añadieron 500 μ L de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó por inversión hasta que el contenido se tornara homogéneo y se centrifugó a 12,000 rpm por 10

min. Al término de la centrifugación se podían apreciar dos fases en el tubo, una fase acuosa y la fase orgánica, se recuperó la fase acuosa y se colocó en otro tubo de 1.5 mL. Se le añadió 500 µL de la mezcla fenol-cloroformo-isoamílico, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min; este paso se repitió una vez más haciendo un total de 3 extracciones. La fase acuosa de la última extracción se transfirió a otro tubo de 1.5 mL, se agregó 1 mL de isopropanol, se agitó suavemente por inversión y se mantuvo a -20°C toda la noche para precipitar el DNA. Al día siguiente se agitó por inversión aproximadamente 10 min hasta que se formó la red de DNA. Una vez formada se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante, al precipitado se le agregaron 500 µL de etanol al 70% frío, se lavó cuidadosamente con la ayuda de una micropipeta y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. Después de centrifugar se retiró el sobrenadante, el etanol restante se dejó evaporar a temperatura ambiente por 15 min aproximadamente. Por último, se resuspendió en 50 µL de buffer TE (10 mM de Tris + 0.1 mM de EDTA).

Cuantificación y pureza del DNA

La cuantificación y pureza del DNA se analizó por espectrofotometría. En una celda de cuarzo se agregaron 2 mL de agua Milli-Q, la cual sirvió como blanco y para ajustar a cero la lectura. En seguida se agregaron 5 µL de la muestra de DNA y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 260 y 280 nm. El DNA tiene una absorbancia máxima a 260 nm mientras que para las proteínas el máximo es a 280 nm; por lo tanto, en esta longitud de onda también se puede mostrar si hay contaminantes proteicos. Las lecturas se hicieron por triplicado para tener mayor grado de confianza en el resultado.

Una vez obtenido el valor de absorbancia de la muestra se multiplica por 50 µg/mL, el cual es el factor de concentración que indica que un valor de absorbancia de 1 a 260 nm es igual a esa concentración de ácido nucleico. Con el valor obtenido se multiplica por el factor de dilución ($1/\text{dilución}$) y de esta manera se obtiene el valor real y total de la concentración de DNA. Para determinar la pureza del DNA

obtenido, lo que se realiza es una división entre la lectura obtenida a 260 nm y 280 nm (A_{260}/A_{280}). Dependiendo de la composición nucleica, el valor resultante puede variar entre 1.65 a 1.9 lo que indica la pureza de la muestra.

Para corroborar la integridad del DNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio durante 1 hora a 100 mV y posteriormente se reveló el DNA en un transiluminador con luz ultravioleta.

Diseño de cebadores para PCR

Para el diseño de los oligos, primero se obtuvo la secuencia de nucleótidos para cada uno de los genes de la SAT (AAK16403.1) y CS (XP_805193) a partir del banco de datos del genoma el Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Una vez que teníamos la secuencia completa para cada gen, se buscaron sitios de reconocimiento para enzimas de restricción que se encuentran en el sitio múltiple de clonación del vector de sobreexpresión (fig. 11). Se seleccionaron dos enzimas que no cortaran y una que cortara internamente la secuencia de nucleótidos de los genes. Para el caso de la SAT se seleccionaron *NheI* (GCTAGC) para el extremo 5' y *XhoI* (CTCGAG) para el extremo 3', mientras que *HindIII* (AAGCTT) se seleccionó para cortar internamente. En el caso del gen de CS se seleccionaron *NdeI* (CATATG) en el 5', *HindIII* (AAGCTT) en el 3', y *PstI* (CTGCAG) que corta internamente.

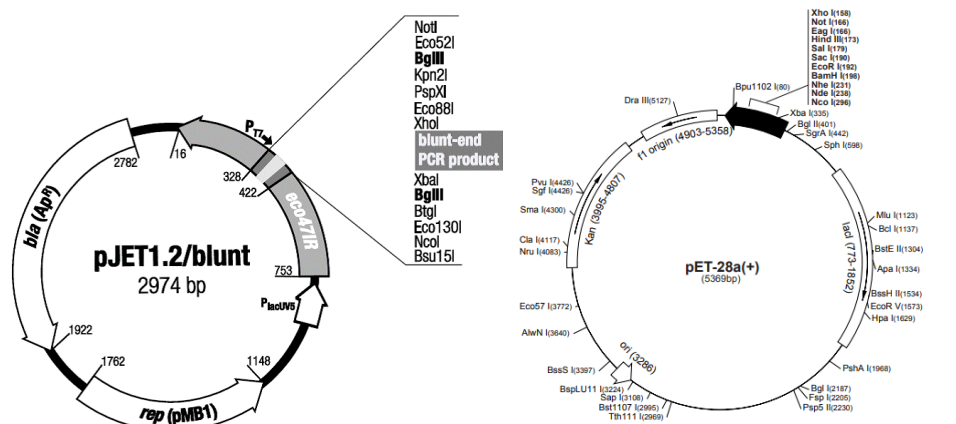


Figura 11. Vectores de clonación y sobreexpresión. Vector de clonación pJET1.2/blunt y vector de expresión pET28a, con sus respectivos sitios múltiples de restricción, utilizados en este trabajo.

Para el diseño de los oligos se consideraron las primeras 18-20 bases de la secuencia de los genes y se agregaron las secuencias de nucleótidos para las enzimas de restricción mencionadas. La tabla 1 muestra las secuencias de los cebadores

Tabla 1. Secuencias de nucleótidos de los cebadores para amplificar los genes por PCR.

Gen	Oligonucleótidos 5' -> 3':
SAT	OligoFw: CGCGCTAGCAATCGACTCGAAGTCA
	OligoRw: GGATCGGATATATGACTCGAGCGCG
CS	OligoFw: GCGCATATGATGTCTGTGCAAGAAT
	OligoRw: ATCTCCGTTCTCTCGAAGCTTGCG

A estos oligonucleótidos se les calculó la temperatura de hibridación (Tm) así como el porcentaje de GC , valores que se consideraron para la reacción de PCR para determinar la temperatura óptima de alineamiento de los cebadores.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó una dilución 1:100 de la muestra de DNA purificado y de los oligos, en una concentración final de 30 ng/μL del DNA y 20 ng/μL de los oligos. Los componentes de la mezcla la reacción para el PCR se muestra en la tabla 2 y el volumen fue de 20 μL de reacción:

Tabla 2. Componentes de la mezcla de reacción para PCR.

Componentes	Concentración final
Agua libre de nucleasas	cbp 20 μL
Buffer de reacción*	2X
dNTPs (10 mM)	0.2 mM
Oligo fw:	20 ng
Oligo rv:	20 ng
DNA (dilución):	30 ng
DNA polimerasa <i>Phusion</i>	1U
DNA	

*50mM MgCl₂ + 100% DMSO

La PCR se realizó en un termociclador de gradiente, y se programó con el siguiente protocolo de amplificación:

Paso 1:	95°C, 5 min	1 ciclo desnaturalización
Paso 2:	95°C, 30 seg	Desnaturalización
Paso 3:	gradiente de temperatura (50°C, 55°C, 60°C), 30seg	Alineamiento de cebadores
Paso 4:	72°C, 30 seg	
Paso 5:	repetir paso 2-4 por 30 ciclos	Extensión
Paso 6:	72°C, 5 min	
Paso 7:	4°C	

Posteriormente los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para confirmar que se había amplificado el fragmento, se utilizó como marcador *100pb DNA LADDER AXYGEM* y bromuro de etidio para visualizar los amplicones.

Purificación del producto de PCR

Después de separar los amplificados por electroforesis, se cortó la banda del producto del tamaño esperado y se purificó con el kit *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit*. Este kit utiliza buffer ADB (Agarose Dissolving Buffer) para disolver la agarosa que contiene la muestra de DNA, se deja disolver la muestra a una temperatura de 55°C y el contenido se transfiere a una columna, la cual cuenta con una membrana de unión selectivada de DNA para recuperar el producto amplificado.

Clonación de los genes

Ligación al vector de clonación pJET

El vector de clonación pJET permite la multiplicación rápida de fragmentos de DNA producidos por PCR. Para la ligación de los fragmentos amplificados se utilizó el kit *CloneJET PCR Cloning* (ThermoFisher). En un tubo de polipropileno de 1.5 mL estéril se adicionaron los componentes indicados en la tabla 3.

Tabla 3. Componentes de la mezcla de reacción de la ligación al vector pJET

Componentes	
Buffer de reacción 2x	10 µL
Producto de PCR purificado	5 µL
pJET 1.2/blunt:	1 µL
Agua libre de nucleasas:	3 µL
DNA ligasa <i>T4</i> :	1 µL

La reacción se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se realizó una transformación en células de *Escherichia coli* Top10.

Células competentes

Las células competentes se prepararon por tratamiento con CaCl₂. Se creció una asada de bacterias *E. coli* Top10 en 5 mL de medio Lisogenc Broth sin antibiótico a 37°C toda la noche. Al día siguiente, se suplementaron 50 mL de medio LB con los 5 mL del preinóculo y se incubó en agitación a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una absorbancia a 600nm de 0.4-0.5 medido por espectrofotometría. Posteriormente, el cultivo se mantuvo en hielo por 10 min después de lo cual se transfirió a un tubo de polipropileno estéril de 50 mL y se centrifugó a 3500 rpm por 10 min. En condiciones de esterilidad se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 33 mL de una solución de 0.1 M de CaCl₂ estéril y fría. Se incubó durante 1 hora y posteriormente se centrifugó a 3500 rpm por 10 min. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 2 mL de una solución estéril de 0.1 M de CaCl₂ con 17% de glicerol. Inmediatamente, se realizaron alícuotas de 100 µL de la muestra en microtubos de polipropileno de 0.6 mL, se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C

Transformación de células *E. coli* Top10

La transformación en células *E. coli* top10 se realiza en condiciones de esterilidad. En un microtubo de 1.5 mL estéril se pusieron 50 µL de células competentes de *E. coli* top10 y los 20 µL obtenidos de la reacción de ligación del inciso V.2.1. Se incubó en un baño de agua a 42°C por 45 segundos e inmediatamente después se

introdujo en hielo durante 3 min. Transcurrido el tiempo se agregó 1 mL de medio LB, se agitó suavemente por inversión de 3 a 4 veces y se incubó por 1 hora a 37°C. Posteriormente se centrifugó a 3,500 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante dejando un poco de medio para resuspender la pastilla. La muestra se sembró en una caja con medio LB agar + 25 ng/μL de ampicilina y se incubó toda la noche a 37°C para que crecieran colonias de transformantes, las cuales se identifican por su resistencia al antibiótico.

Obtención de DNA plasmídico

Se utilizó el kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* de Promega. En condiciones de esterilidad se extrajeron con un palillo estéril 5 colonias, las cuales se pusieron cada una en 3 mL de medio LB con 0.3 ng/μL de ampicilina y se incubó a 37°C toda la noche. Al día siguiente, en condiciones de esterilidad, se plaqueó una asada del preinóculo en una caja de medio LB-agar con 5 ng/μL de ampicilina y las células del resto del cultivo se cosecharon por centrifugación a 3,500 rpm por 10 min. Se descartaron los sobrenadantes y las células se resuspendieron en 250 μL de solución de resuspensión celular. Posteriormente se agregaron 250 μL de solución de lisis celular y se agitó por inversión 6 veces. Posteriormente se adicionaron 5 μL de solución de proteasa alcalina, se agitó 8 veces por inversión y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron 350 μL de solución de neutralización, se agitó por inversión 6 veces y se centrifugó a máxima velocidad (14,000 rpm) por 10 min. En un tubo colector se colocó una columna con una membrana que une al DNA, se vació el sobrenadante del lisado celular y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min. Se descartó el líquido del tubo colector, se agregaron a la columna 750 μL de solución de lavado y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min; este paso se hizo por duplicado agregando solamente 250 μL y centrifugando a máxima velocidad durante 2 min para eliminar el exceso de solución. Por último, se colocó la columna en un microtubo de 1.5 mL, se le agregaron 100 μL de agua libre de nucleasas para eluir el DNA, se centrifugó a máxima velocidad por 1 min y el eluato se guardó a -20 °C.

Análisis con enzimas de restricción

Al plásmido obtenido de cada colonia se le realizó una digestión con enzimas de restricción para verificar si el inserto contiene los sitios de restricción predichos de acuerdo con la secuencia de nucleótidos de cada gen.

Para la reacción de restricción se utilizaron las enzimas que liberan a cada uno de los genes del vector ya sea de clonación y/o sobreexpresión. Se realiza una mezcla de reacción como se muestra en la tabla 4:

Tabla 4. Componentes de la mezcla de reacción de una reacción de doble restricción.

