



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO CINÉTICO DE LAS REACCIONES
NO CANÓNICAS DE LA CISTATIONINA β -SINTASA DE *T.*
CRUZI

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

ANDREA NAYELI GONZÁLEZ LÓPEZ



CDMX

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares
VOCAL: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez
SECRETARIO: Dr. Javier Alejandro Belmont Díaz
1er. SUPLENTE: Dr. Alejandro Gutiérrez Sánchez
2° SUPLENTE: Dra. Sobeida Sánchez Nieto

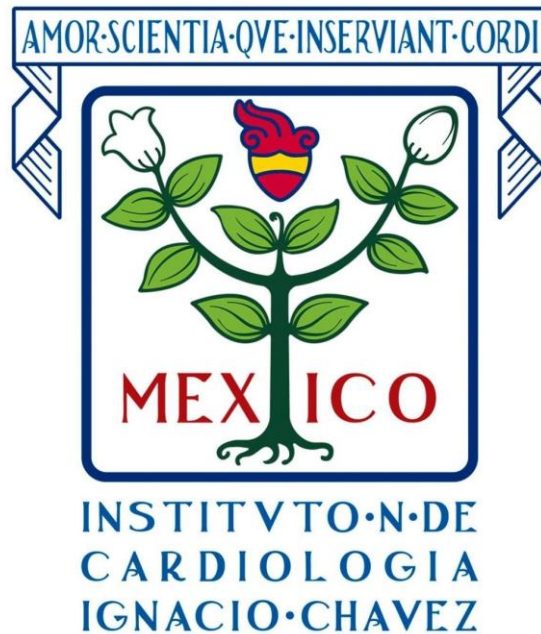
ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ CON EL APOYO DE LOS PROYECTOS DE CONACYT, FONDO CIENCIA DE FRONTERA PARADIGMAS Y CONTROVERSIAS, PROYECTO FOP16-2021-01 CON NÚMERO 320870 Y CONACYT, CIENCIA BÁSICA 282663

ASESOR DEL TEMA: Dr. Javier Alejandro Belmont Díaz

SUSTENTANTE: Andrea Nayeli González López

AGRADECIMIENTOS:

*AL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ.*



*A LOS PROYECTOS CONACYT, FONDO CIENCIA DE FRONTERA, PARADIGMAS
Y CONTROVERSIAS, PROYECTO FOP16-2021-01 CON NÚMERO 320870
Y CONACYT, CIENCIA BÁSICA 282663*



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

DEDICATORIAS:

A mis padres Emma López y Andrés González: Por enseñarme a luchar para alcanzar mis metas siempre con los valores y principios que me inculcaron, porque sin su esfuerzo y dedicación nada de esto sería posible.

A mi hermana Dulce: Porque te admiro profundamente y siempre has sido mi modelo a seguir de perseverancia y esfuerzo, por apoyarme en cada paso de la vida. Eres mejor hermana mayor que la vida me pudo dar.

A mi tutor de tesis y amigo, Dr. Javier Belmont: Por abrirme las puertas del laboratorio y por ser el mejor de los maestros. Agradezco profundamente su asesoría en cada paso del proyecto, pero sobre todo la motivación, el apoyo y la confianza que me brindo para crecer profesionalmente.

A mis sinodales, Dra. Rosario Muñoz y Dra. Perla Maldonado: Por el tiempo brindado en la revisión y retroalimentación para el presente trabajo.

A los profesionales que fueron parte de mi formación dentro del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez: M. en C. Citlali Vázquez, Biol. Rusely Encalada, Dra. Yoalli Martínez, Dra. Emma Saavedra, Dr. Ricardo Jasso, Dr. José Salud y Dr. Álvaro Marín. Con profunda admiración, agradezco de corazón el permitirme aprender de ustedes con su experiencia profesional y retroalimentación.

A las amistades que forme en el laboratorio; Isabel, César, Samuel, Moisés, Yoandra, Mariana, Jaqueline, Jerónimo, Arturo, Noe, Sr. Pablo y Sr. Fernando: Agradezco infinitamente el apoyo que me brindaron en cada charla, consejo de vida y sobre todo los momentos tan gratos que compartimos en donde las risas no faltaron.

A mis mejores amigos de la universidad; Lupita, Migue Moreno, Migue Reyes, Areli, Brenda, Julieta, Hiram, Noemi, Aidet, Leyre, Bertha, Guillermo y Chaveli: Por apoyarme en cada paso de la carrera y de la vida; por su lealtad y muestras de cariño incondicional que me abrazaron fuertemente en los momentos

más difíciles. Deseo con el corazón que nuestra amistad siga fortaleciéndose durante muchos años más.

A mi mascota “El Mishi Snoopy”: Aunque no puedas leer esto, sé que sabes que desde que llegaste a casa hiciste de mi vida y de mi estrés universitario momentos más ligeros y bonitos con tus ronroneos. Esto también va para ti con todo el amor del mundo.

A la M. en C. Mayté Valverde: Por haber sido parte importante de un pedacito de mi trayecto de vida en la facultad; por orientarme, escucharme, apoyarme y motivarme a crecer profesional y personalmente. Por los buenos recuerdos llenos de charlas y momentos en donde los memes, las risas, el café y el quesillo no faltaron.

Al capítulo estudiantil de la ACS Facultad de Química UNAM 2020-2023: Por ampliar mis perspectivas de vida para buscar nuevos horizontes, por ser parte de mi crecimiento personal y profesional, pero sobre todo por la amistad y cariño.

A los tutores y jefes de los distintos proyectos y ocupaciones que he desempeñado hasta hoy: Por confiar en mi y darme la oportunidad de crecer profesionalmente desde tiempos memorables, por ampliar mis panoramas de vida a través de sus explicaciones en las múltiples ramas de la química biológica y farmacia.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Enfermedad de Chagas	1
2. Pruebas de diagnóstico de la enfermedad de Chagas	5
3. <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
3.1 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	7
3.2 Sistema antioxidante	9
4. Tratamientos farmacológicos en la enfermedad de Chagas.....	10
5. Importancia de la Cys en el sistema antioxidante de <i>T. cruzi</i>	14
5.1 Suministro de Cys en <i>T. cruzi</i>	15
6. Cistationina β -sintasa (CBS).....	16
7. Ciclo catalítico de la CBS.....	17
8. Mecanismo cinético de la CBS	18
9. Versatilidad catalítica de la CBS.....	20
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
III. HIPOTESIS	22
IV-VI. OBJETIVOS Y METODOLOGÍA	23
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
16. Purificación, cuantificación e identificación de la CBS.....	29
17. Interacción CBS-Sustrato.....	31
18. Estudios cinéticos de la CBS.....	33
19. Estudio cinético de las reacciones no canónicas de la CBS.....	38
20. Inhibición de la formación de SH – por Ser.....	40

21.	Comparación de las reacciones no canónicas de la CBS.....	42
VII.	CONCLUSIONES	43
VIII.	PERSPECTIVAS.....	44
	REFEFENCIAS.....	44
	ANEXO I. TÉCNICAS	47
	ANEXO II. ESTANDARIZACIÓN DE LOS ENSAYOS ENZIMÁTICOS.....	54
	ANEXO III. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA CBS RECOMBINANTE.....	58

ABREVIATURAS:

Ace: Acetato
AceCoA: Acetil coenzima
AdoMet: S-adenosil-L-metionina
SAT: Acetil transferasa
Glu: Ácido glutámico/Glutamato
APx: Ascorbato peroxidasa
H₂S: Bisulfuro
CBS: Cistationina β-sintasa
CGL: cistationina g-liasa
CS: Cisteína sintasa
CoA: Coenzima A
***k_{cat}*:** Constante catalítica
***K_d*:** Constante de disociación
2OB: 2-OxobutiratoSpd: Espermidina
γEC: γ-glutamilcisteína
γECS: γ-glutamilcisteína sintetasa
Gly: Glicina
GSH: Glutación
GPx I: Glutación peroxidasa I
GPx II: Glutación peroxidasa II
GS: Glutacion sintetasa
LOOH: Hidroperóxidos lipídicos
Cth: Cistationina
Cys: Cisteína
HCys: Homocisteína
Lth: Lantionina
OAS: O-Acetilserina
Ser: Serina
NOx: NADPH oxidasas.
NADPH: Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato
RNO₂: Nitro
RNO[•]: Nitroradical

NO[•]: Óxido nítrico

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

ONOO⁻: Peroxinitrito

PLP: Piridoxal 5-fosfato

OH[•]: Radical hidroxilo

O₂^{•-}: Radical superóxido

SOD: Superóxido dismutasa

TcSODs: Superóxido dismutasas de *T. cruzi*

T(SH)₂: Tripanotión

T(S)₂: Tripanotión oxidado

TryR: Tripanotión reductasa

TryS: Tripanotión sintetasa

TXN: Triparedoxina

TXNPx: Triparedoxina peroxidasa

RSH: Tiol

V_{max}: Velocidad máxima

I. INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es causada por *Trypasonoma cruzi*, un parásito flagelado que se transmite en mamíferos (personas y en más de 150 especies de animales domésticos y silvestres) a través de heces infectadas de los triatominos hematófagos (Ospina *et al.*, 2017). Alrededor de 6 a 7 millones de personas en el mundo se infectan con este parásito destacando en mayor parte las principales zonas rurales de América (Figura 1.1) con 12 mil muertes al año (World Health Organization, 2021).

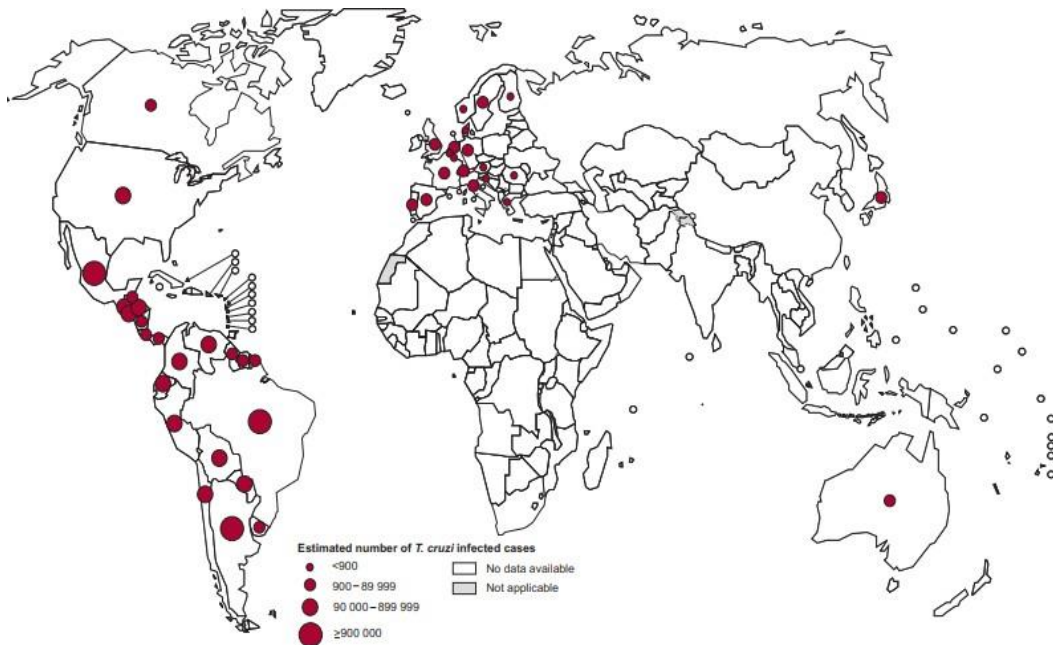


Figura 1.1. Distribución de la infección por *T. cruzi* en el mundo entre 2006 y 2010. Recuperado de: World Health Organization, 2021.

Los tres principales vectores de transmisión en América son *Triatoma infestante*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* (Rassi *et al.*, 2010); mientras que, en México, los principales vectores infectantes son *Triatoma. barberi*, *Triatoma. Meccus dimidiata* y *Meccus phyllosoma*; (Figura 1.2)

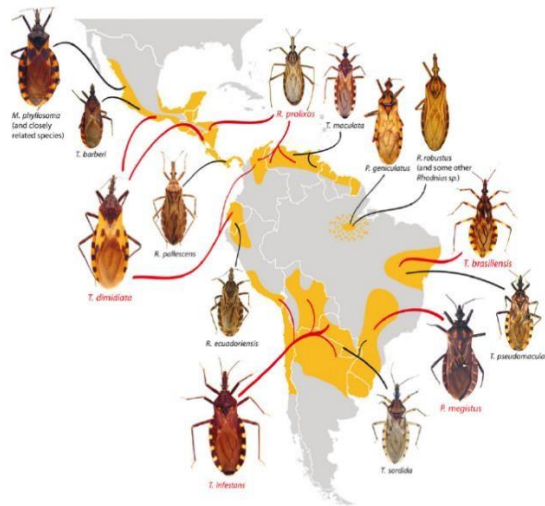


Figura 1.2. Mapa de las regiones endémicas de la enfermedad de Chagas en América Central y del Sur con las 14 especies de vectores más relevantes. Recuperado de: Patterson & Guhl, 2010.