Componentes	
Agua libre de nucleasas:	7 µL
DNA plasmídico:	10 µL
Buffer 2 (<i>NEB</i>):	2 µL
Enzima 1:	<i>NheI</i> / <i>NdeI</i> : 0.5 µL
Enzima 2:	<i>XhoI</i> / <i>HindIII</i> 0.5 µL

Las reacciones se incubaron toda la noche a 37 °C. Posteriormente los fragmentos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y se utilizó bromuro de etidio para teñir el DNA y el marcador *1 Kb plus DNA LADDER* de *INVITROGEN* para estimar su tamaño.

De igual manera se realizó una triple digestión con las dos enzimas que liberan al gen de los vectores y con la enzima que corta internamente a cada uno de los genes de la SAT y CS. En la tabla 5 se muestra la mezcla de reacción con los siguientes volúmenes:

Tabla 5. Componentes de la mezcla de reacción de una reacción de triple restricción.

Componentes	
Agua libre de nucleasas:	7 µL
DNA plasmídico:	10 µL
Buffer 2 (<i>NEB</i>):	2 µL
Enzima 1:	<i>NheI</i> / <i>NdeI</i> : 0.5 µL
Enzima 2:	<i>XhoI</i> / <i>HindIII</i> : 0.5 µL
Enzima 3:	<i>HindIII</i> / <i>PstI</i> : 0.5 µL

Se incubaron las reacciones toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se separaron los fragmentos por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%.

Ligación al vector de expresión pET28

El plásmido pET28a sirve para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. La expresión de la proteína en la bacteria hospedera se induce con isopropiltiogalactósido (IPTG), el cual induce la expresión del gen de la RNA polimerasa del fago T7 que está insertado en el genoma de la bacteria hospedera. La RNA polimerasa T7 se une al promotor T7 en el plásmido pET28, el cual está adyacente al gen de interés que se clonó, induciendo de esa manera la expresión de la proteína de interés. Además, el vector cuenta con una secuencia que codifica para una etiqueta de histidinas, la cual se traduce fusionada a la proteína de interés, lo que facilita la detección y purificación de la proteína objetivo. El pET28 también contiene un *cassette* de resistencia a kanamicina, la cual permite subclonar genes que provienen de otros vectores resistentes a ampicilina (pET System Manual, 1992)

Los fragmentos correspondientes de los genes de interés se liberaron de los plásmidos pJET en los que estaban clonados mediante la digestión con enzimas de restricción CS (*NdeI* y *HindIII*) y SAT (*NheI* y *XhoI*). Los fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Las bandas de interés se cortaron del gel y DNA se extrajo el DNA mediante el kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* de Promega.

Para la ligación al vector de expresión pET28a, éste se digirió previamente con las enzimas de restricción de los extremos 5' y 3' seleccionadas para cada gen. Para ligación, en un microtubo estéril de 1.5 mL se adicionaron los componentes que se indican en la tabla 6.

Tabla 6. Componentes de la mezcla de ligación de los fragmentos de interés al pET28a.

Componentes	
Agua libre de nucleasas:	1.5 μ L
Plásmido pET28a	10 μ L
Gen: SAT / CS	10 μ L
Buffer:	2.5 μ L
Enzima DNA polimerasa T4:	1 μ L

La reacción se incubó a 16 °C toda la noche en un baño de agua. Al día siguiente la reacción de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* Top10, siguiendo la técnica descrita en la sección V.2.3, cambiando el antibiótico por kanamicina y se incubó a 37 °C toda la noche para permitir el crecimiento de colonias.

Posteriormente se seleccionaron 5 colonias y se procesaron como en la sección V.2.4 para obtener el DNA plasmídico y después se realizó una doble reacción de restricción como se menciona en el apartado V.2.5.

Secuenciación de los genes de interés

Una vez que se corroboró que los vectores contenían los insertos, se enviaron a secuenciar para confirmar que fueran los genes de interés. La secuenciación de nucleótidos se llevó a cabo en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las secuencias de nucleótidos se alinearon mediante la herramienta de alineamiento MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) con las secuencias de nucleótidos para los genes de interés reportadas en el banco del genoma de *T. cruzi* de las cepa Silvio y CL Brener.

Enzimas recombinantes

Obtención de las enzimas recombinantes SAT y CS

Se seleccionaron los plásmidos verificados de cada gen de interés y se transformaron células de *E. coli* Rosetta (DE3) como se describió en la sección V.2.3. Se purificaron los plásmidos de al menos cinco colonias y se verificó por

análisis de restricción tal como se describió en la sección V.2.5, que las bacterias contuvieran al plásmido con los genes de interés.

Una vez confirmado lo anterior, se procedió a realizar la inducción de la sobreexpresión de las proteínas. Las colonias transformantes se crecieron en 5 mL de medio LB + 0.15 ng/ μ L de kanamicina a 37°C durante 4 horas; posteriormente se indujo la expresión con 0.4 mM de IPTG a 25°C y 16 °C toda la noche. En paralelo se trató de la misma manera un cultivo de células de *E. coli* Rosetta (DE3) sin transformar. Al día siguiente, las proteínas de una alícuota de cada cultivo se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). En las colonias que contenían la proteína sobreexpresada se visualizó una sola banda con una masa molecular aproximada a lo predicho (~ 36 kDa CS y ~ 40 kDa SAT). Se seleccionó una clona para cada proteína de interés.

Para purificar las proteínas, se creció un preinóculo de 5 mL de medio LB + 0.15 ng/ μ L de kanamicina y una asada de bacterias *E. coli* cepa Rosetta (DE3) que contienen el vector pET28a y el gen de interés. Se incubó en agitación toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se suplementaron 500 mL de medio LB + 15 ng/ μ L de kanamicina con los 5 mL del preinóculo, y se incubó en agitación durante 4 horas a 37 °C. Posteriormente, se les agregó 0.2 mM de isopropiltiogalactósido (IPTG) y se incubó a 16°C para el caso de la SAT y 25 °C para la CS. El cultivo se dejó incubando en agitación toda la noche.

Las células se recuperaron por centrifugación a 5,000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 10 mL de buffer de Lisis (0.3 M de NaCl, 10% de trietanolamina y 0.002% de imidazol). La suspensión se vertió en un tubo de plástico para el proceso de sonicación, para lo cual se utilizó un sonicador Branson Sonifier 450 cuyo vástago se enfrió previamente en un baño con hielo por 10 min. El tubo que contenía la muestra se colocó en una cama de hielo y posteriormente en la cámara de sonicación con el vástago tocando la suspensión de células. Se sonicó por 5 min a una intensidad de salida del 15% con el siguiente protocolo: 1 min sonicación, 1 min se enfría la muestra en un baño con hielo, y así

sucesivamente hasta concluir los 5 min. El lisado celular se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min. Posteriormente, el sobrenadante se vació cuidadosamente en una resina acoplada a cobalto (Talon Metal Affinity Resin, Clontech) la cual previamente se había lavado y equilibrado con buffer de lisis. Se incubó por 1 hora en una plataforma agitadora. Después se centrifugó la resina a 2,500 rpm por 5 min y se separó y guardó el sobrenadante (*flow through*). Se realizaron lavados a la resina: se agregaron 10 mL de buffer de lisis que contenía 2 mM de imidazol, se incubó por 10 min y se centrifugó a 2,500 rpm por 5 min; este proceso se repitió dos veces más excepto que para el último lavado, el eluido se descartó y se agregaron 10 mL de buffer de lisis, se incubó por 10 min y la resina se vació en una columna de decantación. La resina empacada se lavó con 10 mL de buffer de lisis que contenía 10 mM de imidazol. Finalmente, la proteína se eluyó con 10 mL de buffer de lisis conteniendo 100 mM de imidazol. Para concentrar la proteína, el eluato se colocó en un amicon *Ultra-15 Millipore* de 30 kDa y se centrifugó a 3,500 rpm durante 45 min. Se recolectó la enzima purificada y concentrada en un microtubo de 1.5 mL y se guardó con glicerol, en un volumen 1:1.

Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Lowry (Fernández y Galván, 2004)). Para usar este método se tiene que eliminar el imidazol de la muestra ya que interfiere con el ensayo, por lo que las proteínas se tienen que precipitar previo a la determinación. En un microtubo de 1.5 mL se agregaron 20, 30 y 40 μ L de enzima purificada, agua Milli-Q para completar 40 μ L y 8 μ L de ácido tricloacético (TCA) a una concentración final del 13%. Se homogenizó y se guardó a 4 °C toda la noche. Se centrifugaron las muestras a máxima velocidad por 10 min, se retiró el sobrenadante cuidadosamente con una jeringa de 1 mL y se dejó secar por 10 min aproximadamente, a 37°C. Después se agregó a cada tubo 100 μ L de solución A de Lowry (ver abajo) y la pastilla se resuspendió.

También se requiere una curva patrón de proteína, la cual sirve como referencia para conocer la cantidad exacta de proteína que tenemos en la muestra problema. Se utilizó una solución de albumina sérica bovina (BSA) preparada a una

concentración de 1 mg/mL. En 7 tubos de ensaye se agregaron diferentes cantidades de albúmina (0, 5, 10, 20, 40, 60 y 80 μg) y agua para completar 100 μL de solución

Se prepararon las soluciones del método de Lowry:

Solución A: 2% de Na_2CO_3 , 0.4% de NaOH , 0.16% de $\text{C}_4\text{O}_6\text{H}_4\text{KNa}$ y 1% de SDS en agua destilada

Solución B: CuSO_4 al 1%

Solución C: 0.5 partes de CuSO_4 y 0.5 partes de solución A.

Se agregó a cada una de las muestras 1 mL de solución C y se agitó vorticialmente inmediatamente, este proceso se llevó a cabo con un intervalo de 15 seg entre cada muestra. Posteriormente se dejó incubando cada muestra durante 10 min exactamente y enseguida se agregaron 100 μL de solución de Folin (preparada 1:2 con agua) y se agitó en Vortex. Se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min exactos. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro *Cary UV-Vis*. Para determinar la concentración, se construyó la gráfica de absorbancia *versus* concentración de BSA y se interpoló la absorbancia de las muestras problema.

Caracterización cinética de las enzimas

Determinación de la actividad de la SAT

Para medir la actividad de la SAT se utilizó un ensayo espectrofotométrico que monitorea la liberación del grupo tiol de la acetil-CoA haciéndolo reaccionar con el ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) ó DTNB. Este es un reactivo utilizado para cuantificar la concentración de grupos tiol en una muestra. El anión tiol de la coenzima A liberada (RS^-) reacciona con el reactivo de Ellman (DTNB_2^-), para producir 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB_2^-) y un disulfuro (CoA-S-TNB^-). El TNB_2^- liberado le da un color amarillo a la reacción y es el anión monitoreado a 470 nm. Este anión tiene un alto coeficiente de absorción molar y absorbe a 412 nm; sin embargo, en el ensayo de la CS no se puede medir bajo esa longitud de onda

debido a que la acetil-CoA presentó una absorbancia, lo que interfiere con el ensayo. Es por eso que se realizó un espectro de absorción de una mezcla de reacción que contenía 0.1 mM de DTNB y 4 concentraciones de Cys distintas, obteniendo picos de absorbancia a 412, 450 y 470 nm, longitudes de onda a las cuales el TNB₂⁻ presenta un pico de absorción molar. Los coeficientes de extinción molar a 450 y 470 nm se calcularon a partir de la ecuación de Lambert & Beer ($UA = CL\epsilon$: donde UA son unidades de absorbancia de la muestra, C es la concentración de la muestra, L longitud de la celda que contiene la dilución de la sustancia expresada en cm y ϵ es el coeficiente de extinción molar de la muestra). También se tomó el coeficiente de extinción molar reportado a 412nm ϵ_{412nm} de $13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Para determinar la actividad de SAT se monitoreó el aumento en la absorbancia a 470 nm (A_{470}). La mezcla de reacción para el ensayo contenía Hepes 40 mM pH 7.4, DTNB 0.1 mM, acetil-CoA 0.1 mM, L-serina 2.4 mM y solución enzimática. Se expresó como 1 TNB₂⁻ liberado es igual a 1 nmol de OAS sintetizado. Para determinar las K_m por los sustratos, se varió uno de ellos y se trató de mantener el cosustrato a concentraciones saturantes cuando era posible

Actividad de la CS

Para determinar la actividad de la CS se realizó un ensayo a punto final que consistió en una prueba colorimétrica a base de ninhidrina que derivatiza a la cisteína de acuerdo con el protocolo reportado por Gaitonde (1967). La ninhidrina es un reactivo que reacciona con los α -aminoácidos como cisteína, prolina, etc. dando una coloración rosa-morado en una solución con pH 5 o más alto, y un coeficiente de extinción molar de 21.6×10^6 a 562 nm para el caso de la cisteína (Gaitonde, 1967).