De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), en México alrededor de dos terceras partes de la población viven en condiciones de vulnerabilidad (estadía en ambientes húmedos principalmente en zonas selváticas) para el desarrollo de la enfermedad. En 2012 se estimó que alrededor de 1.1 millones de personas estaban infectadas y que la incidencia era de 0.70 por cada 100,000 habitantes, aumentando dichas cifras en 2017 principalmente en los estados de Yucatán, Oaxaca e Hidalgo (Rojo-Medina *et al.*, 2018).

El desarrollo de la enfermedad de Chagas ocurre en dos fases: la fase aguda y la fase crónica (Figura 1.3). En la fase aguda de la enfermedad de Chagas y durante los primeros dos meses de inicio de la infección, la sintomatología en alrededor del 60 al 70% de los casos es nula; sin embargo, del 20 al 30% de los pacientes pueden desarrollar síntomas de alerta, tales como chagoma (Figura 1.4A), signo de Romaña (Figura 1.4B), fiebre, dolor de cabeza, náuseas, diarrea, vómito, agrandamiento de los ganglios linfáticos, dificultad para respirar, así como dolores musculares. Aunque en fase aguda esta enfermedad a menudo cursa con síntomas que no generan dificultades mayores, del 5 al 10% de los pacientes presentan complicaciones en esta fase que los llevan a la muerte (Rassi *et al.*, 2010).

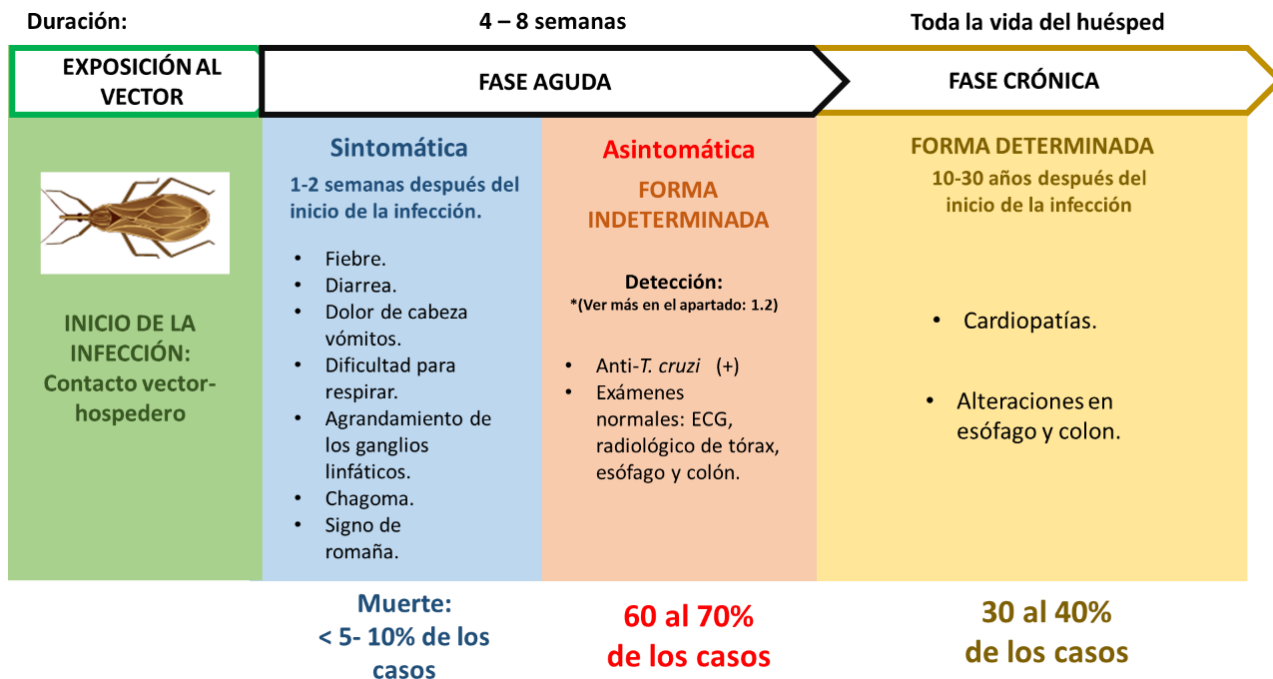


Figura 1.3. Desarrollo de la enfermedad de Chagas en fase aguda sintomática,asintomática y fase crónica. Del 30 al 40% de los casos llegan a la fase crónica.

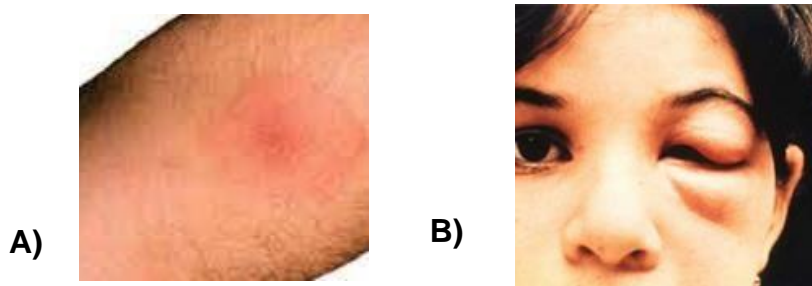


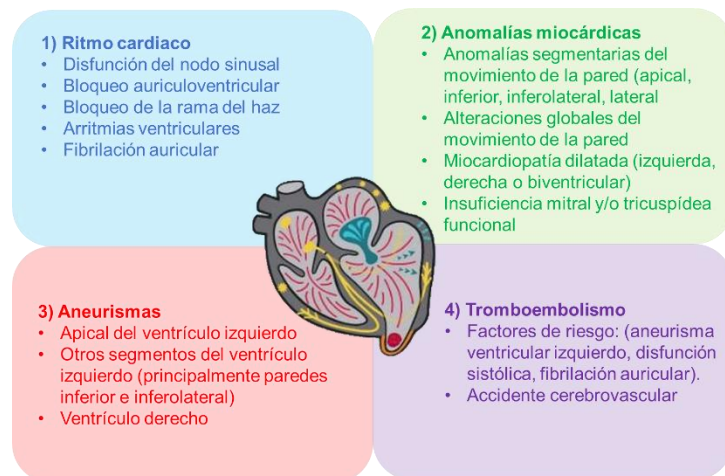
Figura 1.4. Signos presentes durante la fase aguda de la infección con *Trypanosoma cruzi* (Rojo-Medina *et al.*, 2018). **A)** Nódulo inflamatorio o chagoma; **B)** Inflamación periorbital o signo de Romaña

La mayoría de los pacientes, no desarrollan síntomas de alerta y presentan la forma indeterminada previo al desarrollo de los trastornos en la fase crónica. La forma indeterminada de la enfermedad de Chagas está definida por serología anti-*T. cruzi* positiva (ver más en el apartado 2: Pruebas de diagnóstico para la enfermedad de Chagas), ausencia de signos o síntomas físicos de la enfermedad, electrocardiograma (ECG) y radiografías normales de tórax, esófago y colon (Nunes *et al.*, 2018).

La fase crónica se presenta después de 10 a 30 años del inicio de la infección y alrededor del 30% de los pacientes pueden presentar trastornos cardiacos, mientras que el 10% desarrolla trastornos digestivos. Las alteraciones cardiacas que se presentan con el paso de los años y el transcurso de la enfermedad representan un problema de salud grave porque pueden llevar a la muerte (Rojo-Medina *et al.*, 2018). De acuerdo con Nunes *et al.* (2018); la muerte súbita debido a la enfermedad de Chagas es la causa general más común de muerte (55 al 60%), seguida de insuficiencia cardíaca (25 al 30%) y eventos embólicos (10 al 15%). Los principales hallazgos encontrados a nivel cardíaco como consecuencia de la enfermedad de Chagas son cambios del ritmo y conducción, aneurismas, tromboembolismo y anomalías miocárdicas que conducen al desarrollo de insuficiencia cardiaca, producto de la destrucción progresiva del músculo cardiaco y otras alteraciones descritas en la Figura 1.5.

Cabe mencionar que además también ha sido relacionada con alteraciones en el tubo digestivo a nivel del esófago y colon, así como del vaciamiento gástrico y trastornos motores de la vesícula biliar (Organización Panamericana de la Salud & Organización Mundial de la Salud, 2021)

Figura 1.5. Principales hallazgos cardiacos por enfermedad de Chagas. Las alteraciones se enmarcan en el esquema descrito de acuerdo con los códigos de color. Recuperado de: Nunes *et al.*, 2018.



2. Pruebas de diagnóstico de la enfermedad de Chagas

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas durante la fase aguda se realiza a partir de un examen directo de sangre fresca (capilar o venosa) del paciente infectado para la observación de tripomastigotes en movimiento (Rassi *et al.*, 2010); o mediante un frotis con tinción de Wright, Field o Giemsa para la identificación morfológica del cinetoplasto, núcleo, flagelo y membrana (Ospina *et al.*, 2017) (Figura 2.1A). Además, durante esta fase, también puede ser diagnosticada por PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de DNA satelital de *T. cruzi* (Ospina *et al.*, 2017) (Figura 2.1B).

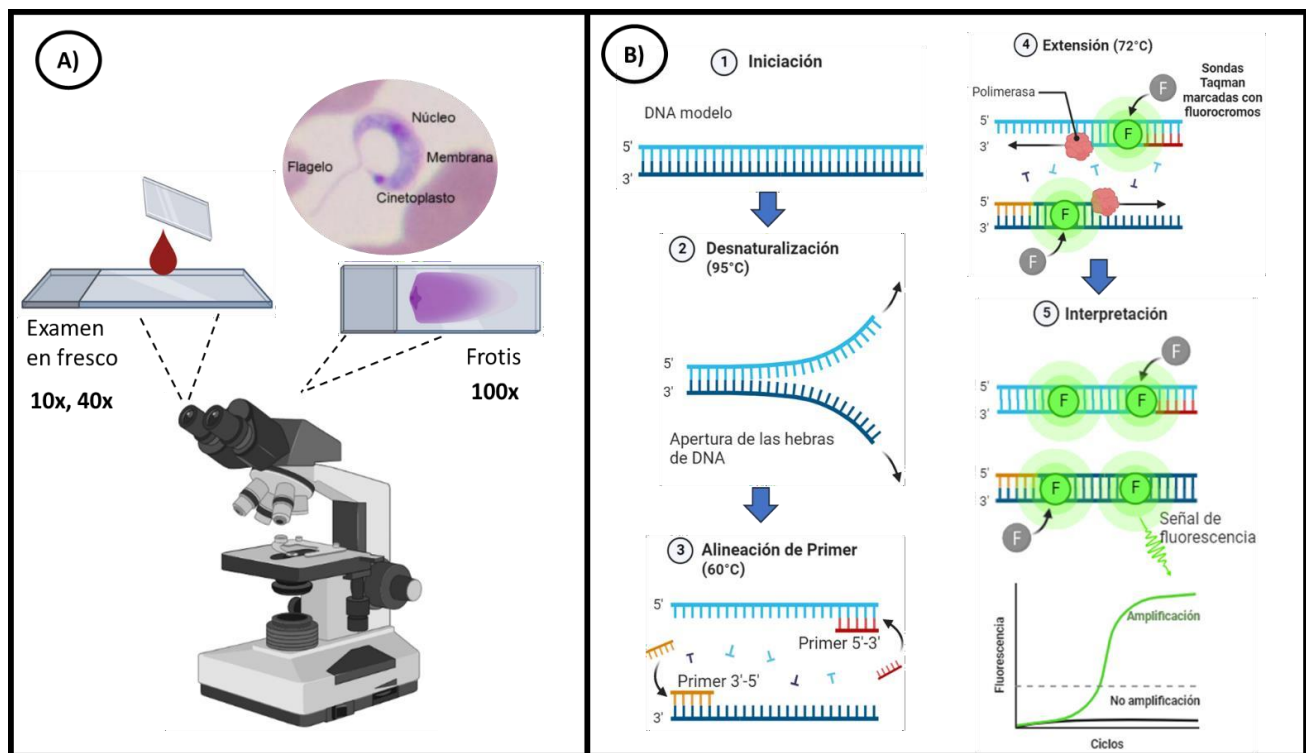


Figura 2.1. Técnicas de diagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase aguda. **A)** Observación microscópica: El ensayo en fresco se realiza a 10x y 40x, mientras que el frotis es fijado con metanol y teñido para su observación en 100x. **B)** PCR en tiempo real: Es realizada con sondas Taqman (marcadas con dos fluorocromos) - qPCR Taqman Multiplex. El aumento en la señal de fluorescencia es proporcional al aumento de los fragmentos de DNA amplificados a través de los ciclos de rtPCR (Ospina *et al.*, 2017).

En fase crónica se realizan pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA, Figura 2.2A), inmunofluorescencia (IFI, Figura 2.2B) o Western Blot (WB, Figura 2.3C). (Organización Panamericana de la Salud, 2021). Para ello se considera que durante los primeros 60 días (fase aguda) de la infección existe la presencia de anticuerpos IgMy posteriormente se incrementan los anticuerpos IgG (Ospina *et al.*, 2017).

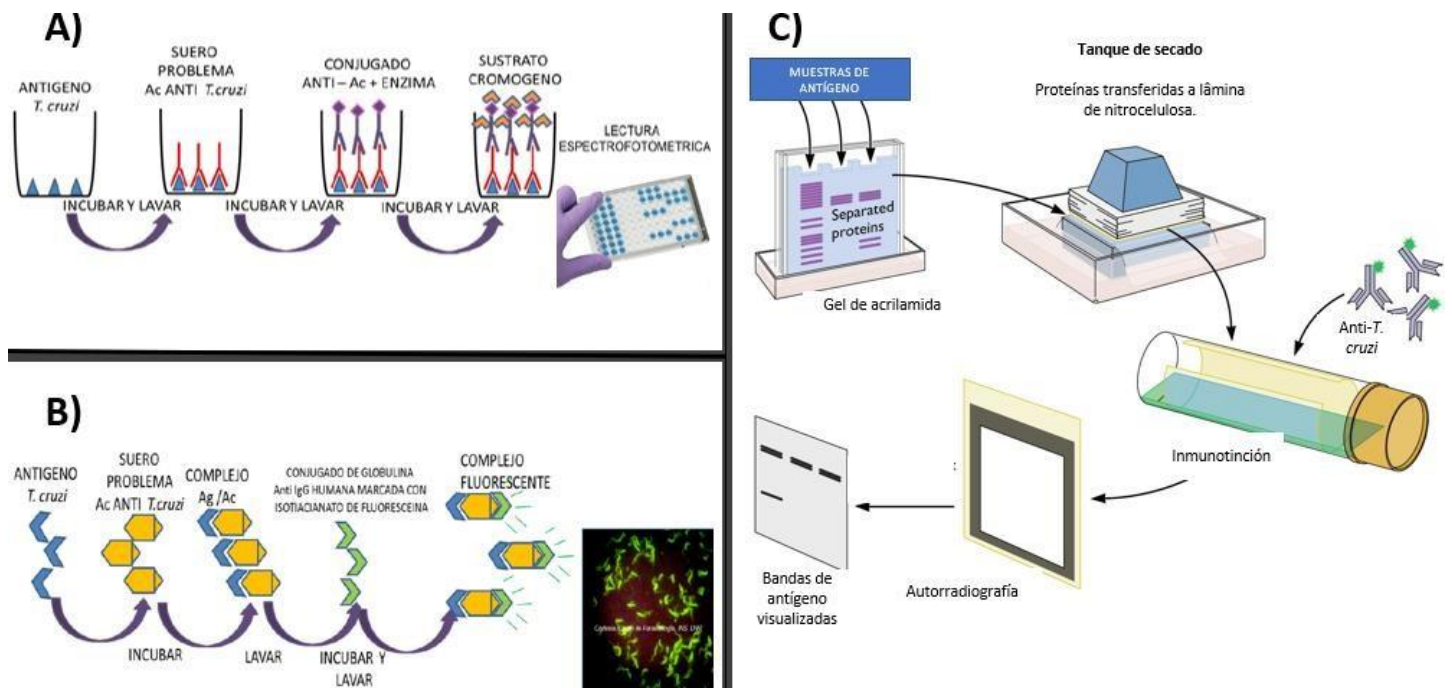


Figura 2.2. Técnicas de diagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase crónica. **A) ELISA:** Se utilizan antígenos purificados comerciales que reaccionan con muestras de suero con anticuerpos específicos para *T. cruzi*. El conjugado es IgG humano marcado con una enzima de fosfatasa alcalina o peroxidasa que reacciona con un sustrato cromogénico para desarrollar color y obtener la concentración de anticuerpos anti-*T. cruzi*. **B) IFI:** Los anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* de la muestra se unen a antígenos de *T. cruzi* (epimastigotes) fijados en láminas para formar complejo Ag-Ac. Se añade además un conjugado de IgG marcado para desarrollar fluorescencia detectada por microscopia de fluorescencia UV. **C) WB:** Se separan por peso molecular las proteínas de la muestra por electroforesis y los antígenos transferidos por membrana son reconocidos por anticuerpos específicos Anti-*T. cruzi* detectados por actividad enzimática cromógena o fluorescencia (Ospina *et al.*, 2017).

3. *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi (Figura 3.1A) es un parásito flagelado de la familia de los *Trypanosomatidae* que sufre varios cambios morfológicos durante su ciclo de vida. Se presenta en su forma infectiva en la sangre de los mamíferos infectados como tripomastigote (Fig 3.1B) con una longitud de 20 μm (Maya *et al.*, 2007). En el intestino del triatomino se encuentra en su forma proliferativa de epimastigote (Fig. 3.1 A) con una longitud de 20 a 25 μm , mientras que en las células de los mamíferos su forma proliferativa es en amastigote (Figura 3.1C) con un tamaño de 2 a 2.5 μm (Maya *et al.*, 2007).

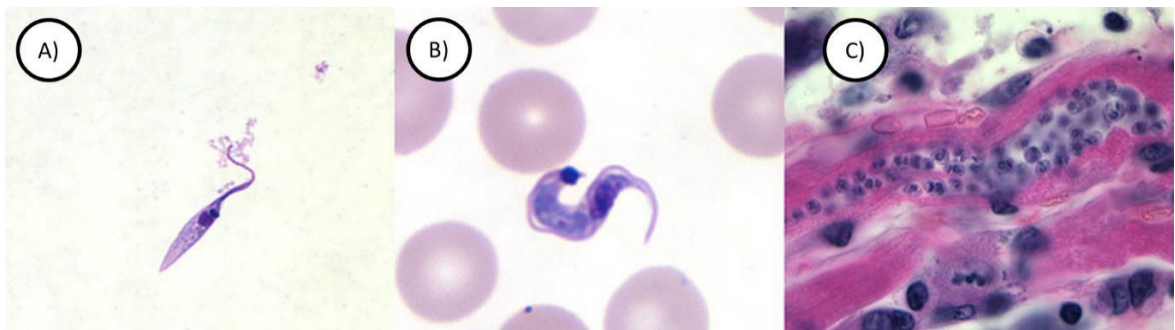


Figura 3.1. *T. cruzi*. **A)** Forma proliferativa en triatominos: Epimastigote, **B)** Forma infectiva en sangre periférica de mamífero: Tripomastigote, **C)** Forma proliferativa en tejido cardiaco de mamífero: Amastigote. Recuperado de Bern *et al.*, 2019.

3.1 Ciclo de vida de *T. cruzi*

El ciclo de infección se ilustra en la Figura 3.2, cuando el insecto vector triatomino pica y defeca en zonas de la piel expuestas del mamífero liberando tripomastigotes metacíclicos cerca de una lesión cutánea (Rassi *et al.*, 2010). Los tripomastigotes meta cíclicos al ingresar al organismo del mamífero invaden células cercanas al sitio de inoculación diferenciándose en amastigotes y replicándose por fisión binaria. Posteriormente, se transforman en tripomastigotes provocando lisis celular e infectando a células de diversos tejidos. Una vez que han invadido nuevas células, se transforman nuevamente en amastigotes en los nuevos sitios de infección para replicarse (Centers for Disease Control and Prevention, 2019). El

vector triatomino también puede adquirir al parásito en forma de tripomastigote al picar a un hospedero infectado. En el intestino medio adquieren su forma proliferativa de epimastigotes para replicarse y al migrar al recto se diferencian en tripomastigotes metacíclicos (Rassi *et al.*, 2010).

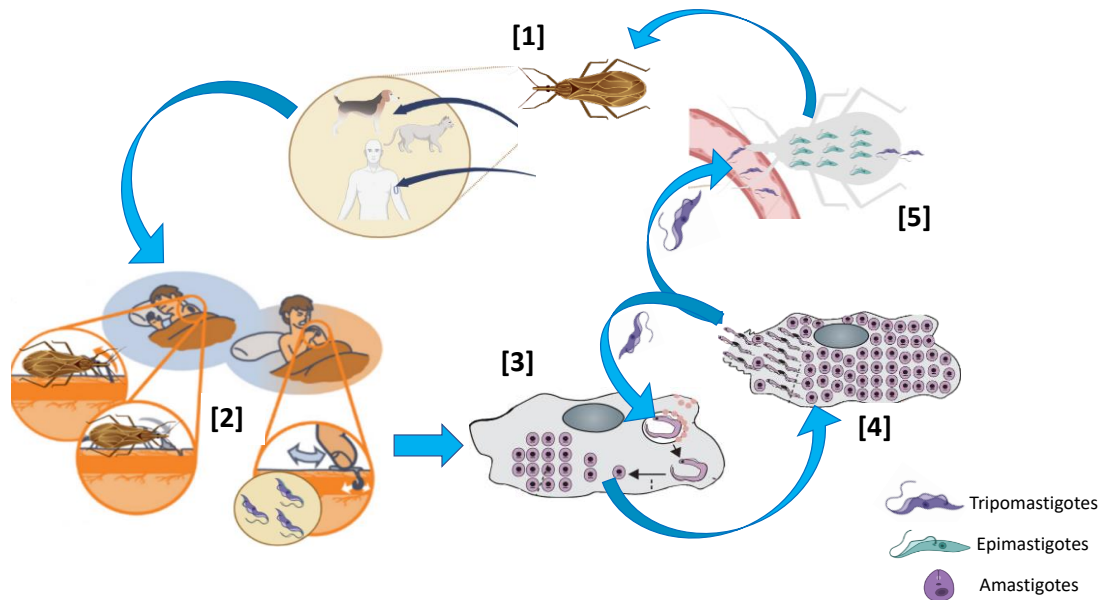


Figura 3.2. Ciclo de vida de *T. cruzi*. [1] Los mamíferos pueden ser infectados a través de la picadura de un insecto triatomino. *T. cruzi* ingresa al organismo del mamífero en su forma de tripomastigote. [2] Dentro de las células del hospedero los amastigotes se replican por fisión binaria y [3] se transforman a tripomastigotes lisando las células para invadir otras células o llegar al torrente sanguíneo. [4] Los triatominos también pueden infectarse con tripomastigotes al picar a un mamífero infectado y replicarlos en el intestino medio a partir de su forma proliferativa de epimastigotes.

El parásito puede transmitirse también a través de alimentos contaminados, por contacto con heces; transfusión de sangre u órganos de personas infectadas y de madre a hijo en el embarazo, aunque esto ocurre en menor proporción (Rassi *et al.*, 2010). De acuerdo con Ospina *et al.* (2017), en Latinoamérica alrededor de 2 millones de mujeres en edad fértil son susceptibles a transmitir el parásito al feto y se han reportado al menos 15,000 neonatos infectados cada año en Latinoamérica y 2,000 en Norteamérica.

3.2. Sistema antioxidante

El sistema antioxidante de *T. cruzi* es indispensable para su supervivencia durante el proceso de infección, esto se debe a que cuando el parásito es fagocitado por las células del sistema inmune, se genera una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) que pueden ser nocivas para el parásito.

Al ser fagocitados los tripomastigotes llevan a la activación de la NADPH oxidasa (NOx) que se encuentra en la membrana de los macrófagos. Esto lleva a la producción del radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que se convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la superóxido dismutasa (SOD) presente en el hospedero.

El sistema antioxidante de *T. cruzi* (Figura 3.3) está constituido por varias enzimas y moléculas antioxidantes distribuidas en citosol, retículo endoplásmico, mitocondria y glucosomas. El donador final de los electrones para todos los sistemas enzimáticos es el NADPH y sus equivalentes reductores son distribuidos a los sistemas de desintoxicación a través de tripanotión ($T(SH)_2$) y de la triparedoxina (TXN). (Cardoso *et al.*, 2016).

T. cruzi posee 4 superóxido dismutasas (TcSODs) dependientes de hierro que metabolizan al $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . Las TcSODs se encuentran distribuidas en la mitocondria (SOD A y C), en citosol (SOD B1) y en glucosomas (SOD B1-2). El H_2O_2 y otros hidroperóxidos lipídicos (LOOH) son desintoxicados por las 5 peroxidasas de *T. cruzi*, las cuales son: la triparedoxina peroxidasa (TXNpx) citosólica y mitocondrial; la ascorbato peroxidasa (APx) presente en retículo endoplásmico; la glutatión peroxidasa I (GPxI) localizada en glucosomas y citosol; y la glutatión peroxidasa II situada en retículo endoplásmico (GPxII) (Cardoso *et al.*, 2016).