Lo primero que se realizó fue cuantificar con DTNB un *stock* de cisteína preparado a una concentración de 500 μM . Se utilizó buffer de fosfatos pH 7.4 con 0.1 mM de DTNB y distintas concentraciones de cisteína (0-80 nmoles) en un volumen final de 1 mL. Se midió la absorbancia a 412 nm y se determinó la

concentración real del *stock* de cisteína. Para calcular la concentración real del *stock* de cisteína, se graficaron las absorbancias vs el volumen en microlitros de Cys agregada por cada tubo, con estos datos se obtuvo una pendiente con unidades UA/ μ L. Posteriormente se utilizó la ecuación de Lamber-Beer ($UA=C\ell\epsilon$), se despejó la concentración, es decir: $C= UA/\ell\epsilon$, donde UA= a la pendiente; $\epsilon=13.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\ell=1\text{ cm}$.

Una vez cuantificado el *stock* de cisteína se procedió a realizar una curva patrón de cisteína determinada por el método de Gaitonde que utiliza el reactivo de ninhidrina. Este reactivo se preparó con 250 mg de ninhidrina disueltos en una mezcla de 6 mL de ácido acético y 4 mL de HCl concentrado; se mezcló a temperatura ambiente y se preparó fresco justo antes del ensayo ya que es estable de 20 a 30 min. Distintos nmoles de la cisteína cuantificada (0-200 nmoles) se diluyeron en buffer Hepes 40 mM pH 7.4 en un volumen final de 0.5 mL en tubos de vidrio. Posteriormente, se le agregaron 0.5 mL de ácido acético y 0.5 mL de reactivo ácido de ninhidrina, dando un volumen final por reacción de 1.5 mL. Los tubos de vidrio se cubrieron con aluminio y las muestras se calentaron en un baño de agua hirviendo por 10 min. Luego se enfriaron rápidamente en agua del grifo y se midió la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro.

El ensayo de actividad de CS se realizó en una mezcla de reacción que contenía Hepes 40 mM pH 7.4, oxígeno-acetilserina (OAS) 8 mM, sulfuro de sodio 8 mM y enzima en un volumen final de 100 μ L. La reacción comenzó por la adición de la enzima CS, se incubó durante 10 min en un baño de agua a 37°C. Al término de la incubación se añadió ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final del 6% para detener la formación de cisteína. Se agregaron 400 μ L más de buffer Hepes 40mM y se trató de la misma manera que la curva patrón de cisteína siguiendo el método de Gaitonde.

Para determinar los parámetros cinéticos de afinidad por los sustratos, se varió uno de los sustratos y el cosustrato se trató de mantener constante y saturante cuando fue posible.

RESULTADOS

Obtención de los genes de la SAT y CS

Extracción y cuantificación de DNA

Se purificó el DNA a partir de un cultivo de epimastigotes a 200×10^6 par/mL DNA. De la muestra obtenida en un volumen de 35 μ L, se cuantificaron 5 μ L disueltos en 1 mL de agua, DNA por espectrofotometría a 260 y 280 nm y se obtuvieron los siguientes valores de absorbancia:

Tabla 7. Lecturas espectrofotométricas del DNA

Absorbancia a 260 nm (UA)	Absorbancia a 280 nm (UA)	Pureza
0.0411	0.0219	1.97

Al realizar la división entre la lectura obtenida a 260 nm y 280 nm, se obtuvo un valor de 1.97, lo que indica que la muestra es bastante pura.

Para conocer la concentración de DNA de la muestra obtenida, lo primero que se realizó fue sacar una relación entre las unidades de absorbancia con la concentración de la muestra. Para ello, se multiplicó el valor de la absorbancia de DNA obtenida a 260 nm por 50 μ g/ mL, el cual es el valor teórico de la concentración de DNA en 1 unidad de absorbancia, es decir, si 1 UA= 50 μ g/mL en 0.0411 UA hay $(50 \mu\text{g/mL} * 0.0411 \text{ UA}) / 1\text{UAbs}) = 2.06 \mu\text{g/mL}$. El valor obtenido corresponde a la concentración real de la muestra en una celda del espectrofotómetro, por lo que el valor se multiplica por 400, que corresponde a las veces de dilución, dando un valor total del *stock* de 824 μ g/ML.

Para verificar la integridad del DNA obtenido, se tomaron 5 μ L de la muestra y se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y se tiñó con bromuro de etidio para visualizarlo mediante luz UV, como se muestra en la fig. 12.

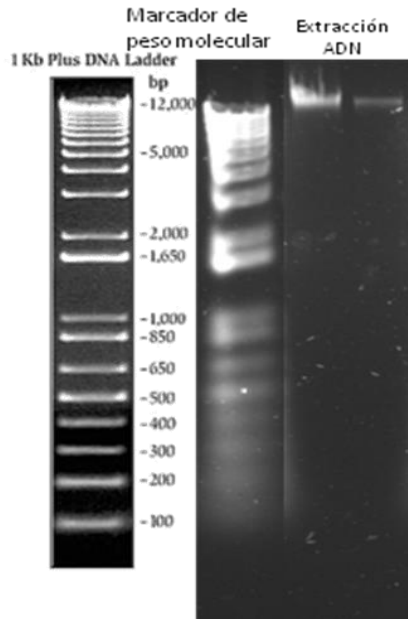


Figura 12. Purificación del DNA genómico de *T. cruzi*. Marcador de peso molecular; 1-2 muestras de DNA

Amplificación de los fragmentos de DNA

Se amplificaron fragmentos de DNA que contuvieran los genes que codifican para la SAT y CS utilizando como templado el DNA genómico de *T. cruzi* purificado y las secuencias de cebadores específicos para cada gen. Se evaluaron diferentes condiciones de amplificación de los genes de interés, variando diferentes temperaturas de alineamiento de los cebadores (50°C, 55°C y 60°C). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa, se tiñeron con bromuro de etidio y se revelaron en un transiluminador de luz UV (fig. 13 y fig. 14).

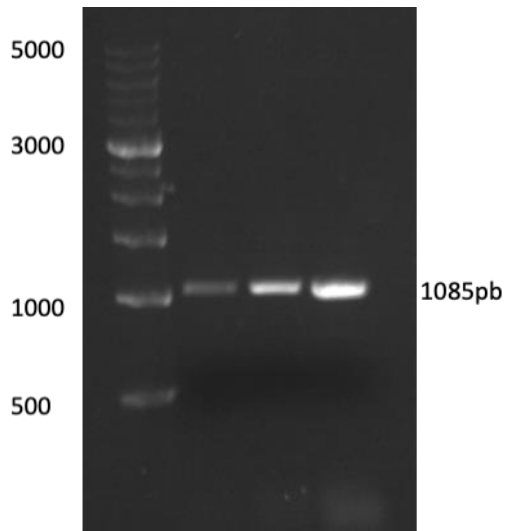


Figura 13. Producto de PCR gen SAT.
 Marcador de peso molecular (izquierda).
 Carriles 2-4 bandas de 1085 pb, a diferentes
 temperaturas de alineamiento.

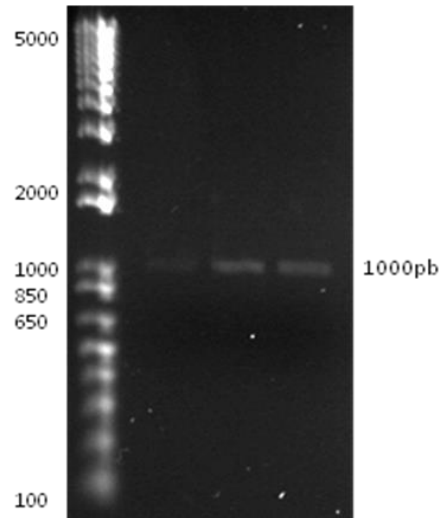


Figura 14. Producto de PCR gen CS
 Marcador de peso molecular (izquierda).
 Carriles 2-4 bandas de 1000 pb, a
 diferentes temperaturas de alineamiento.

En la figura 13, las bandas en los carriles siguientes al marcador tienen un peso de 1085 pb que es el tamaño esperado que corresponde el gen que codifica para de la SAT. Se observa una mayor cantidad de producto en la temperatura de 60 °C con pocas bandas contaminantes. En la figura 14, se muestra fragmentos del gen que codifica para la CS de 1000 pb. La amplificación se vió en menor cantidad que en la de la SAT, sin embargo, no se observaron bandas contaminantes. Las temperaturas óptimas de amplificación son 55°C para la SAT y 60°C.

Clonación de los genes que codifican a SAT y CS en pJET

Las bandas amplificadas que corresponden al tamaño esperado de los genes se cortaron del gel de agarosa, se purificó el DNA mediante un kit de extracción y los fragmentos se clonaron en el vector para productos de PCR pJET 1.2/blunt. Los plásmidos con los insertos ligados se utilizaron para transformar células *E. coli* Top10. Se seleccionaron al azar 5 colonias resistentes a ampicilina de cada gen. Se obtuvo el DNA plasmídico y se analizó el patrón de restricción de acuerdo a los genes de interés. Se realizaron dobles digestiones para liberar el inserto del vector y corroborar que los insertos correspondieran al tamaño esperado para cada uno

de los genes. Para el caso de la SAT se utilizaron las enzimas *NheI* y *XhoI* y para CS se utilizaron *NdeI* y *HindIII*.

En la figura 15 se muestra la electroforesis que corresponde a las colonias que contienen al gen de la SAT, en los carriles marcados del 1-5 se pueden observar las dobles digestiones con *NheI* y *XhoI*, que dan como resultado que las clonas 1, 3 y 4 presentan dos bandas bien definidas, una en 3000 pb aproximadamente que corresponde al vector pJET y otra en 1085 pb que corresponde al tamaño esperado del gen. En el caso de la clona 2 solo se muestra el vector linealizado sin el fragmento de interés. En la clona 5 se muestran 3 bandas, una por arriba del vector pJET, que puede ser plásmido sin digerir, otra banda en 3000 pb correspondiente al vector y otra banda en 1085 pb del tamaño esperado para el gen de la SAT.

En la figura 16 se muestra la electroforesis que corresponde a las colonias que contienen al gen de la CS, en los carriles marcados del 1-5 se pueden observar las dobles digestiones con *NdeI* y *HindIII*, que dan como resultado que todas las clonas presentan dos bandas bien definidas, una banda en 3000 pb aproximadamente que corresponde al vector pJET y otra en 1000 pb que corresponde al tamaño esperado del gen. *HindIII* corta al vector dando como

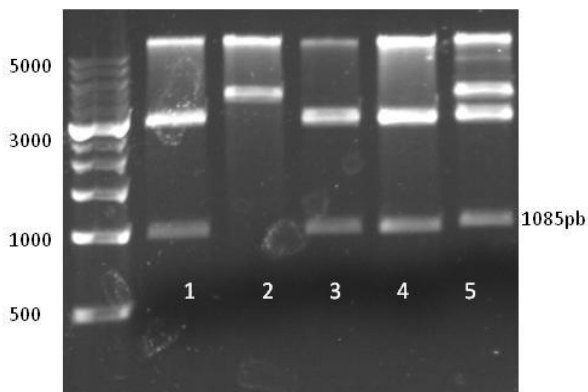


Figura 15. Liberación del gen SAT. Marcador de peso molecular (izquierda). Carriles 1-5 doble digestión con las enzimas ***NheI*** y ***XhoI***

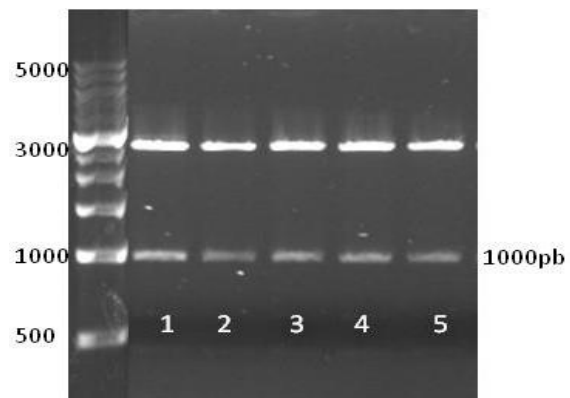


Figura 16. Liberación del gen CS. Marcador de peso molecular (izquierda). Carriles 1-5 doble digestión con las enzimas ***NdeI*** y ***HindIII***

Se seleccionó la colonia 4 para el caso de la SAT y la colonia 1 para la CS ya que las cinco clonas analizadas para cada gen tuvieron únicamente dos bandas bien definidas, una correspondiente al vector pJET y la otra al fragmento de interés. Se realizó una triple digestión a cada una de ellas con las enzimas correspondientes que liberan al inserto del vector que se utilizaron en la doble digestión y una tercera enzima que corta internamente a cada uno de los genes de interés. Para el caso de la SAT se utilizaron las enzimas *NheI*, *XhoI* y *HindIII*; para CS se utilizaron *NdeI*, *HindIII* y *PstI*. El resultado se muestra en las figuras 17 y 18 (que no veo).