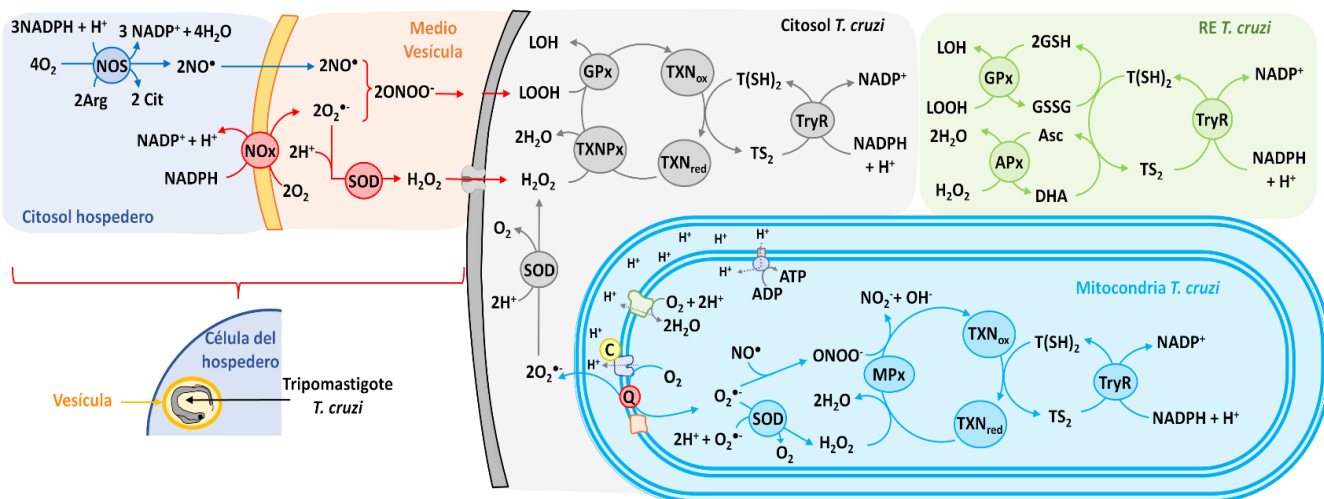


Figura 3.3. El sistema antioxidante le permite a *T. cruzi* contender contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por las células del hospedero durante el proceso de invasión o en procesos celulares propios del parásito como en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. El sistema antioxidante de *T. cruzi* está constituido de moléculas acarreadoras de electrones y enzimas que transfieren dichos electrones a las ROS. Las moléculas acarreadoras de electrones en *T. cruzi* son: tripanotión (T(SH)₂), glutatión (GSH), ascorbato (Asc) y triparredoxina (TXN). Las enzimas antioxidantes son: superóxido dismutasa (SOD), triparredoxina peroxidasa (TXNPx), glutatión peroxidasa (GPx), Ascorbato peroxidasa (APx), peroxidasa mitocondrial (MPx) y tripanotión reductasa (TryR).

A través del sistema antioxidante, el parásito evita la acumulación de O₂^{•-} y H₂O₂, lo que permite su supervivencia en el hospedero. Actualmente este sistema es de interés en el diseño de estrategias terapéuticas, ya que al exponer al parásito a elevadas concentraciones de ROS y RNS, se puede inducir la muerte de estos (Figura 3.3).

4. Tratamientos farmacológicos en la enfermedad de Chagas

Desde la década de los años 70's se han utilizado dos fármacos para combatir la enfermedad de Chagas, el nifurtimox (NFX) y el benznidazol (BNZ) (Figura 4.1); sin embargo, ambos fármacos producen efectos secundarios que provocan el abandono del tratamiento en cerca del 40% de los pacientes (Arce *et al.* 2017). El tratamiento con estos fármacos ha demostrado efectividad cuando es administrado

en la fase aguda de la enfermedad y en pacientes entre 19 a 50 años sin cardiopatía avanzada. En mayores de 50 años no ha demostrado beneficio. Está contraindicado en insuficiencia renal o hepática grave y en el embarazo (Rassi *et al.*, 2010).

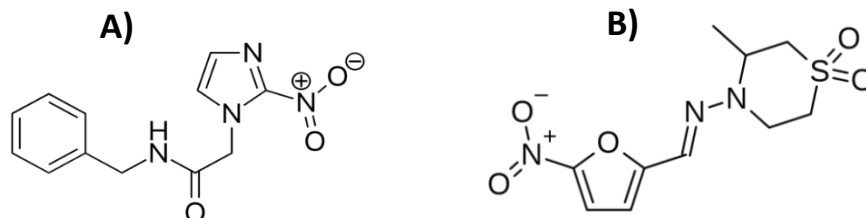


Figura 4.1. Estructura química de los antichagásicos usados como terapia en la enfermedad de Chagas. **A)** Benznidazol (BNZ) y **B)** Nifurtimox. (NFX)

Las dosis varían de acuerdo con la edad del paciente. Para el benznidazol, en niños se administran dosis de entre 5 a 10 mg/kg al día en dos o tres tomas durante 60 días, mientras que en adultos las dosis diarias son de 5 mg/kg (Rassi *et al.*, 2010). Con respecto al NFX en niños las dosis máximas son de 15 mg/kg al día en tres tomas y de 8 a 10 mg/kg en adultos de 60 a 90 días (Rassi *et al.*, 2010). Las dosis en adultos son más bajas debido a que se ha visto falta de adherencia al tratamiento de acuerdo con un estudio realizado en Morelos en 2017 donde el 35% de los pacientes tratados con estos medicamentos abandonaron el tratamiento por la presencia de efectos adversos (Arce *et al.*, 2017).

Un estudio realizado por Jackson *et al.* (2010) reportó que los pacientes tratados con BNZ desarrollaron reacciones cutáneas, como prurito (37%) y salpullido (29.3%). Los principales efectos adversos digestivos fueron anorexia (21.7%), náuseas (35.9%) y dolor abdominal (21.7%), mientras que dentro de los efectos neuropsiquiátricos se encontraron el dolor de cabeza (40.2%) y los cambios de humor (31.5%); finalmente, los efectos a nivel sistémico y respiratorio fueron menos frecuentes (Figura. 4.2).

Con respecto al nifurtimox, se presentó prurito (17%) y salpullido (12%). Los principales efectos adversos digestivos fueron anorexia (73.8%), náuseas (54.8%)

y dolor abdominal (39.3%); mientras que los efectos neuropsiquiátricos incluyeron dolor de cabeza (72.4%), cambios de humor (46.4%) y vértigo (27.4%). A nivel sistémico se presentaron mayores efectos adversos en comparación con benznidazol siendo la fatiga (69%), la artralgia (26.2%) y la mialgia (26.2%) los principales y en menor proporción se desarrollaron efectos adversos a nivel respiratorio como disnea y tos (Figura 4.2) (Jackson *et al.*, 2010).

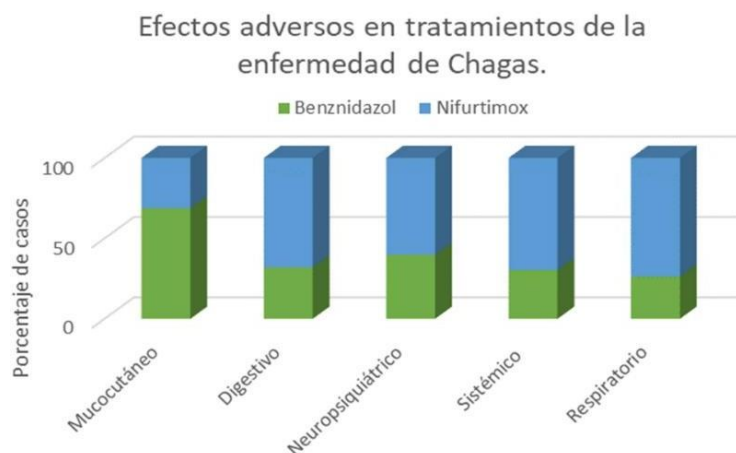


Figura 4.2. Efectos adversos desarrollados por pacientes adultos tratados con benznidazol (verde) y nifurtimox (azul) de acuerdo con Jackson *et al.* (2010). Los pacientes tratados con nifurtimox presentaron mayores efectos adversos a nivel digestivo, neuropsiquiátrico, sistémico y respiratorio.

Los mecanismos de acción de ambos fármacos consisten en la generación de ROS y RNS que causan daño en las biomoléculas del parásito o dañan su sistema antioxidante (ver Apartado 3.2) (Figura 4.3).

El benznidazol es reducido por una nitroreductasa tipo I para generar una hidroxilamina (RNHOH) que al reducirse produce una amina (RNH₃) (Maya *et al.*, 2007). Esta a su vez, puede formar conjugados con moléculas que poseen grupos tiol (RSH) como el tripanotión, al unirse en la posición cuatro del anillo de imidazol (Trochine *et al.*, 2014).

Por su parte, el nifurtimox (NFX) actúa mediante la formación de radicales libres. La citocromo P450 reductasa transfiere un electrón proveniente del NADPH al grupo nitro del NFX y genera un radical nitro (RNO₂[•]) cuyo electrón es tomado por el

adherencia terapéutica. Por ello, es necesaria la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas considerando su eficacia y seguridad en los pacientes que se infectan con *T. cruzi* y desarrollan la enfermedad de Chagas.

5. Importancia de la cisteína (Cys) en el sistema antioxidante de *T. cruzi*

La cisteína (Cys) juega un papel fundamental en *T. cruzi* para el manejo del estrés oxidante, debido a que es utilizada para sintetizar moléculas antioxidantes, como el glutatión (GSH) y el T(SH)₂ que le permiten a la célula defenderse contra el daño oxidante provocado por especies químicas reactivas como las ROS y las moléculas electrofílicas (ver Apartado 3.2). El grupo tiol(-SH) que contiene la Cys puede funcionar como donador de electrones en las reacciones de óxido-reducción involucradas en la desintoxicación de dichas especies reactivas (Figura 5.1). La síntesis de T(SH)₂ puede dividirse en dos etapas, la primera en la que se condensan la Cys, el ácido glutámico (Glu) y la glicina (Gly), para formar glutatión (GSH) y una segunda etapa donde dos moléculas de GSH se condensan con una molécula de espermidina (Spd) para finalmente formar T(SH)₂.

Experimentos de suplementación con Cys muestran un incremento de hasta cuatro veces la concentración intracelular de T(SH)₂ en epimastigotes de *T. cruzi* expuestos a 100 μM del aminoácido, sugiriendo que la Cys es el reactivo limitante para la síntesis de T(SH)₂ (Vázquez *et al.*, 2017). Por lo que partir de los experimentos de suplementación surgió el interés por estudiar las vías que utiliza *T. cruzi* para obtener a la Cys.

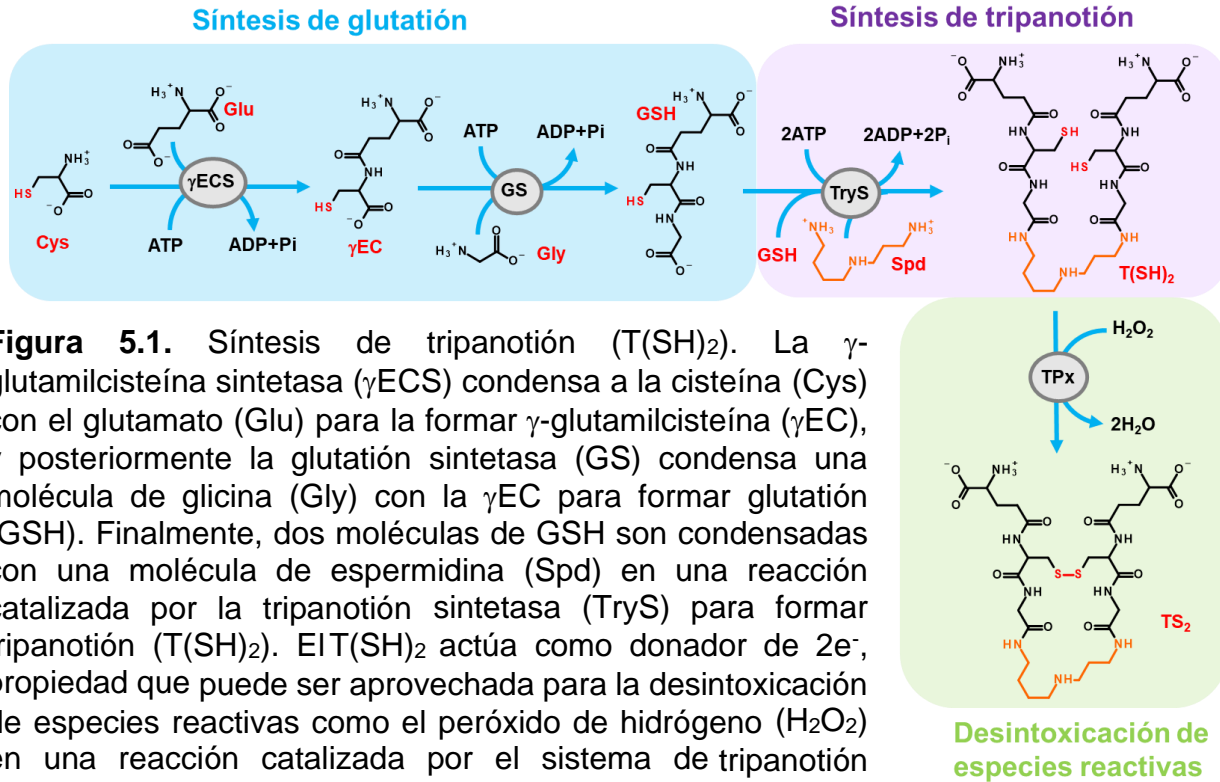


Figura 5.1. Síntesis de tripanotión (T(SH)₂). La γ -glutamilcisteína sintetasa (γ ECS) condensa a la cisteína (Cys) con el glutamato (Glu) para la formar γ -glutamilcisteína (γ EC), y posteriormente la glutatión sintetasa (GS) condensa una molécula de glicina (Gly) con la γ EC para formar glutatión (GSH). Finalmente, dos moléculas de GSH son condensadas con una molécula de espermidina (Spd) en una reacción catalizada por la tripanotión sintetasa (TryS) para formar tripanotión (T(SH)₂). EIT(SH)₂ actúa como donador de 2e⁻, propiedad que puede ser aprovechada para la desintoxicación de especies reactivas como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en una reacción catalizada por el sistema de tripanotión peroxidasa (TPx).

5.1. Suministro de Cys en *T. cruzi*

El suministro de Cys en *T. cruzi* es posible a través de tres vías (Figura 5.2): 1) La Cys extracelular puede ingresar al parásito a través de un transportador membranal (Canepa *et al.*, 2009); 2) *T. cruzi* posee las enzimas para la síntesis de *novo* de Cys, la cual comienza con la condensación de serina (Ser) con el grupo acetilo de la Acetil-CoA, lo que genera O-Acetilserina (OAS) en una reacción catalizada por la serina acetil transferasa (SAT). Finalmente, la OAS sufre un ataque nucleofílico por parte del bisulfuro (SH⁻) en una reacción catalizada por la cisteína sintasa (CS) (Nozaki *et al.*, 2001); y 3) La vía de transulfuración inversa está también presente en el parásito e inicia con la condensación entre Ser y homocisteína (HCys), produciendo cistationina (Cth) en una reacción catalizada por la cistationina β -sintasa (CBS). Finalmente, la Cth es hidrolizada por la cistationina γ -liasa (CGL) lo que da como producto final a la Cys (Nozaki *et al.*, 2001).

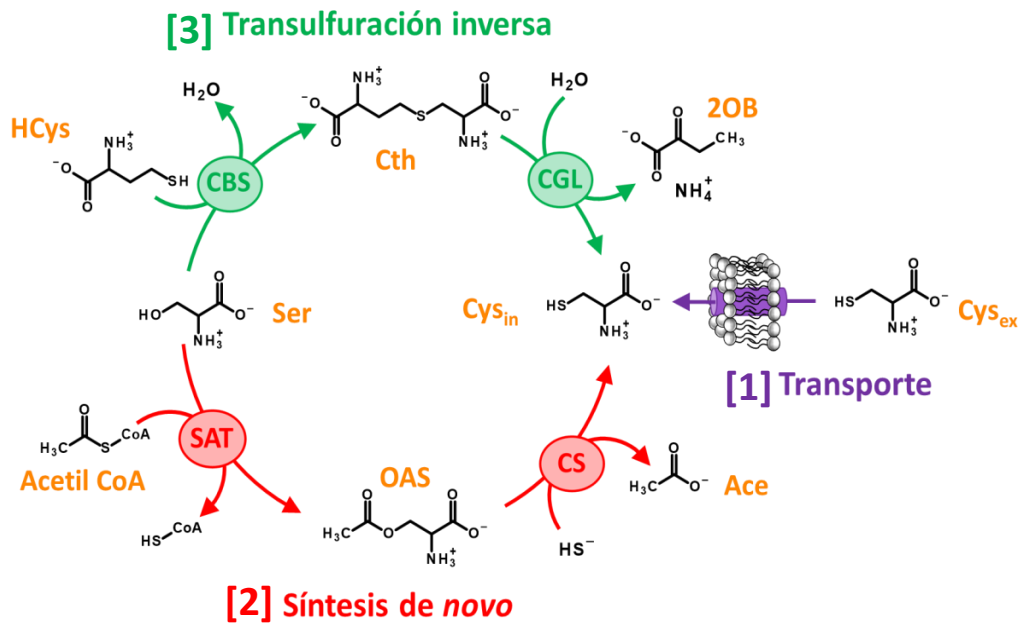


Figura 5.2. Vías de suministro de cisteína (Cys) en *T. cruzi*. La Cys intracelular de *T. cruzi*, es adquirida a partir de 3 vías. **[1] Transporte:** el paso de Cys extracelular al interior de la célula ocurre a través de una proteína transmembranal; **[2] Síntesis de novo:** se da a partir de la condensación entre serina (Ser) y acetil-CoA en presencia de serina acetil transferasa (SAT) para formar O-acetilserina (OAS) que sufre un ataque nucleofílico por el bisulfuro (SH^-) catalizado por la cisteína sintasa (CS). **[3] Vía de transulfuración inversa:** A partir de la reacción canónica de la cistationina β - sintasa (CBS) entre Ser y la homocisteína (HCys) para la generación de cistationina (Cth), la cual es finalmente hidrolizada por la cistationina γ -liasa (CGL).

6. Cistationina β -sintasa (CBS)

La CBS es la enzima que cataliza la primera reacción de la vía de transulfuración para la síntesis de Cys. La catálisis mediada por la CBS es una de las vías que permite la eliminación de HCys, aminoácido relacionado con enfermedades cardiovasculares, defectos del tubo neural y la enfermedad de Alzheimer en mamíferos (Banerjee *et al.*, 2003). En humanos se encuentra en menor proporción en forma de monómero y homodímero, y en mayor proporción en forma de tetrámero con un dominio hemo N-terminal de 70 aminoácidos, un dominio catalítico que se une a piridoxal 5-fosfato (PLP) y un dominio C-terminal que le confiere la capacidad de unirse a un activador alostérico S-adenosil-L-metionina

(AdoMet) (Figura 6.1A) (Banerjee *et al.*, 2003). La CBS de *T. cruzi* se encuentra en forma homotetrámero con una masa molecular de 155 kDa y no presenta el dominio hemo N-terminal, ni el dominio de unión a AdoMet (Figura 6.1B) (Nozaki *et al.*, 2001).

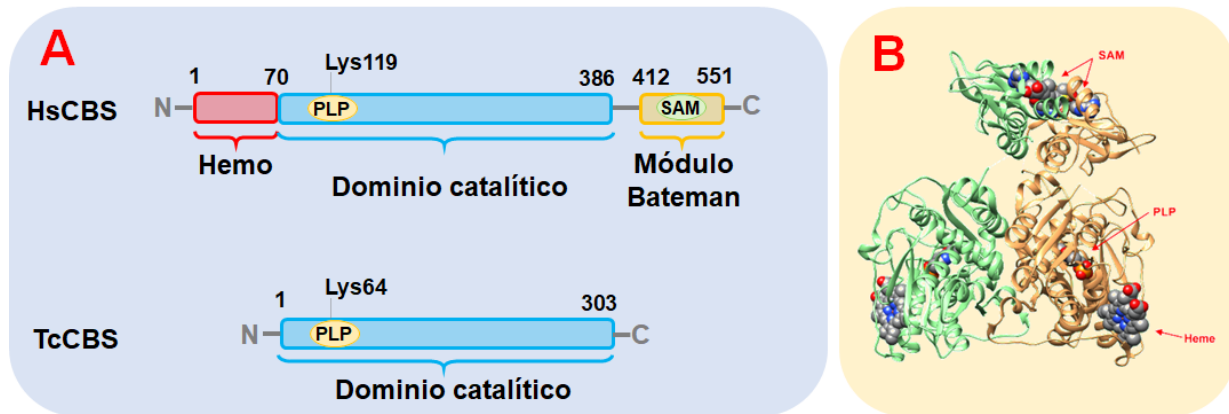


Figura 6.1. Comparación de la cistationina β -sintasa (CBS) humana (HsCBS) y la de *T. cruzi* (TcCBS). **A)** Estructura básica de la secuencia de aminoácidos de HsCBS y TcCBS. **B)** Estructura tridimensional de HsCBS en su forma dimérica. Figura modificada de Zuhra et al 2020 (PDB 4PCU).

7. Ciclo catalítico de la CBS

La CBS posee una molécula de piridoxal 5-fosfato (PLP) como grupo prostético, el cual forma una aldimina interna con el grupo amino del residuo de Lisina 119 en la CBS humana o la 64 en *T. cruzi* que se encuentra en el sitio activo de la enzima. La aldimina interna de la CBS provoca que esta enzima posea un máximo de absorción a 412 nm. El ciclo catalítico inicia con la adición de un primer aminoácido que desplaza la unión de PLP con Lisina, dando lugar a la formación de una aldimina externa; posteriormente, hay una disociación del grupo que se encuentra en el carbono β del aminoácido, formando un intermediario aminoacrilato que absorbe a 460 nm (Figura 7.1). El ciclo continúa con el ataque de alguna molécula nucleofílica sobre el carbono β del aminoacrilato, lo cual produce un nuevo aminoácido que forma una aldimina externa que al final del ciclo será desplazada por la Lys de la CBS (Banerjee *et al.*, 2003).

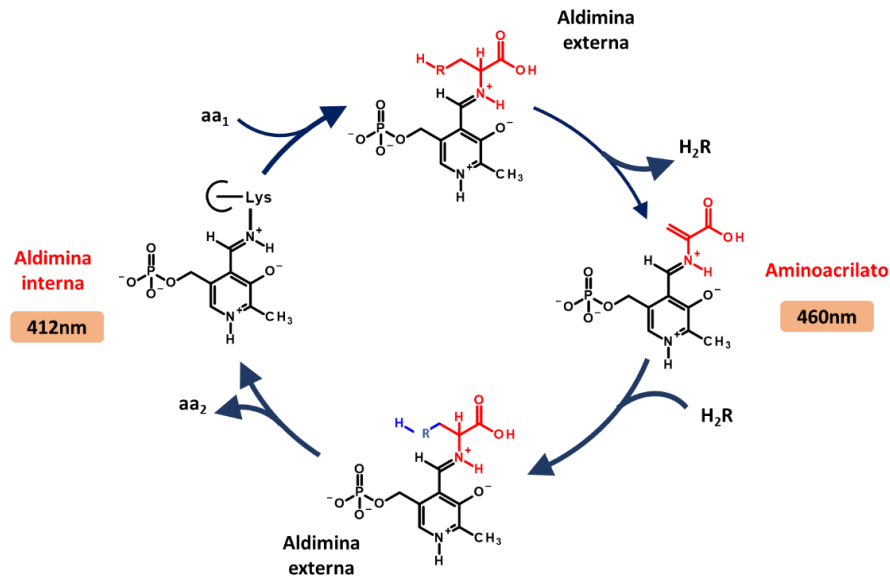


Figura 7.1 Ciclo catalítico de la cistationina β -sintasa (CBS). La CBS tiene un dominio catalítico donde el piridoxal 5-fosfato (PLP) interacciona con un residuo de lisina y es visible a 412 nm (aldimina interna). La unión de un primer aminoácido desplaza al residuo de lisina y da lugar a la formación de una aldimina externa. La ruptura del enlace en el carbono β lleva a la formación del intermediario aminoacrilato que en presencia de un nucleófilo, forma un nuevo aminoácido.

8. Mecanismo cinético de la CBS

El ciclo catalítico de CBS es consistente con un mecanismo cinético de tipo ping-pong (Jhee *et al.*, 2000), el cuál es un sistema ordenado donde un sustrato **A** interactúa con una enzima **E** formando el complejo **E-A**, posteriormente ocurre una reacción química que resulta en la liberación de un primer producto **P** y en la formación de un aducto en la enzima generando una forma modificada de la misma (**F**). Un segundo sustrato **B** interactúa con la enzima en su forma "F" y se produce un segundo evento catalítico, formando un segundo producto **Q** y regenerando la forma original de la enzima **E** (Figura 8.1).

En el caso de la actividad de CBS (Figura 8.2), cuando la Ser llega al sitio activo de la enzima, su grupo amino sustituye al grupo amino de la Lisina de la aldimina interna que se encuentra unida al PLP liberando a su vez una molécula de agua para formar la aldimina externa y al intermediario aminoacrilato. Cuando llega el

segundo sustrato, el tiol de la homocisteína (HCys) ataca al átomo de carbono β del aminoacrilato para liberar Cistationina (Cth) como producto y regenerar la aldimina interna formada entre el PLP y la enzima (Jhee *et al.*, 2000).