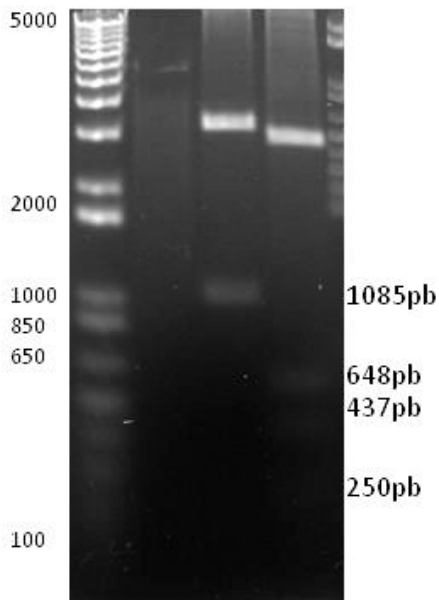


Figura 17. Patrón de restricción del gen SAT. Marcador de peso molecular (izquierda). Carril vacío. Doble digestión con las enzimas *NheI* y *XhoI*. Triple digestión con las enzimas *NheI*, *XhoI* y *HindIII*.

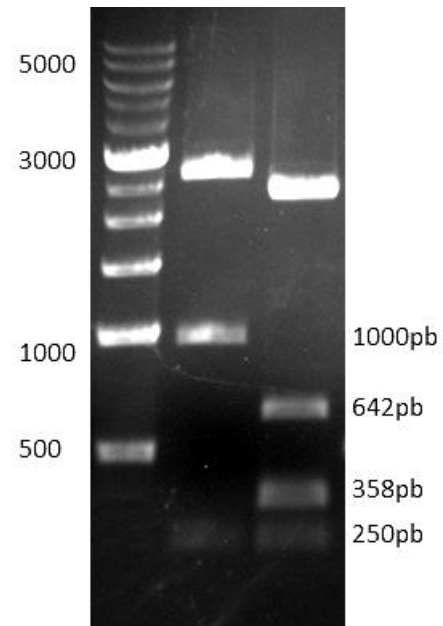


Figura 18. Patrón de restricción del gen CS. Marcador de peso molecular (izquierda). Doble digestión con las enzimas *NdeI* y *HindIII*. Triple digestión con las enzimas *NdeI*, *HindIII* y *PstI*.

En la figura 17 que corresponde a la colonia transformante que contiene el fragmento que codifica para el gen de la SAT, en el tercer carril se puede observar una doble digestión con *NheI* y *XhoI*, dando como resultado las dos bandas, la del vector pJET y la de 1085 pb del fragmento de la SAT. En el siguiente carril se observa una triple digestión con *NheI*, *XhoI* y *HindIII*. Desaparece la banda del fragmento de la SAT ya que *HindIII* corta al gen internamente dando como

resultado una banda de 650 y otra de 440 pb aproximadamente. *HindIII* también corta al vector y da una banda de 250 pb por lo que el tamaño del vector se reduce apareciendo en el gel un poco más abajo de 3000pb.

En la figura 18 correspondiente a la colonia transformante que contiene el fragmento para el gen de la CS, se puede observar primero la doble digestión con *NdeI* y *HindIII*, dando como resultado las dos bandas del pJET (de peso molecular menor a 3000 pb y la de 250 pb) y otra en 1085 pb que corresponde al tamaño esperado del fragmento de la CS. En el siguiente carril se observa una triple digestión con *NdeI*, *HindII* y *PstI*. *PstI* corta internamente al gen de CS, dando como resultado una banda de 650 y otra de 360 pb aproximadamente. Los resultados de estos patrones de restricción sugerían fuertemente que las colonias transformantes seleccionadas para cada gen contenían al fragmento de interés dentro del vector pJET.

Clonación de los genes de la SAT y CS en pET28

Los plásmidos pJET conteniendo los amplificadores de los genes de interés se cortaron con las enzimas de restricción, se separaron los fragmentos por electroforesis en geles de agarosa, se cortaron las bandas de los fragmentos de los genes y se purificaron. De la misma manera, el plásmido de sobreexpresión pET28 se digirió con las mismas enzimas de restricción, se desfosforiló y purificó como se describió en metodología. Se ligaron los fragmentos de DNA de los genes de interés al pET28 y las mezclas de ligación se utilizaron para transformar células *E. coli* Top10. De las colonias transformantes y resistentes a kanamicina, se seleccionaron al azar cinco de cada gen. Se obtuvo el DNA plasmídico de cada una de ellas para analizar el patrón de restricción de dobles digestiones de acuerdo con la secuencia de nucleótidos de los genes de interés.

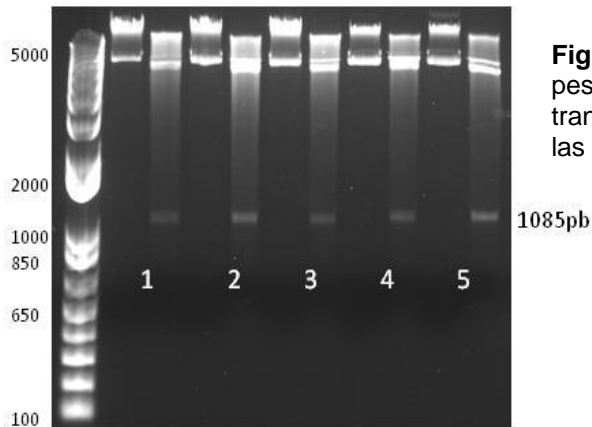


Figura 19. Liberación del gen SAT. Marcador de peso molecular (izquierda). Colonias de transformantes digeridas y con doble digestión con las enzimas *NheI* y *XhoI*

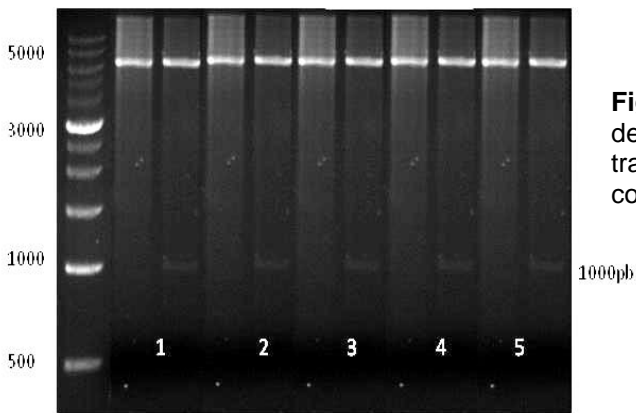


Figura 20. Liberación del gen CS. Marcador de peso molecular (izquierda). Colonias de transformantes digeridas y con doble digestión con las enzimas *NdeI* y *HindIII*

La figura 19 corresponde al DNA obtenido de cinco colonias transformadas con el plásmido que contiene al gen de la SAT, de cada par de carriles el primero corresponde al plásmido sin digerir y el siguiente corresponde a las dobles digestiones con las enzimas *NheI* y *XhoI*. Todas las clonas presentan dos bandas bien definidas, una banda en 5000 pb aproximadamente correspondiente al vector pET28a y otra en 1085 pb del tamaño esperado para el fragmento clonado.

En la figura 20 corresponde al pET 28 que contiene al gen de la CS. De igual manera que en el caso anterior, en cada uno de los plásmidos de las colonias transformadas, el primer carril corresponde al plásmido sin digerir y el siguiente corresponde a la doble digestión con las enzimas *NdeI* y *HindIII*. Todas las clonas presentan la banda de aproximadamente 5000 pb correspondiente al vector pET28a y la otra banda de 1000 pb del tamaño esperado para el fragmento clonado. De esta manera se pudo confirmar que los plásmidos tienen clonados los fragmentos amplificados para la SAT y CS.

Secuencia de los genes de la SAT y CS en pET28

Se procedió a determinar la secuencia de nucleótidos de los fragmentos clonados en el vector de expresión. Este procedimiento se realizó en un servicio de secuenciación automática que provee la UNAM. Para confirmar que los insertos presentes en el vector pET28a corresponden a los genes de la SAT y CS, las secuencias de nucleótidos obtenidas se tradujeron a secuencias de aminoácidos mediante un servidor (<https://web.expasy.org/translate/>). Posteriormente las secuencias de aminoácidos se alinearon utilizando el programa MULTALIN con las secuencias ya reportadas en el Genbank para las mismas enzimas, pero otras cepas de *T. cruzi*. En las figuras 21 y 22, se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la SAT y CS de la cepa Querétaro de *T. cruzi* que se obtuvo con las secuencias de aminoácidos de la SAT y CS de la cepa Silvio de *T. cruzi* reportada en Genbank (Talavera, et al. 2012) y con una cepa del parásito aislada del reservorio *Didelphis marsupialis*. Las tres secuencias tienen 100% de similitud. Esto demostró que durante la amplificación no se introdujeron mutaciones y que, a pesar de las diferencias de las cepas, las secuencias están conservadas. Asimismo, se obtuvieron los genes completos de cada enzima.

Figura 21. Alineación de la secuencia en aminoácidos obtenida de la SAT Querétaro con secuencias de cepas CL Brenner y Silvio de *Trypanosoma cruzi*

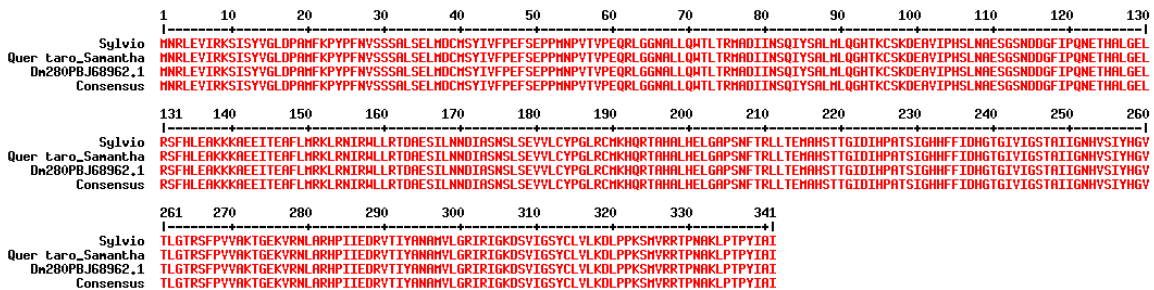
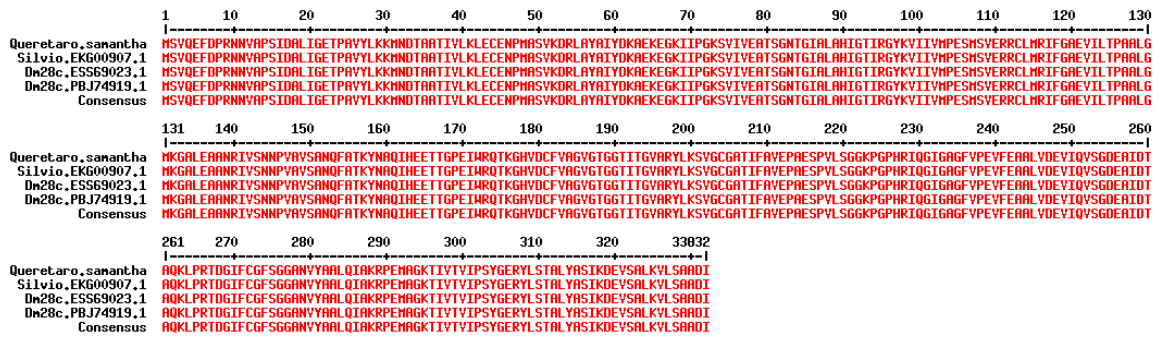


Figura 22. Alineación de la secuencia en aminoácidos obtenida de la CS Querétaro con secuencias de cepas CL Brenner y Silvio de *Trypanosoma cruzi*



Obtención de las enzimas recombinantes

Establecimiento del protocolo de sobreexpresión

Se seleccionaron a las bacterias *E. coli* Rosetta (DE3) para sobreexpresar las proteínas. Las cepas *E. coli* Rosetta (DE3) son derivados de *E. coli* BL21 que contienen codones raramente utilizados por la bacteria, ya que suministran fragmentos de tRNA para codones AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA que sirven una traducción "universal", además de que mejoran la expresión de las proteínas. Estas cepas tienen una copia cromosómica del gen de la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor lacUV5 (VWR, 2020). Se seleccionaron las cepas Rosetta, porque las BL21 no sobreexpresaban las proteínas de interés. Se probaron distintas temperaturas y distintos tiempos de inducción por IPTG, hasta obtener las condiciones adecuadas para cada uno de los genes de interés.