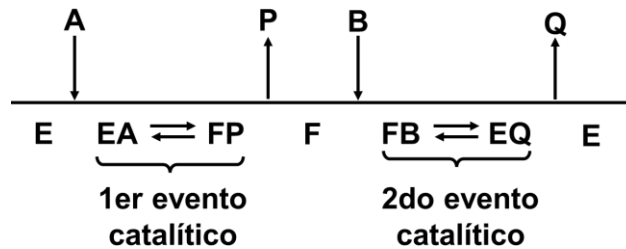


Figura 8.1. Esquema cinético del mecanismo enzimático de tipo ping-pong. E = forma libre de la enzima; A = primer sustrato; P = primer producto; F= Enzima modificada; B= segundo sustrato; Q = segundo producto.

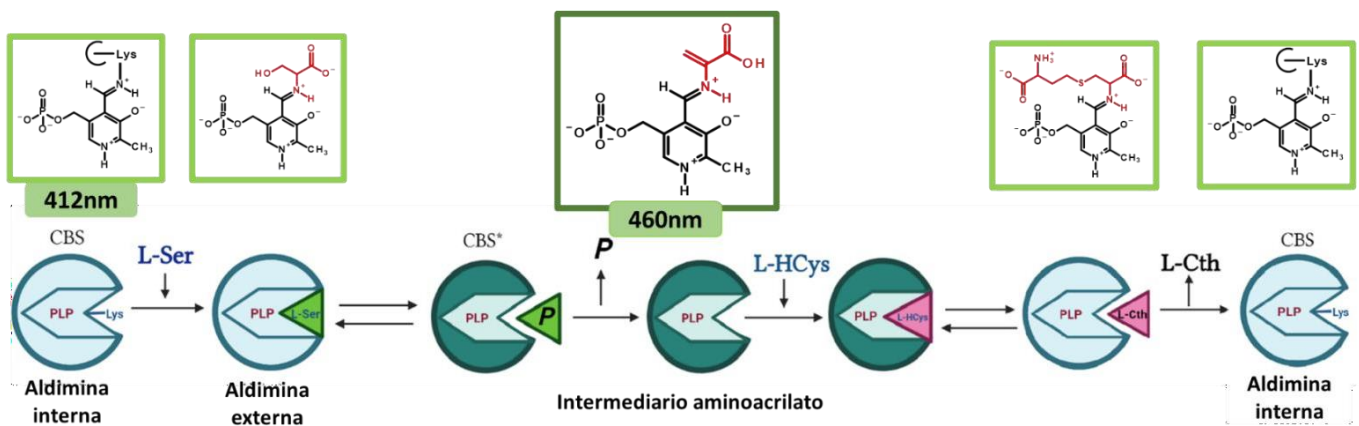


Figura 8.2. Mecanismo cinético de la reacción canónica de la cistationina β -sintasa (CBS). La serina (Ser) sustituye al residuo de lisina de la CBS generando una aldimina externa y provocando un cambio estructural en la enzima durante la formación del intermediario aminoacrilato (representado en CBS*) para la liberación de un primer producto. La homocisteína (HCys) puede unirse a la CBS* para liberar el segundo producto cistationina (Cth) y recuperar a la CBS en su forma original.

De acuerdo con el mecanismo de tipo ping-pong explicado anteriormente, la ecuación de velocidad de la CBS en su reacción canónica es la siguiente:

$$v = \frac{V_m[Ser][HCys]}{K_{HCys}[Ser] + K_{Ser}[HCys] + [Ser][HCys]}$$

Donde v es la velocidad de la reacción catalizada por CBS; V_m es la velocidad máxima; Ser y HCys son el primer y segundo sustrato respectivamente; K_{Ser} y K_{HCys} son las constantes de Michaelis-Menten para ambos sustratos.

9. Versatilidad catalítica de la CBS.

La CBS es una enzima con una amplia versatilidad catalítica, esto se debe a que puede unir aminoácidos con buenos grupos salientes en el carbono β para formar un intermediario aminoacrilato común, posteriormente puede unir moléculas nucleofílicas para generar aminoácidos nuevos (Figura 9.1).

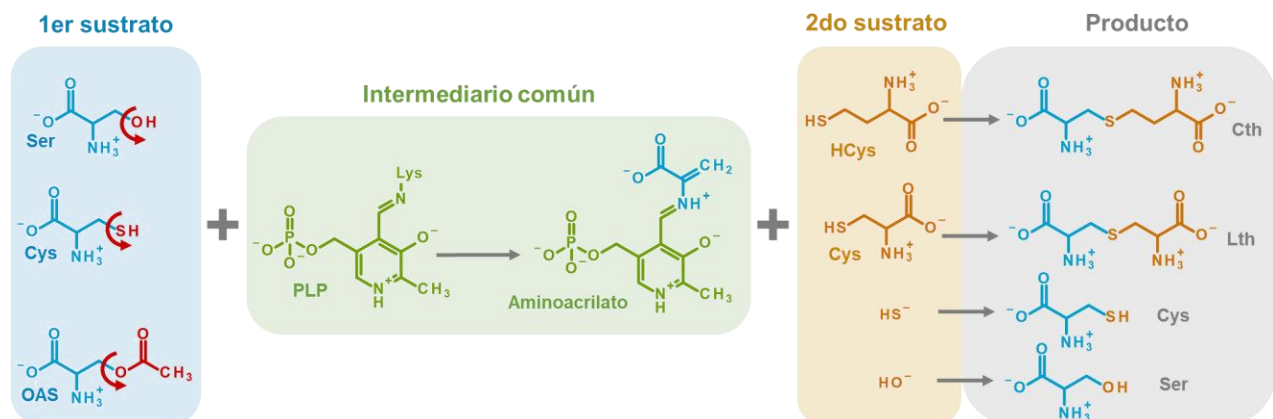


Figura 9.1. Versatilidad catalítica de cistationina β -sintasa (CBS). La unión de los primeros sustratos serina (Ser), cisteína (Cys), O-acetilserina (OAS) a la aldimina interna y la liberación de su grupo saliente llevan a la generación de un intermediario en común (aminoacrilato). La formación de este intermediario favorece la unión de los segundos sustratos nucleofílicos como son homocisteína (HCys), cisteína (Cys), bisulfuro (SH⁻) y anión hidróxido (OH⁻). Los productos posibles de la actividad de la CBS dependiendo del segundo sustrato nucleofílico son cistationina (Cth), lantionina (Lth), Cys y Ser.

La versatilidad catalítica de CBS plantea algunas cuestiones que son importantes de resolver para entender el papel que juega esta enzima en la homeostasis de la Cys en *T. cruzi*. Por ejemplo, la CBS puede catalizar la reacción entre Ser y SH⁻

para producir Cys, lo que podría representar una tercera vía de síntesis de Cys. La CBS también puede llevar a cabo la misma reacción que la CS de la vía de síntesis *de novo*; lo cual genera la pregunta ¿cuáles serían las condiciones para que actúe una enzima o la otra? Es de llamar la atención que además de participar en la síntesis de Cys, la CBS es capaz de consumir Cys para producir SH⁻ y Cth lo cual alimentaría tanto la vía de transulfuración inversa, como la vía de síntesis de *de novo*; sin embargo, esto resultaría en un posible ciclo inútil (Figura 9.2). Hasta la fecha, no se han descrito los parámetros cinéticos completos de reacciones no canónicas mediadas por CBS que pueden llevar a ciclos inútiles, por lo que resulta necesario caracterizarlas con el fin de evaluar su importancia en la síntesis de Cys y a nivel biológico.

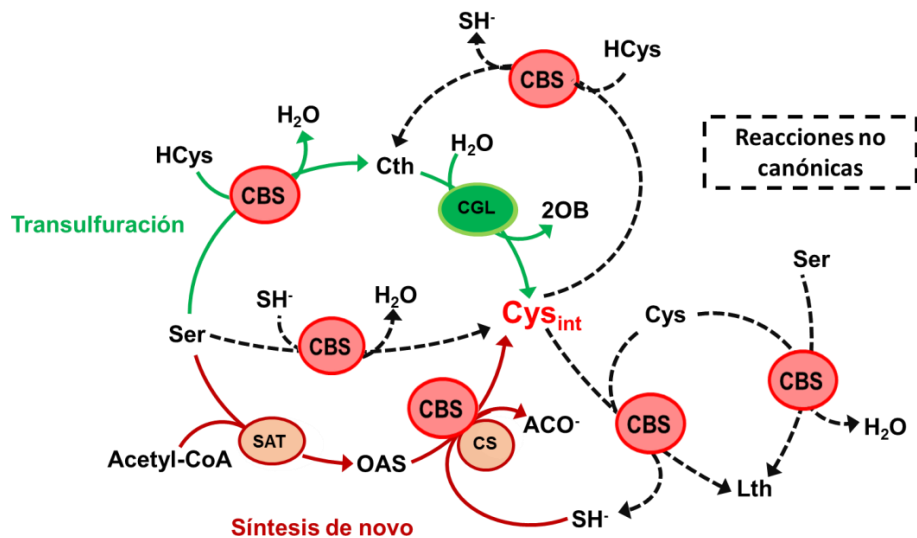


Figura 9.2. Posibles reacciones mediadas por la cistationina β -sintasa (CBS) en *T. cruzi*. La CBS puede catalizar reacciones no canónicas con serina (Ser), O-acetilserina (OAS) y cisteína (Cys) en presencia de homocisteína (HCys), sulfuro (SH⁻) y Cys para generar Cys, lantionina (Lth) o cistationina (Cth) que favorecen a su vez la propia síntesis de Cys. También puede llevar a cabo la reacción catalizada por cisteína sintasa (CS) en la vía de síntesis *de novo*.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de Chagas afecta a alrededor de 6 a 7 millones de personas en el mundo y en América en gran parte de las zonas rurales se estiman alrededor 12 mil muertes al año. Los fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad

de Chagas: Nifurtimox y Benznidazol; han demostrado efectividad durante la fase aguda de la enfermedad, y no así en fase crónica. Además, los efectos adversos durante el tratamiento provocan el abandono de este, por lo que es necesario buscar nuevas estrategias terapéuticas.

Las enzimas que participan en la síntesis de cisteína (Cys) son candidatos para desarrollar fármacos antichagásicos, esto se debe a que algunas de estas enzimas son exclusivas de *T. cruzi* o tienen diferencias sustanciales con las enzimas del hospedero. La cistationina β -sintasa (CBS) es una enzima que participa en la síntesis de Cys y que podría ser un buen blanco terapéutico debido a su diferencia estructural comparada con la presente en humanos y a su gran versatilidad catalítica.

La CBS actúa a través de un mecanismo cinético de tipo ping-pong y su reacción canónica consiste en la condensación de la Homocisteína (HCys) y la Serina (Ser) para la formación de Cistationina (Cth), constituyendo el primer paso para la síntesis de Cys en la vía de transulfuración inversa. Sin embargo, CBS puede catalizar reacciones usando múltiples sustratos como lo son la O-acetilserina (OAS), sulfuro (SH-) y Cys dando lugar a la formación de múltiples productos.

Aunque se han evaluado algunas reacciones no canónicas, no se ha realizado una caracterización cinética completa que permita entender su importancia dentro de las vías de síntesis de Cys. Por lo que a través de este trabajo se caracterizará cinéticamente a las reacciones no canónicas de CBS para evaluar su aporte a las vías de síntesis de Cys en *T. cruzi* y brindar un posible acercamiento al diseño de nuevas estrategias terapéuticas para la enfermedad de Chagas.

III. HIPOTESIS

La enzima CBS es capaz de catalizar las reacciones no canónicas con parámetros cinéticos comparables a los de su reacción canónica.

IV. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la cinética de las reacciones no canónicas de la CBS.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Purificar la CBS recombinante de *T. cruzi*
- Estandarizar los métodos analíticos utilizados para la cuantificación de los productos de la reacción canónica y no canónicas para la obtención de parámetros cinéticos confiables.
- Obtener los parámetros cinéticos utilizando sustratos canónicos y no canónicos de la CBS.

VI. METODOLOGÍA:

10. Purificación de CBS recombinante

Se cultivaron colonias de *E. coli* de la cepa Rosetta que contenían el vector de sobreexpresión p28 recombinado con el gen de CBS de *T. cruzi*. La inducción de se realizó en medio LB con IPTG 0.2mM a 24°C durante toda la noche. Las proteínas sobreexpresadas en el vector p28 contienen una etiqueta de 6 histidinas las cuales son utilizadas para realizar una purificación a través de una cromatografía de afinidad utilizando resinas que contienen metales, en nuestro caso utilizamos una resina que contenía cobalto (TALON® superflow™).

11. Cuantificación de proteína

El contenido de proteína de las preparaciones de CBS fue evaluado por el método de Lowry utilizando como referencia una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA). Previo a la cuantificación de proteína, las muestras fueron precipitadas

utilizando ácido tricloro acético (TCA) al 13% a 4°C durante toda la noche, esto para eliminar posibles interferencias en la técnica de Lowry como el glicerol y el imidazol (Figura 12.1) (Anexo I).

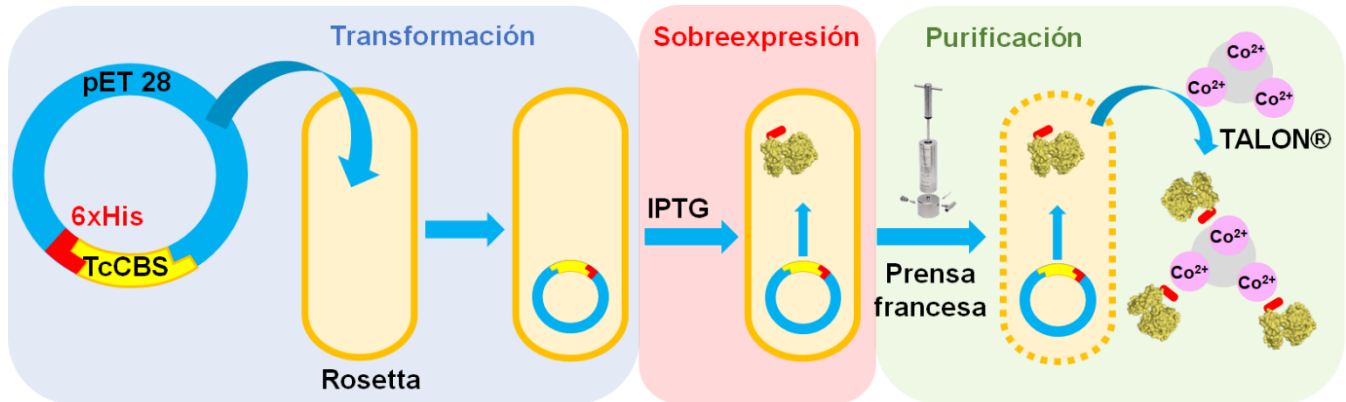


Figura 10.1. Esquema general para la obtención de CBS de *T. cruzi*. La transformación de células Rosetta con el vector pET 28 que contenía el gen de CBS de *T. cruzi* (TcCBS) permitió la sobreexpresión de la proteína al utilizar IPTG. Finalmente, la proteína fue purificada utilizando una cromatografía de afinidad por metales.

12. Identificación de la pureza e identidad de proteína

La evaluación de la pureza de las preparaciones de CBS se realizó mediante una electroforesis desnaturizante en gel de acrilamida al 10% (SDS-PAGE) con la CBS precipitada. Para la identificación se utilizó un marcador de masa molecular de 10 a 250KDa (PAGE Ruler Plus Prestained Protein Ladder, Thermofisher). Las imágenes de los geles fueron analizadas con el software Image J para calcular el porcentaje de pureza (figura 12.1) (Anexo I).

13. Interacción de CBS-sustrato

Los estudios de afinidad enzima-sustrato se realizaron mediante la técnica de diferencia espectral utilizando un espectrofotómetro a de haz dividido (Shimadzu UV-Vis 1900i) conservando una absorbancia constante de la CBS por repetición. Se incrementó la concentración de los sustratos sucesivamente para la medición de su afinidad a 10, 20, 50, 100, 200, 500, 800 y 1000 μM . (Figura 13.1) (Anexo I).

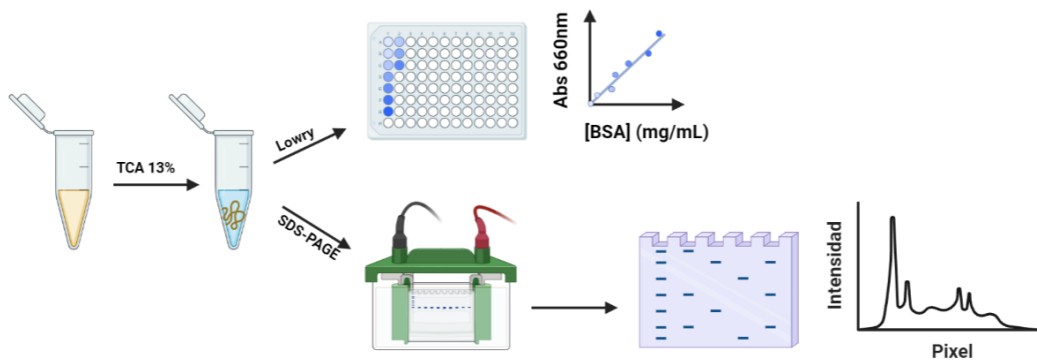


Figura 12.1. Análisis generales de las preparaciones de CBS. La concentración de proteína se determinó a través del método de Lowry y la pureza utilizando el análisis densitométrico de geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

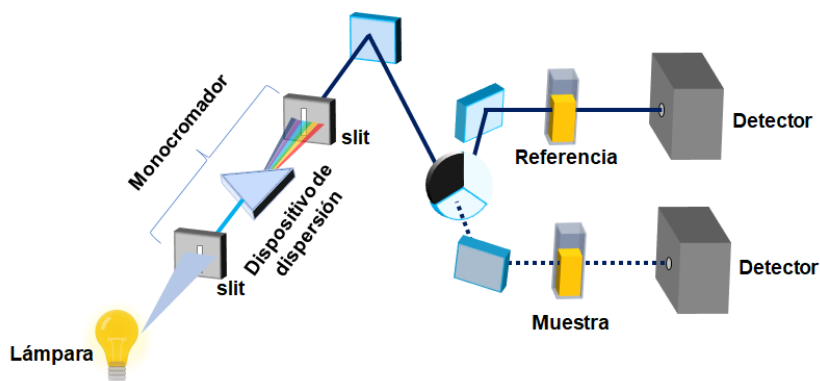


Figura 13.1. Esquema general del sistema de haz dividido. Este tipo de equipos se utilizó en los estudios de unión enzima-sustrato

14. Cinética de reacciones de la CBS

La caracterización cinética de las reacciones de CBS se realizaron en ensayos continuos y de punto final. Para la cuantificación de Cth y Cys se utilizó la técnica de derivatización con ninhidrina en condiciones ácidas usando una mezcla de HAcO / H₃PO₄ 2:1 para la cuantificación de Cth y una mezcla de HAcO/ HCl 2:1 para la cuantificación de Cys (Figura 14.1). La velocidad de la reacción canónica en sentido inverso se determinó utilizando un reactivo general de grupos tiol como el ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) en un ensayo cinético continuo (Figura 14.1).

Para la cuantificación de SH⁻ se utilizó la derivatización con dimetil-4- fenilendiamina (DMPD) que da lugar a la formación de azul de metileno. Las condiciones experimentales para determinar la linealidad del ensayo con respecto al tiempo y la concentración de proteína fue probada en la estandarización de la metodología (Figura 14.1). Posteriormente, se llevó a cabo la variación de sustratos para el cálculo de los parámetros cinéticos.

Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo en amortiguador HEPES 40 mM EDTA 1mM pH 7.4 a 37°C. La mezcla de reacción contenía PLP 0.1 mM, el primer sustrato (Ser, OAS o Cys) en un intervalo de concentración de 0.5-10 mM y CBS (0.01-0.02 mg/mL). El arranque de la reacción se dio a partir de la adición del segundo sustrato en un intervalo de concentración de 0.5-10 mM para el caso de HCys y un intervalo de 0.5 a 2 mM para el SH⁻. Para los ensayos de punto final se tomaron muestras a diferentes tiempos y se mezclaron rápidamente con la solución ácida de ninhidrina.

La reacción con ninhidrina para desarrollar el complejo colorido se llevó a cabo al incubar las mezclas ácidas en baño María durante 10 min para la detección de Cys y 20 min para la detección de Cth. Una vez enfriada la mezcla con ninhidrina, las reacciones se transfirieron a placas de 96 pozos para su lectura de absorbancia a 455 nm para Cth y 560 nm para Cys (Gaitonde, 1967). Con respecto a la técnica de medición del producto SH⁻, las muestras de la reacción se colocaron en una placa de 96 pozos con una mezcla de DMPD 1 mg/mL en HCl 5 N y FeCl₃ 0.0115 M en HCl 0.6 N (Kong & Salin, 2012). Durante el muestreo e incubación la placa se mantuvo en oscuridad debido a la fotosensibilidad del producto. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min y transcurrido este tiempo se leyeron las absorbancias a 670 nm. Las técnicas colorimétricas utilizadas en este trabajo se describen con mayor detalle en el Anexo I.

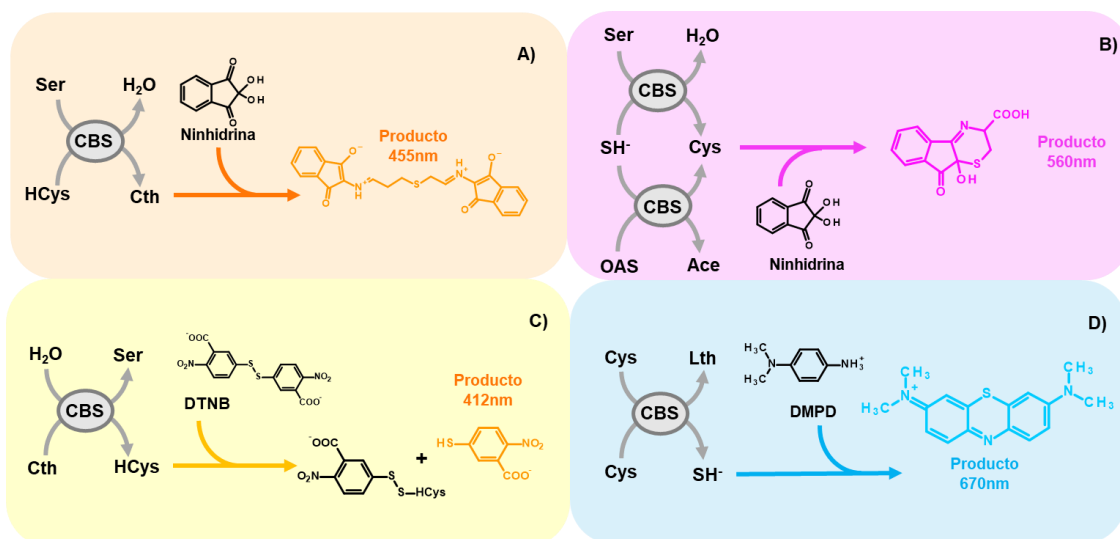


Figura 14.1. Métodos colorimétricos estandarizados para estimar los parámetros cinéticos de las reacciones de cistationina β-sintasa (CBS). La ninhidrina es un compuesto de identificación de aminoácidos. **A)** En condiciones ácidas con ácido acético (HAcO) y ácido fosfórico (H₃PO₄) puede reaccionar de forma selectiva con Cistationina (Cth) formando un complejo de color naranja medible a 455 nm, **B)** mientras que en presencia de HCl puede reaccionar con Cisteína (Cys) para la formación de un complejo de color rosa medible a 560 nm (Gaitonde, 1967). **C)** La reacción canónica en sentido inverso puede ser determinada con un reactivo general de grupos tiol como el DTNB. **D)** El DMPD en condiciones ácidas (HCl 5 N, FeCl₃ 0.0115 M en HCl 0.6 N) permite la formación de azul de metileno en presencia de SH⁻, esta reacción es medible a 670 nm (Kong & Salin, 2012).

15. Evaluación de la estabilidad de OAS

Con la finalidad de tener la mayor certeza posible en los datos generados durante este trabajo, se utilizaron reactivos de alta calidad y en la medida de lo posible se caracterizó su concentración real y su pureza. Uno de los reactivos que podría ser inestable en solución acuosa es la OAS, debido a que el grupo éster presente en la molécula podría ser susceptible de hidrólisis, lo que resultaría en la formación de Ser y acetato. Esto sería un inconveniente para los ensayos enzimáticos debido a que la Ser es un sustrato de CBS.

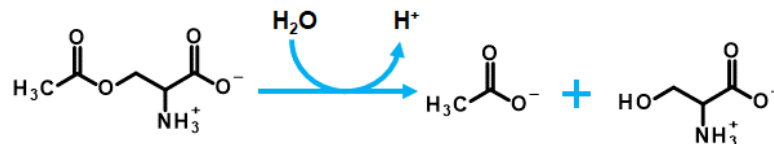


Figura 15.1. La hidrólisis de la O-acetilserina (OAS) forma acetato (Ace) y serina (Ser).