Se utilizó el vector pET28a, que contiene el gen de interés confirmado por secuenciación, para transformar las bacterias Rosetta (DE3) y se seleccionaron en medio LB con kanamicina a 30µg/mL. Se seleccionaron cinco colonias al azar para determinar si sobreexpresaban las proteínas de interés. Se sembraron en medio LB con kanamicina y se indujo la sobreexpresión con IPTG como se describió en la metodología. Se tomaron alícuotas y las proteínas celulares se separaron por electroforesis desnaturalizante en gel de acrilamida (SDS-PAGE) para determinar si expresaban la proteína de interés.

En la figura 23 se observa el SDS-PAGE con las proteínas de una alícuota de un cultivo de células Rosetta sin plásmido de sobreexpresión y los siguientes carriles son 5 transformantes, todas después de un protocolo de inducción de las proteínas recombinantes. De acuerdo a la secuencia de aminoácidos para la SAT, el peso esperado tomando en cuenta la cola de histidinas que el vector pET28a le agrega a la proteína, es de 40 kDa. En las bacterias transformadas con el plásmido conteniendo el gen de SAT se ve una banda más intensa de un peso similar a la proteína de interés en todos los carriles.

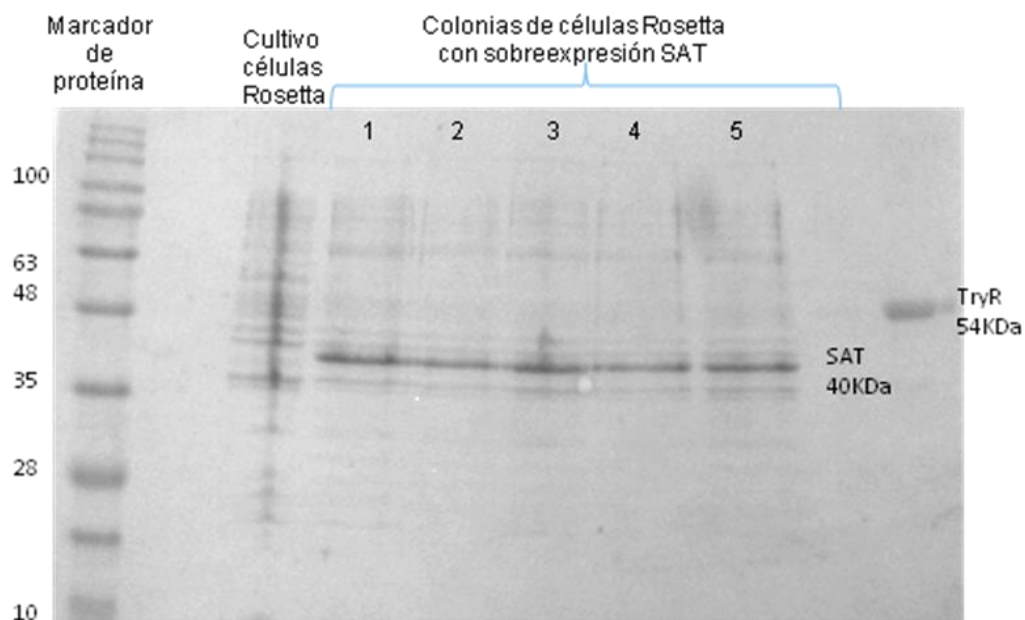


Figura 23. Clonas de *E. coli* Rosetta (DE)3 que sobreexpresan a la SAT. Marcador de peso molecular para proteína (izquierda). SDS_PAGE de proteínas de cultivos de células *E. coli* Rosetta sin el vector y 5 colonias con sobreexpresión de la proteína. TryR es una proteína del peso molecular indicado que sirvió como referencia.

Para el caso de la CS, y de acuerdo con su secuencia de aminoácidos, el peso esperado junto con la cola de histidinas que le agrega a la proteína el vector pET28a, es de 36 kDa. En la figura 24 se observan colonias con una banda más intensa, arriba de 35 kDa que corresponde a la proteína de interés.

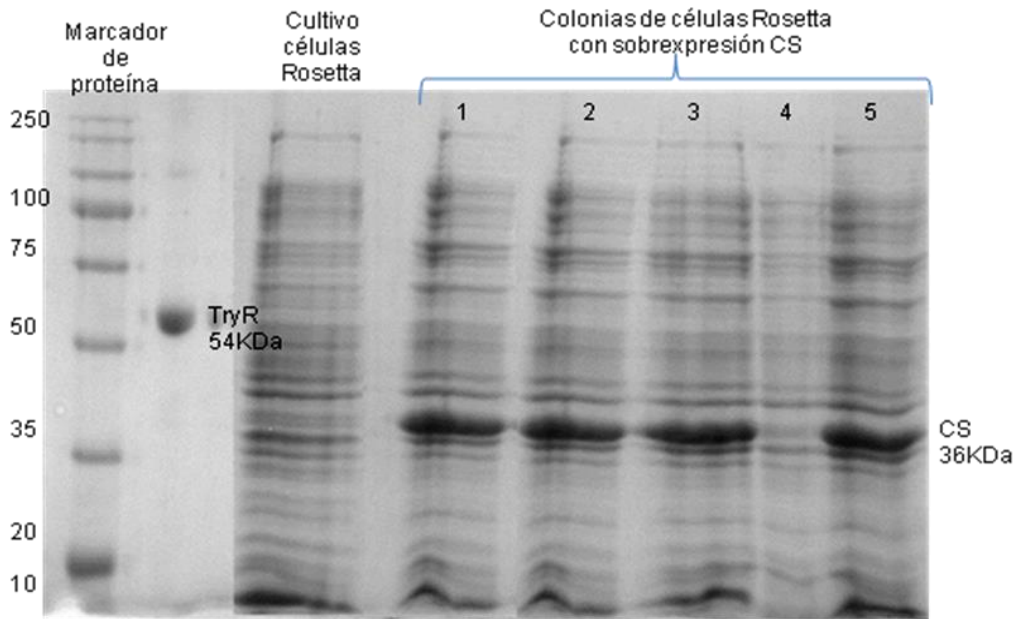


Figura 24. Clonas de *E. coli* Rosetta (DE)3 que sobreexpresan a la CS. Marcador de peso molecular para proteína (izquierda). SDS-PAGE de las proteínas de cultivos de células de *E.coli* Rosetta sin el vector y 5 colonias con sobreexpresión de la proteína. TryR es una proteína del peso molecular indicado que sirvió como referencia.

Una vez que se identificaron las colonias que sobreexpresaban la SAT y la CS, se eligió una colonia por cada gen, y se determinó si la proteína sobreexpresada se encontraba de manera soluble o insoluble. Las bacterias se cultivaron en medio LB líquido siguiendo el protocolo de sobreexpresión descrito en la metodología; posteriormente se cosecharon, sonicaron y el lisado celular se centrifugó para separar la fase soluble y la insoluble. En paralelo, un cultivo de células Rosetta sin el plásmido de sobreexpresión se trató de la misma manera para utilizarse como referencia de sobreexpresión de bandas de proteínas.

En la figura 25 se muestra el resultado para la SAT. La SAT mostro una mejor sobreexpresión a 16°C. En el SDS_PAGE se muestra que los extractos proteicos de las bacterias sobreexpresantes hay una banda de mayor intensidad en el tamaño esperado y la proteína se encuentra principalmente de manera insoluble, apareciendo en el precipitado. Sin embargo, se observa un poco de SAT en la

fracción soluble en comparación con la fracción soluble de la bacteria no sobreexpresante.

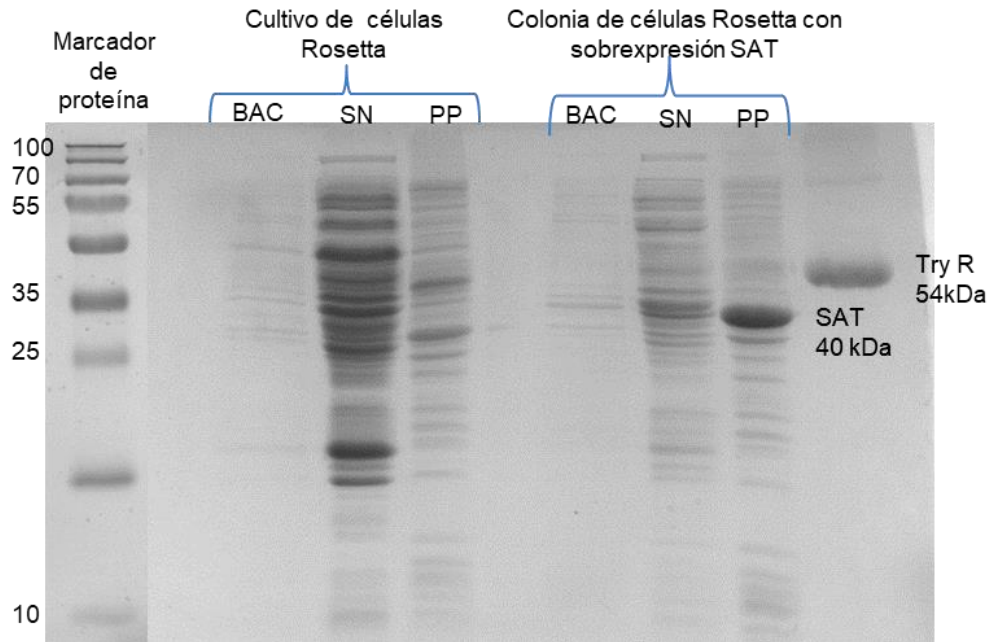


Figura 25. Se muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS_PAGE para determinar de la solubilidad de la SAT sobreexpresada. Marcador de peso molecular para proteína (izquierda). Cultivo de células *E.coli* Rosetta sin el vector y una colonia con sobreexpresión de la proteína. BAC lisado total de bacterias Rosetta (DE3). SN sobrenadante del lisado después de centrifugar. PP precipitado del lisado después de centrifugar.

En la figura 26, se muestran los resultados del SDS-PAGE para los cultivos de células Rosetta sobreexpresantes de CS. Para esta proteína la mejor inducción fue a 25°C. Se observa una banda de mayor intensidad en 36 kDa que corresponde al tamaño esperado para la proteína. Se puede apreciar que la proteína también se encuentra de manera insoluble apareciendo en el precipitado y no se puede distinguir claramente una banda de sobreexpresión en el sobrenadante.

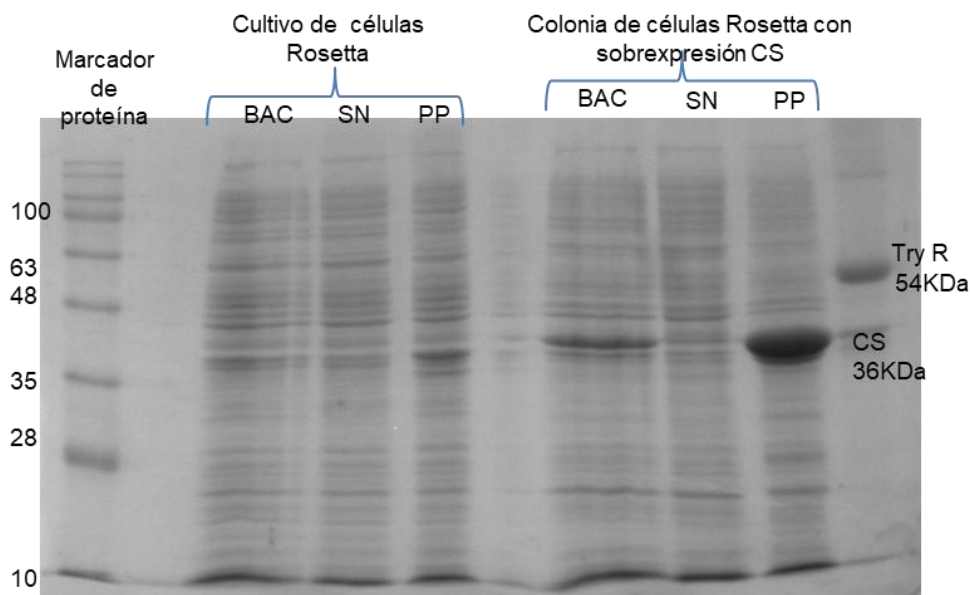


Figura 26. SDS_PAGE para la determinación de la solubilidad de la CS sobreexpresada. Marcador de peso molecular para proteína (izquierda). Cultivo de células E.coli Rosetta sin el vector y una colonia con sobreexpresión de la proteína. BAC lisado total de bacterias Rosetta (DE3). SN, sobrenadante del lisado después de centrifugar y corresponde a las proteínas solubles. PP precipitado del lisado después de centrifugar.

Purificación de las proteínas recombinantes

Una vez que se comprobó la solubilidad de las proteínas, a partir de las fracciones de proteína insoluble se realizó la purificación de las mismas mediante cromatografía de afinidad por metales como se describió en metodología.

En la figura 27 se presenta el SDS-PAGE con la marcha de purificación de la SAT. Se muestra un cultivo de células Rosetta (DE3) sin la sobreexpresión de la enzima que sirve como referencia. En los siguientes carriles están muestras de la colonia con sobreexpresión de SAT y la marcha de purificación. El carril marcado con Bac proviene de una muestra de bacterias cultivadas con sobreexpresión en donde se observa que el nivel de expresión es alto; sin embargo, la mayor parte de la proteína se encuentra de manera insoluble en el precipitado (PP) como se demostró en la sección anterior. FT es la proteína que no se unió a la resina de cobalto. Posteriormente se hicieron 3 lavados con buffer de lisis con 2 mM de imidazol, y en seguida se hizo un lavado con buffer suplementado con 10 mM de imidazol para eliminar contaminantes. Posteriormente se hizo la elución de la

proteína con buffer suplementado con 100 mM imidazol para separar la proteína de la resina. El eluido con la proteína se concentró mediante ultrafiltración. Al final de la purificación, logramos obtener la proteína de SAT con un alto nivel de pureza (>90%), y con un nivel de rendimiento alto, de 200 µg proteína/500 mL de cultivo.

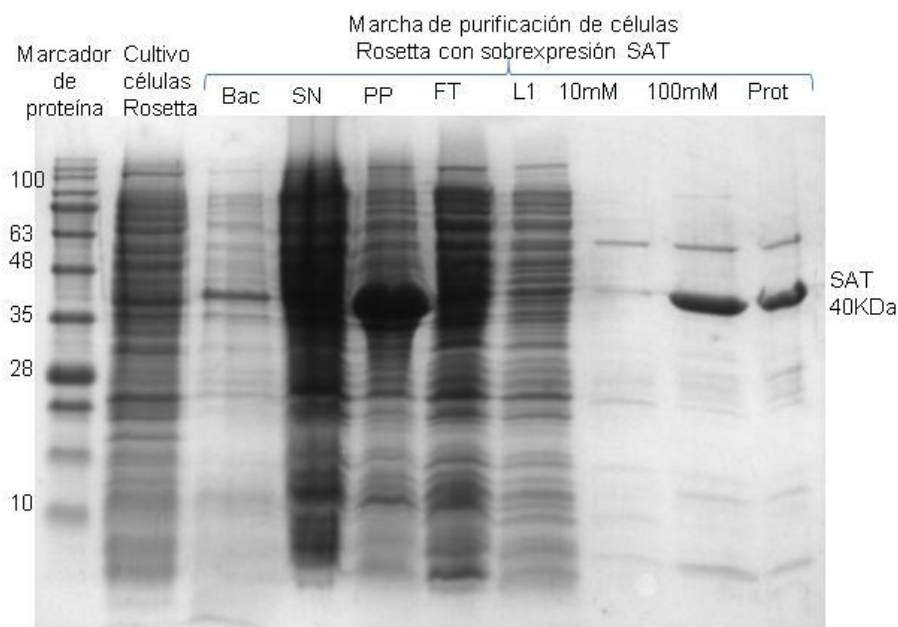


Figura 27. Gel de poliacrilamida y SDS_PAGE con la marcha de purificación de la SAT. Marcador de peso molecular para proteína (izquierda). Cultivo de células Rosetta sin sobreexpresión de la enzima. Bac, bacterias sobrepresantes. SN sobrenadante del lisado después de centrifugar. PP precipitado del lisado después de centrifugar. FT Fracción del sobrenadante que no logró unirse a la resina. L1 primer lavado después de la incubación con buffer con 2 mM imidazol. Fracción del lavado con buffer con 10mM de Imidazol. 100mM, fracción de elución con buffer con 100mM de Imidazol y Prot, enzima SAT purificada.

En la figura 28 se muestra el SDS-PAGE con la marcha de purificación de la CS. El carril marcado con Bac proviene de las bacterias cultivadas con sobreexpresión, el nivel de expresión es bajo. Se observa que la mayor parte de la proteína se encuentra de manera insoluble en el precipitado (PP), debido a que la mayor parte de la proteína se encuentra en la parte insoluble no se puede observar una banda de sobreexpresión en forma soluble (SN). FT es una muestra de la fracción de proteínas que no se unió a la columna. Para esta purificación se hizo un lavado con buffer de corrida suplementado con 10mM de imidazol para eliminar

contaminantes. Las proteínas unidas a la resina se eluyeron con buffer suplementado con 100mM imidazol y se concentraron. El rendimiento fue de 300 μg proteína/ 500mL de cultivo y una pureza >90%.

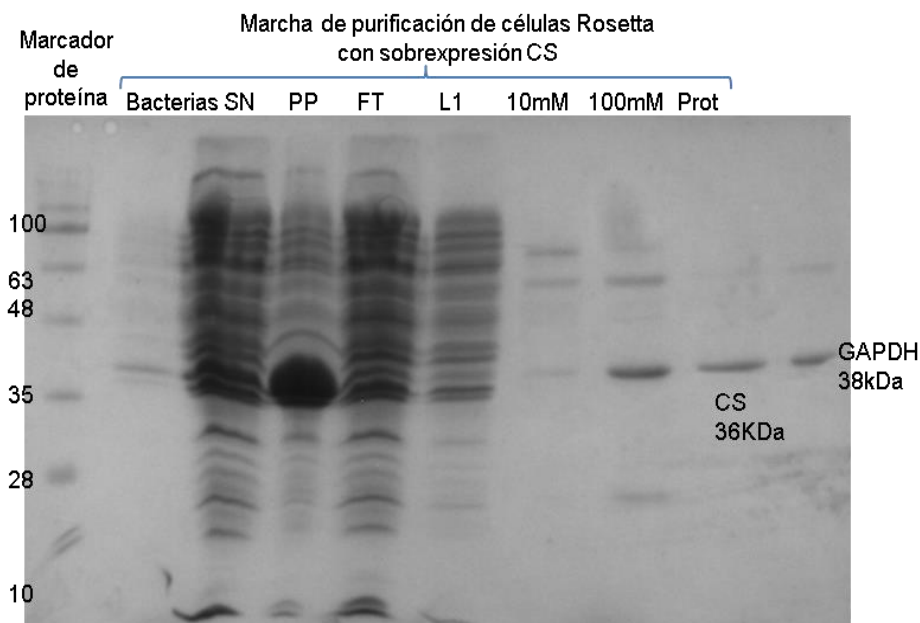


Figura 28. Gel de poliacrilamida con SDS-PAGE con la marcha de purificación de la CS. Marcador de proteína (izquierda). Bac, bacterias sobrexpresantes. SN sobrenadante del lisado después de centrifugar. PP precipitado del lisado después de centrifugar. FT Fracción del sobrenadante que no logró unirse a la resina. L1 primer lavado después de la incubación. 10mM lavado con buffer con 10mM de Imidazol. 100mM, fracción de la elución con buffer con 100mM de Imidazol y Prot, enzima CS purificada. TryR enzima utilizada como marcador de referencia.

En la figura 29, se muestra un SDS-PAGE con las proteínas SAT y CS purificadas.

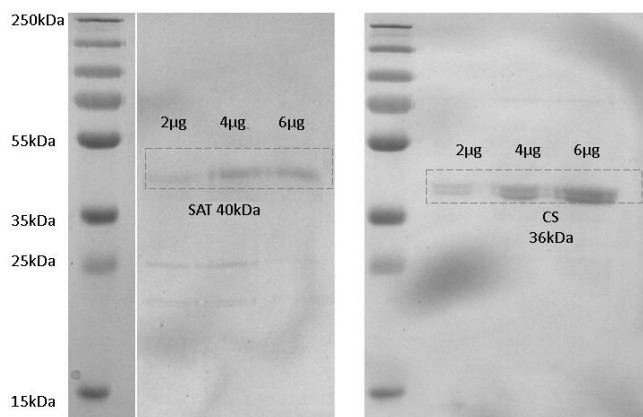


Figura 29. Enzimas SAT y CS purificadas. Marcador de peso molecular de proteína (izquierda). Diferentes cantidades de proteína en microgramos (μg).

El rendimiento de las enzimas purificadas obtenidas de forma recombinante fue alto, por lo que se pudieron utilizar para los ensayos cinéticos que se describen a continuación.

Obtención de los genes de la SAT y CS

Caracterización cinética de la SAT y CS

Una vez que se obtuvieron las enzimas recombinantes con suficiente pureza, se determinaron sus parámetros cinéticos K_m y V_{max} en condiciones fisicoquímicas que asemejan las fisiológicas. Los ensayos cinéticos de actividad se realizaron en buffer de reacción (Hepes 40 mM pH 7.4 + 1 mM de EDTA) a 37°C; estas condiciones son similares al pH del citosol y temperatura de crecimiento de los parásitos en el humano. Las dos enzimas son birreactantes, por lo que los parámetros cinéticos se determinaron variando la concentración de un sustrato mientras que la concentración del cosustrato se trató de mantener a niveles saturantes.

Los datos obtenidos se graficaron con el programa Origin 7.5 y se ajustaron de acuerdo a la ecuación de velocidad que mejor ajusta los datos experimentales.

Cinética de la SAT

Como se describió en la sección de metodología, para determinar la actividad de la SAT ($\text{Ser} + \text{acetil-CoA} = \text{O-acetilSer} + \text{CoA}$) se monitoreó la liberación de la coenzima A producto de la reacción; su grupo tiol se derivatizó con DTNB y se monitoreó espectrofotométricamente el aumento en la absorbancia a 470 nm. Se expresó como 1 mol TNB_2^- producido es igual a 1 mol de OAS sintetizado. Las actividades se expresan como Unidades ($\mu\text{moles}/\text{min}$) / mg de proteína

En la fig. 30 se observa la actividad de la SAT al variar la cantidad de proteína, obteniendo una actividad específica de 4 U/mg prot. Este ensayo sirvió como referencia para determinar el intervalo de proteína en el que el ensayo

enzimático da una velocidad inicial lineal. Se seleccionó 0.4 µg prot para los ensayos.

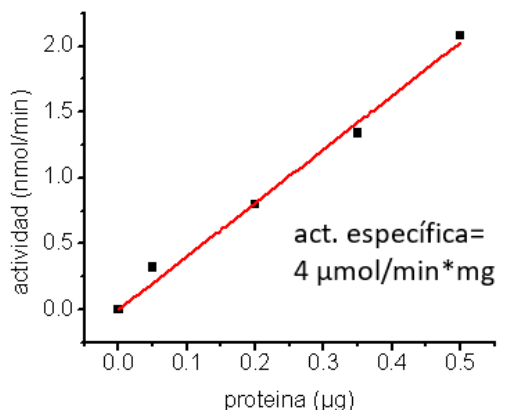


Figura 30. Actividad específica de la SAT. Dependencia de la actividad de la SAT con respecto a la cantidad de proteína.

Para obtener la K_m y V_{max} de la enzima, como se explicó en la metodología, se utilizaron condiciones saturantes de uno de los sustratos y se varió el otro sustrato. Se dice que una enzima se encuentra saturada cuando de acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten la velocidad inicial (v_0) es igual a la V_{max} ; esto se logra teniendo al sustrato en una concentración alta, por esta razón se consideró para los experimentos que una concentración de 10 veces el valor de la K_m es suficiente para mantener a la enzima saturada. Para saber cuál es la concentración a la que se alcanza la saturación, nos basamos en los valores reportados para esta enzima por Nozaki *et. al.*, 2001.

Para el ensayo de titulación de la SAT por acetil-coenzima A se utilizaron 0.4 µg de enzima, 2.5 mM de L-serina, y distintas concentraciones de acetil-coenzima A. Con los datos de velocidad y concentración de sustrato, se realizó un gráfico de Eadie-Scatchard (fig. 31A), el cual indicó que la enzima presenta un comportamiento sigmoidal por acetil-CoA por lo curvado del ajuste. Por lo tanto, los datos de velocidad de la titulación se ajustaron a la ecuación de Hill $v = \frac{V_{max}[S]^n}{K_{0.5} + [S]^n}$, mediante el software Origin 7 (fig. 31B). Los valores que arrojó el ajuste fueron una $V_{max_{rel}}$ de 1.9 ± 0.12 U/mg, una $K_{0.5}$ por acetil-CoA de 2.9 ± 1.8 mM y un valor de cooperatividad n de 1.9 ± 0.4 ($n=6$).

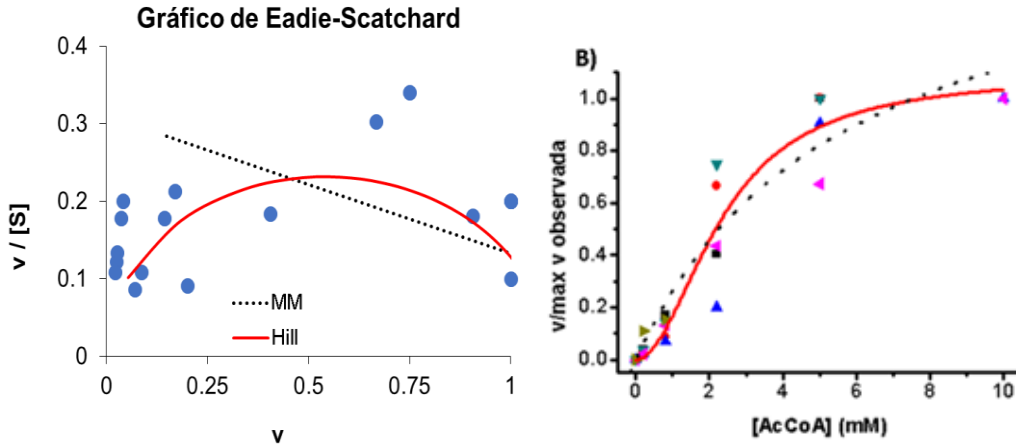


Figura 31. Cinética por acetil-CoA de la SAT. (A) Gráfico de Eadie-Scatchard. (B) Curva de saturación por acetil-CoA

Para la titulación con L-serina se utilizó buffer de reacción, 0.4 μg de enzima, 0.1 mM de acetil-CoA y se varió la concentración de L-serina. Para este ensayo no se pudo utilizar condiciones saturantes de acetil-CoA, porque a mayor concentración el sustrato presenta una absorbancia inicial, lo que podría subestimar los datos, además de lo costoso de este sustrato. La enzima presentó un comportamiento hiperbólico (fig. 32) el cual se ajustó a la ecuación de Michaelis-Menten ($v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$), donde obtuvimos una V_{\max} de $2.1 \pm 1.6 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ y una K_m de $0.34 \pm 0.06 \text{ mM}$ ($n=5$). En la tabla 10 se presenta un resumen de los parámetros cinéticos.

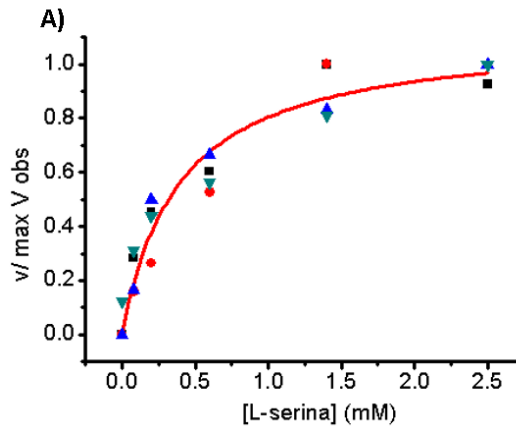


Figura 32. Curva de saturación por L-serina. Titulación con L-serina variando concentraciones de AcCoA.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de la SAT

	Obtenidas pH 7.4 y 37°C	Reportadas* pH 8 y 25°C
<i>V</i> _{max} μmol/min*mg	7.3 ± 3.2	No reportada
<i>K</i> _{0.5} acetil-CoA mM	2.9 ± 1.8	0.92
<i>K</i> _m L- serina mM	0.34 ± 0.06	0.24

* reportada por Nozaki *et. al.* 2001

La *K_m* para acetil-CoA de la SAT obtenida en este trabajo fue 3.1 veces mayor con respecto al valor reportado, mientras que la *K_m* para L-serina no tuvo cambios significativos. Los valores obtenidos se encuentran dentro del mismo orden de magnitud; sin embargo, las diferencias pueden deberse al cambio en las condiciones del ensayo. En lo reportado, la actividad de la SAT se midió monitoreando la disminución de la absorbancia a 232 nm (*A*₂₃₂) debido al rompimiento del enlace tioéster de acetil-coenzima A (CoA) a un pH 8.0 y 25°C. El valor de *V*_{max} de 7.3 ± 3.2 μmol/min*mg que se obtuvo puede estar subestimado ya que la enzima no se encontraba en condiciones saturantes para el acetil-CoA.

Cinética de la CS

La actividad de la CS (OAS + Na₂S = Cys + acetato) se realizó en un ensayo a punto final donde se determinó la producción de Cys mediante su derivatización con ninhidrina por el método de Gaitonde

En la fig. 33 se muestra la actividad de la CS al variar la cantidad de proteína. Obtuvimos una actividad específica de 27 U/mg prot. Igual que en la caracterización de la SAT, con este ensayo logramos que la actividad sea dependiente de la cantidad de proteína, manteniendo la parte lineal de la actividad y de esta manera no subestimando los datos. Además, facilita la obtención de los parámetros cinéticos.

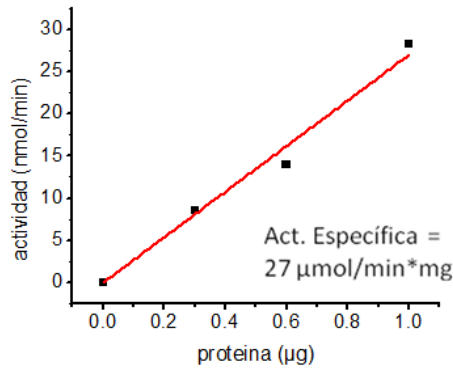


Figura 33. Actividad específica de la CS. Dependencia de la actividad de la CS con respecto a la cantidad de proteína

Para la titulación de la CS por OAS se utilizó buffer de reacción, 0.4 µg de enzima, 8 mM de Na₂S y se varió la concentración de OAS. Con los datos de velocidad y concentración de sustrato se construyó un gráfico de Lineweaver-Burk (fig. 34A). El patrón indica que la enzima tiene un comportamiento hiperbólico a bajas concentraciones de OAS y tiene inhibición mixta por sustrato a altas concentraciones del mismo. Por lo tanto, se realizó el ajuste siguiendo la ecuación de inhibición mixta por sustrato (fig. 34B y 34C) para calcular los parámetros cinéticos de la enzima. Se obtuvo una *V*_{max} *relativa* de 5 U/mg prot, una *K*_s de 10.4 ± 3.3 mM y una *K*_{is} de 111.09 ± 108.6 mM (n= 9).

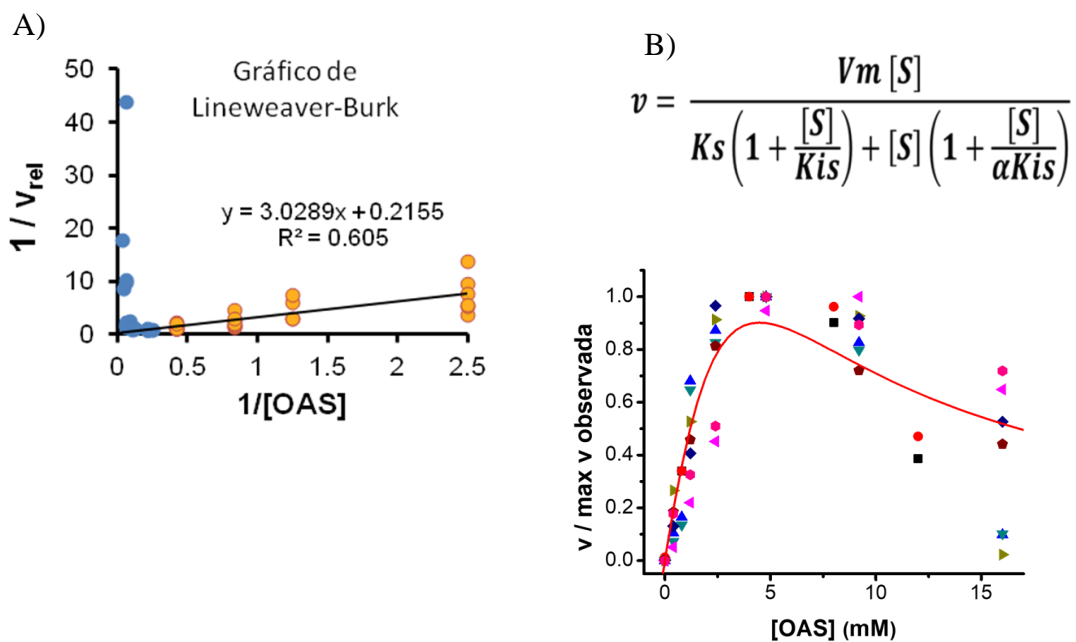


Figura 34. Titulación de CS por OAS. A) Gráfico de Lineweaver-Burk. B) Ecuación de dobles recíprocos. C) Curva de saturación por OAS

La titulación de la CS por Na₂S se realizó en buffer de reacción, 0.4 µg de enzima, 8 mM de OAS y diferentes concentraciones de Na₂S (fig. 35). Para este sustrato la CS presenta un comportamiento hiperbólico, el cual se ajustó a la ecuación de Michaelis-Menten ($v = \frac{V_{max}[S]}{K_m+[S]}$). Se obtuvo una *V*_{max} de 7.9± 2.9 µmol/min*mg y una *K*_m de 9.2±1.8 mM (n=7). En la tabla 11 se presenta un resumen de los parámetros cinéticos obtenidos.

Figura 35. Curva de saturación por Na₂S. Titulación con Na₂S variando concentraciones de OAS

Tabla 9. Parámetros cinéticos de la CS a pH 7.4 y 37°C

	Obtenidos	Reportados*
<i>K</i> _{m_{app}} OAS mM	10.4 ± 3.3	7.8
<i>K</i> _{m_{app}} Na ₂ S mM	9.2 ± 1.8	8.2
<i>V</i> _{max} µmol/min*mg	7.9 ± 2.9	307

* reportada por Marciano *et al.*, 2012

Los valores de afinidades obtenidos se compararon con lo ya reportado para el mismo microorganismo por Marciano *et al.* 2012. Los cambios no fueron significativos ya que se encuentra dentro del mismo orden de magnitud. Sin embargo, el valor de *V*_{max} fue 2 órdenes de magnitud menores, comparado con lo ya reportado. Esto puede deberse a que no saturamos nuestra enzima con OAS, debido a su inhibición por sustrato. Haciendo el análisis de las condiciones experimentales que Marciano *et al.* utilizaron, se puede notar que, tampoco lograron llegar a la saturación, lo que implica que los valores que reportan pueden estar subestimados.

DISCUSIÓN GENERAL

La cisteína es uno de los componentes esenciales para la síntesis de T(SH)₂. Anteriormente se demostró que es un metabolito limitante para la vía de síntesis y, por lo tanto, puede ser considerado como un intermediario clave para su metabolismo redox en la defensa contra el estrés oxidante al que el parásito se ve sometido durante su ciclo de vida. Por otro lado, al ser un aminoácido que contiene azufre, se sabe que es esencial para la síntesis de metabolitos importantes, así como para la síntesis de proteínas y otras moléculas como cofactores enzimáticos, además de participar activamente en diversas vías metabólicas.

T. cruzi presenta tres vías por las cuales puede obtener cisteína, se espera que estas vías se encuentren activas en el parásito y participen a lo largo de su ciclo de vida; las vías son:

(1) el transporte del medio extracelular. Este transporte ha sido poco estudiado en *T. cruzi* y se sugiere que es de baja afinidad para la absorción de cisteína (Canepa *et al.*, 2009),

(2) la vía de transulfuración, en la que participan las enzimas CBS y CGL (Williams *et al.*, 2009; Nozaki *et al.*, 2001), las cuales se encuentran presentes en los estadios de epimastigote y tripomastigote

(3) la vía de síntesis *de novo*. Esta vía se encuentra presente en amastigotes, en este estadio se encuentra mayor sobreexpresión de la enzima CS y por tanto su actividad es importante para la síntesis de Cys (Marciano *et al.* 2012). En este estadio intracelular la principal fuente de carbono es la OAS, de manera que es de suma importancia la participación de la SAT para generar al precursor.

Esta tesis se enfocó a la caracterización bioquímica de la SAT y de la CS, para aportar datos cinéticos y metabólicos sobre la biosíntesis *de novo* de cisteína en el parásito. Las enzimas que participan en esta vía se obtuvieron de forma recombinante y se caracterizaron bioquímicamente.

La actividad de la SAT es de 7.3 ± 3.2 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de prot, $K_{m_{app}}$ por L-serina de 0.34 ± 0.06 mM y $K_{0.5}$ por acetil-CoA de 2.9 ± 1.8 mM. La enzima presenta un valor alto de K_m , lo que quiere decir que tiene poca afinidad por la acetil-CoA. Sin embargo, los valores pueden estar subestimados por los inconvenientes del ensayo ya que la absorbancia del acetil-CoA tiene una basal muy alta.

Para el caso de la CS, la enzima tuvo una velocidad de 7.9 ± 2.9 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, mostró una $K_{m_{app}}$ por Na_2S de 9.2 ± 1.8 mM y para la OAS K_m 10.4 ± 3.3 mM. La velocidad de esta enzima puede estar subestimada debido a que no se llegó a las condiciones saturantes de los sustratos. Asimismo, la enzima parece tener poca afinidad por sus sustratos

El hecho de que ambas enzimas tengan baja afinidad por sus sustratos puede sugerir que se encuentran poco activas dentro de los parásitos, o que solo se utilicen en alguna fase de su ciclo de vida, donde la cisteína no se encuentre disponible y tengan que generarla *de novo*. Se tiene reportado que la CS tiene una eficiencia catalítica 60 veces mayor respecto a la CBS de este parásito (Nozaki *et al.*, 2001), por lo que se sugiere que la síntesis *de novo* es esencial para el parásito y las enzimas que en ella participan podrían ser blancos potenciales para el diseño de nuevos fármacos.

CONCLUSIÓN

No se pudo utilizar condiciones saturantes de los sustratos para ambas enzimas debido a lo costoso de algunos de los sustratos. Se requiere cambiar el ensayo enzimático en volúmenes menores para hacerlo más costeable. Asimismo, se requiere modificar los protocolos del ensayo enzimático para determinar la actividad de estas enzimas en extractos citosólicos del parásito, con el fin de determinar el contenido real de enzima activa, lo que a su vez permitirá medir las concentraciones de los metabolitos en los parásitos utilizando las enzimas recombinantes.

Con estos análisis se podrá identificar la eficiencia de estas enzimas sobre la síntesis de T(SH)₂ (Olin *et al.* 2012; González *et al.* 2015). Los parámetros obtenidos *in vitro* en condiciones que asemejan el pH intracelular y la temperatura de crecimiento del tripomastigote y amastigote, así como los que se generarán en extractos de parásitos, se incorporarán a un modelo computacional de la vía antioxidante que se construyó en el laboratorio para determinar el grado de control de estas enzimas.

PERSPECTIVAS

Estos datos podrían servir como referencia para medir las enzimas en extractos de *T. cruzi* y de esta manera poder dilucidar una mejor velocidad de cada una de estas enzimas en la vía, tomando en cuenta las actividades reales de cada una de estas enzimas y metabolitos presentes en el parásito.

Posteriormente determinar el grado de control de la vía y de cada una de las enzimas sobre la vía de síntesis de T(SH)₂.

LITERATURA CITADA

- Álvarez C., Calo L., Romero L.C., García I., Gotor C. (2010) An O-acetylserine thiol lyase homolog with L-cysteine desulfhydrase activity regulates cysteine homeostasis in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 152: 656- 669
- Brener, Z. (1973) Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol*, 27: 347–382.
- Canepa G.E., Bouvier L.A., Miranda M.R., Uttaro A.D., Pereira C.A. (2009). Characterization of *Trypanosoma cruzi* L-cysteine transport mechanisms and their adaptive regulation, *FEMS Microbiol Lett*, 292(1):27–32
- Carballal-Zeballos, J.S. (2011) Caracterización bioquímica de la cistationina b-sintasa: propiedades redox del hemo y reactividad de su producto, el sulfuro de hidrógeno. Propiedades redox del hemo y reactividad de su producto, el sulfuro de hidrógeno (Tesis de doctorado en Química). Centro de Investigaciones Biomédicas Universidad de la República Montevideo
- Cevallos, A.M., Hernández, R. (2004). *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Departamento Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 102-127
- Cortez J., Ramos E., Valente C., Seixas J., Vieira A. (2012) A Expressão Global da Doença de Chagas – Oportunidades Emergentes e Impacto em Portugal. *Acta Med Port*; 25(5):332-339
- Fernandes M.C., Andrews N.W. (2012). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence, *FEMS Microbiol Rev*, 36(3): 734–747
- Fernandez-Reyes E., Galván-Cejudo Aurora (2004) Métodos para la cuantificación de proteínas. Departamento de bioquímica y biología molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba
- Gaitonde, MK. (1967) A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem J*, 104: 627–33.
- Giordana L., Suárez-Mantilla B., Santana M., Silber A.M., Nowicki C. (2014) Cystathionine γ -Lyase, an Enzyme Related to the Reverse Transsulfuration Pathway, Is Functional in *Leishmania* Spp, *J Eukaryot Microbiol*, 61, 204–213
- González-Chávez Z., Olin-Sandoval V., Rodríguez-Zavala J.S., Moreno-Sánchez R., Saavedra E. (2015) Metabolic control analysis of the *Trypanosoma cruzi* peroxide detoxification pathway identifies tryparedoxin as a suitable drug target. *Biochim.Biophys.Acta* 1850(2):263-273.
- González-Chávez Z., Vázquez C., Mejia-Tlachi M., Márquez-Dueñas C., Manning-Cela R., Encalada R., Rodríguez-Enríquez S., Michels P.A.M., Moreno-Sánchez R., Saavedra E. (2019). Gamma-glutamylcysteine synthetase and tryparedoxin 1 exert high control on the antioxidant system in *Trypanosoma cruzi* contributing to drug resistance and infectivity. *Redox Biol*, 26:(101231):1-14
- Goto, C. (2010) El poder de la cisteína. Published by CSIC-JA-USE- Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (CICIC): 15-18
- Lidani K.C.F., Andrade F.A., Bavia L., Damasceno F.S., Beltrame M.H., Messias-Reason I.J., Sandri T.L. (2019) Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front. Public Health* 7:166. doi: 10.3389/fpubh.2019.00166
- Marciano D., Santana M., Nowicki C. (2012) Functional characterization of enzymes involved in cysteine biosynthesis and H₂S production in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasit.* 185(2):114-120

- Martins A.V., Gomes A.P., Gomes M., Lopes-Rangel E., Fietto J., Santana L.A., de Almeida-Oliveira M.G., Geller M., de Freitas-Santos R., Roger-Vitorino R., Siqueira-Batista, R. (2012). Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infection*, 16(1), 45-58.
- Maya J.D., Cassels-Bruce K., Iturriaga-Vásquez P., Ferreira J., Faúndez M., Galanti N., Ferreira A., Morello A. (2006) Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 146: 601–620
- Montiel G., Díaz G. (2002). Respuesta inmune de las células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi*. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica)*, 37(1-2), 57-63.
- Murillo-Godínez G. (2018). Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). *Med Int Méx.*, 34 (6):959-970.
- Nguyen T., Waseem M. (2019). Chagas Disease (American Trypanosomiasis) [Updated 2020 Jan 17]. from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459272/>
- Nozaki T., Shigeta Y., Saito-Nakano Y., Imadaand M., Kruger-Warren D., (2001). Characterization of Transsulfuration and Cysteine Biosynthetic Pathways in the Protozoan Hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem*, 276(9): 6516–6523.
- Olin-Sandoval V., Moreno-Sánchez R., Saavedra E. (2010) Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites. *Curr Drug Targets*. 11(12):1614-30.
- Olin-Sandoval V., González-Chávez Z., Berzunza-Cruz M., Martínez I., Jasso-Chávez R., Becker I., Espinoza B., Moreno-Sánchez R., Saavedra E. (2012) Drug target validation of the trypanothione pathway enzymes through metabolic modeling. *FEBS J* 279(10):1811-1833.
- Organización Mundial de la Salud. (2019) Enfermedad de Chagas en América Latina: una actualización epidemiológica basada en Estimaciones de 2015. *Wkly Epidemiol Rec* 90: 33–43.
- Paba J., Santana J.M., Teixeira A., Wagner F., Valle de Sousa M., Ricart, C. (2004). Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics*. 4. 1052-9. 10.1002/pmic.200300637.
- Pérez-Molina J.A., Molina I. (2018) Chagas disease. *The lancet*, 391(10115): 82-94
- pET System Manual (1992). Obtenido de: <https://research.fhcr.org/content/dam/stripe/hahn/methods/biochem/pet.pdf>.
- Rassi A. Jr., Rassi A., Marcondes de Rezende J. (2012) American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am* 26(2):275-291
- Rojo-Medina J., Ruiz-Matus C., Salazar-Schettino P.M., González-Roldán J.F. (2018) Enfermedad de Chagas en México. *Gac Med Mex*. 154: 605-612
- Romero I., Téllez J., Yamanaka L.E., Steinde M., Romanha A.J., Edmundo C.G. (2014) Transsulfuration is an active pathway for cysteine biosynthesis in *Trypanosoma rangeli*. *Parasites & Vectors* 7:197
- Ruiz-Guzmán J. (2007). HISTORIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. *Gac Méd Bol*, 30(2), 70-73.
- Saavedra E., González-Chávez Z., Moreno-Sánchez R., Michels P.A.M. (2019) Drug Target Selection for *Trypanosoma cruzi* Metabolism by Metabolic Control Analysis and Kinetic Modeling. *Curr. Med. Chem*. 26(22):6652-71

- Salazar-Schettino P.M., Bucio-Torres M.I., Cabrera-Bravo M., Alba-Alvarado M.C., Castillo-Saldaña D.R., Zenteno-Galindo E.A., Rojo-Medina J., Fernández-Santos N.A., Perera-Salazar M.G. (2016). Enfermedad de Chagas en México. *Rev. fac.med (México)*, 59(3), 6-16.
- Schmunis G.A., Yadon Z.E. (2010) Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 115, 14–21.
- Singh K., Pratap-Singh K., Equbal A., Suman S.S., Zaidi A., Garg G., Pandey K., Das P., Ali V. (2016) Interaction between cysteine synthase and serine O-acetyltransferase proteins and their stage specific expression in *Leishmania donovani*. *Biochimie* 131: 29-44
- Steverding D. (2014). The history of Chagas disease. *Parasites & vectors*, 7, 317. doi:10.1186/1756-3305-7-317
- Tomasini N., Diosque P. (2015). Evolution of *Trypanosoma cruzi*: clarifying hybridisations, mitochondrial introgressions and phylogenetic relationships between major lineages. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110(3): 403-413.
- Tuñón R. (2013). Tripanosomiasis. Panamá. Parasitología. TELMEDS.pdf [En línea]. Recuperado de: <http://www.telmeds.org/wp-content/uploads/2013/10/Tripanosomiasis>
- Vázquez C., Mejía-Tlachi M., González-Chávez Z., Silva A., Rodríguez-Zavala, J.S., Moreno-Sánchez, R., Saavedra E. (2017) Buthionine sulfoximine is a multitarget inhibitor of trypanothione synthesis in *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett.* 591 (2017) 3881–3894.
- VWR part of avantor. Competent cells, expression strains, Rosetta. En línea 01/04/20, recuperado de: <https://es.vwr.com/store/product/11725789/competent-cells-expression-strains-rosettatm>
- Werner A.B., Heitmann G.I., Jercic L.M. I., Jofré M.L., Muñoz C. del V.P., Noemí H.I., San Martín V.A.M., Sapunar P.J., Torres H. M., Zulantay A.I. (2008). Guías clínicas de la enfermedad de Chagas 2006: Parte VI. Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas. *Rev Chil Infectol*, 25(5), 384-389.
- Williams A. M., Westrop G.D., Coombs G.H. (2009). Two pathways for cysteine biosynthesis in *Leishmania major*. *Biochem J*, 2009, 420(3) 451-462
- Zuñiga C., Vargas R., Vergara U. (2002). Evolución de la infección con *Trypanosoma cruzi* en cepas susceptibles y resistentes de ratones. *Archivos de medicina veterinaria*, 34(2), 183-188. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2002000200004>