Para determinar la estabilidad de la OAS se utilizó una columna “Phenomenex” 5u C18 110^a, 150 x 4.60 mm 5 micrón para HPLC y se preparó una solución 1 mM del aminoácido en amortiguador de EDTA 1 mM, Tris 1 mM, MES 1mM y HEPES 20 mM, pH 7.4 para cuantificar mediante la formación de complejos con o-ftaldialdehído (OPA 5 mg/mL en 50 μ L MeOH, 50 μ L β -mercaptoetanol, 900 μ L de ácido bórico 0.4 M pH 9.0) (García-García *et al.*, 2018) empleando un detector de fluorescencia (λ_{ex} 340nm, λ_{em} 460nm) Waters 2475 (Figura 15.2). Para la separación se utilizó un gradiente de dos fases, una acuosa y una orgánica, la fase acuosa consistió en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.8 y la fase orgánica estaba constituida de una mezcla de Metanol / Acetonitrilo / H₂O (1:1:2) (Anexo I)

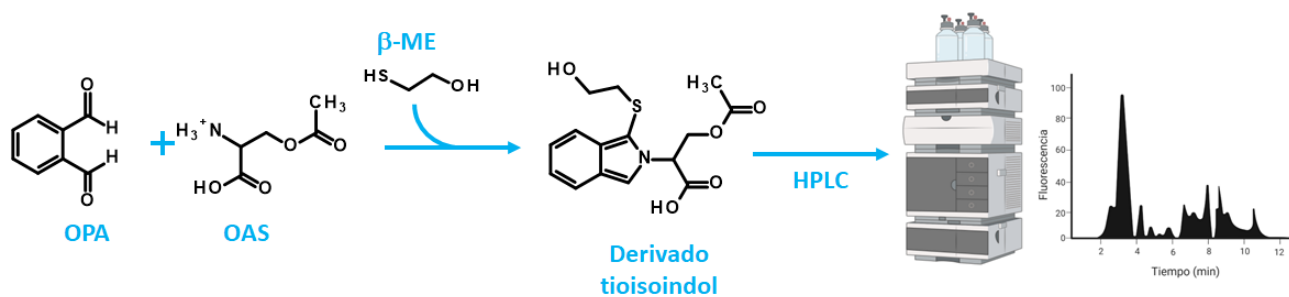


Figura 15.2. Derivatización de O-acetilserina (OAS) con O-ftaldialdehído (OPA) y β -mercaptoetanol (β -ME) para su análisis cromatográfico.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

16. Purificación, cuantificación e identificación de la CBS

La CBS en *T. cruzi* forma un homotetrámero con una masa molecular de 155KDa (Nozaki et al. 2001), por lo que cada monómero tendría una masa de 38.75 KDa. El gel obtenido de la electroforesis SDS-PAGE para la CBS recombinante purificada en las repeticiones 1, 2 y 3 (Figura 16.1), muestra que la banda principal tiene un peso que se encuentra entre la marca de los 35 y 55KDa, coincidiendo con lo reportado por Nozaki *et al.* (2001).

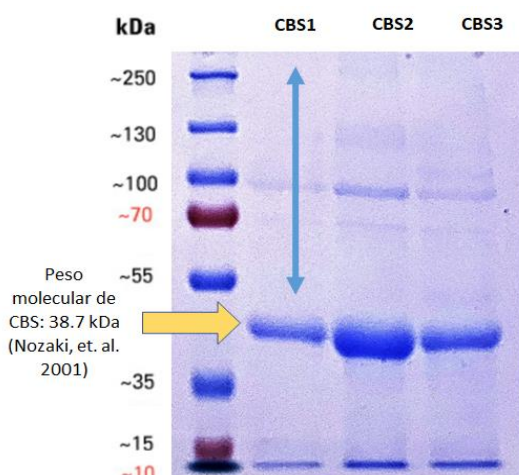


Figura 16.1. Electroforesis en SDS-PAGE al 10%. $PM_{CBS} = 38.7$ kDa por subunidad. N1, N2 y N3 corresponden a preparaciones de muestras independientes.

La cuantificación de la pureza se realizó mediante el análisis densitométrico del gel de acrilamida con el software Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). Se obtuvieron porcentajes de pureza de alrededor del 90% para las preparaciones realizadas. (Figura 16.2).

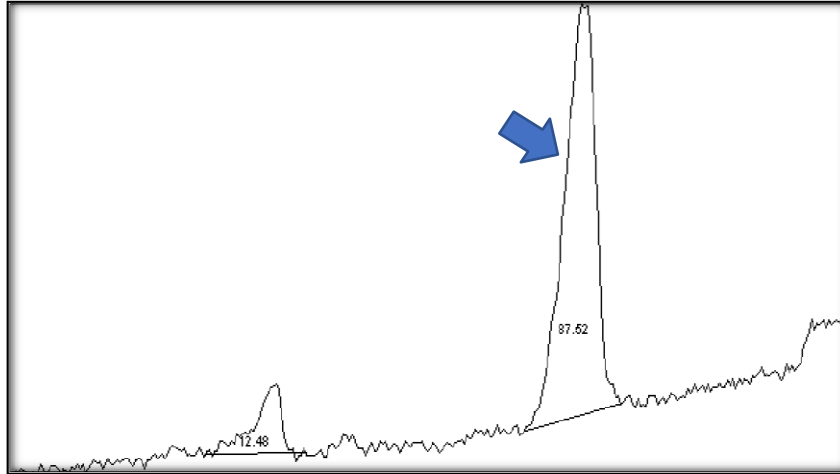


Figura 16.2. Análisis densimétrico del gel obtenido de la electroforesis SDS-PAGE en el software Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). Los picos de mayor área corresponden a las marcas de mayor intensidad del gel (38.7 kDa-flecha azul).

La cuantificación de proteína de la CBS recombinante se realizó mediante el método de Lowry y se cuidó que la señal de las muestras estuviera en un intervalo lineal de cuantificación, lo cual se logró mediante la realización de una curva patrón, empleando albúmina sérica bovina como estándar (Figura 16.3).

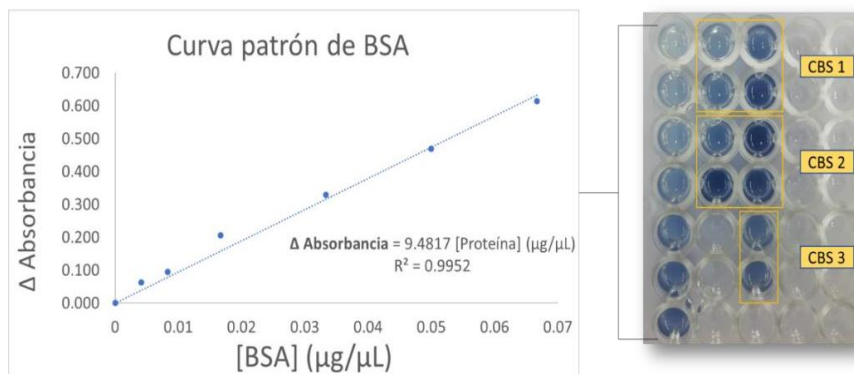


Figura 16.3. Curva patrón de albúmina sérica bovina [BSA] y cuantificación de proteína con el método de Lowry.

Se obtuvo una mayor concentración de proteína para CBS N1 y N2 con respecto a N3; las absorbancias se encontraron entre 0.200 y 0.700. La [CBS] (mg/mL) para cada muestra se muestra en la tabla 16.4.

Tabla 16.4. Concentración y pureza de la CBS purificada por triplicado.

Muestra de CBS	[Proteína] (mg/mL)	Pureza(%)
N1	48	93
N2	111	88
N3	30	90

Respecto a la concentración y pureza de la proteína purificada se puede observar de acuerdo con la tabla 16.4 que se obtuvieron concentraciones variables de la CBS recombinante, con un porcentaje de pureza de aproximadamente el 90%.

17. Interacción CBS-Sustrato

Para medir la interacción de los sustratos de estudio con CBS se emplearon estudios de afinidad por el método descrito en el apartado 13. La absorbancia a 460 nm (intermediario amino acrilato) es registrada y graficada contra la concentración del sustrato (Figura 17.1) observándose un comportamiento hiperbólico que permitió estimar la constante de disociación del complejo enzima-sustrato.

Los espectros de la Figura 17.1 en los paneles A-C muestran que existe unión de los sustratos a la aldimina interna de CBS por el cambio notable en la absorbancia a 460 nm que indica la formación del intermediario aminoacrilato. Al graficar el cambio en la absorbancia a 460 nm respecto a la concentración de sustrato, se obtuvo un comportamiento hiperbólico que puede ser descrito por la siguiente ecuación:

$$\Delta Abs_{460nm} = \frac{\Delta Abs_{max}[sustrato]}{Kd + [sustrato]}$$

Donde ΔAbs_{max} es el cambio de absorbancia cuando la $[sustrato] \rightarrow \infty$. La Kd es una constante de disociación definida como: $Kd = [E][S]/[ES]$. En los espectros de la figura 17.1 en los paneles A-C se observa que existe unión de los sustratos a la aldimina interna de CBS por el cambio notable en la absorbancia a 460nm.

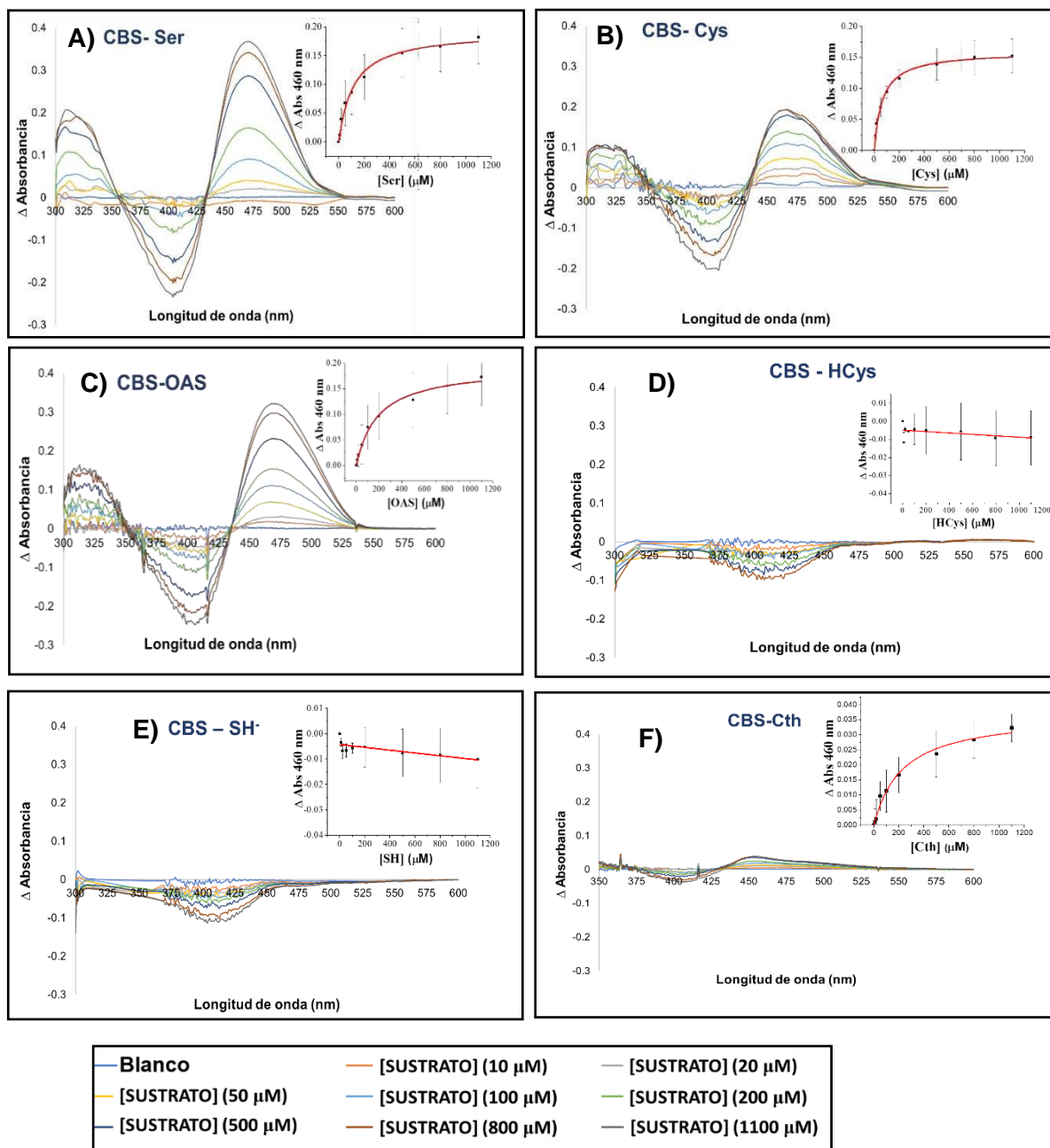


Figura 17.1. Espectros de interacción enzima-sustrato. Los paneles **A**, **B** y **C** corresponden a los espectros de interacción con los sustratos serina (Ser), cisteína (Cys) y O-acetil serina (OAS), respectivamente. Los paneles **D** y **E** corresponden a los espectros de interacción con los sustratos nucleofílicos homocisteína (HCys) y bisulfuro (HS), respectivamente. El panel **F** corresponde al espectro de interacción con el producto cistationina (Cth). En cada panel se muestra insertado un gráfico de la Abs a 460nm (señal del aminoacrilato) vs la concentración de cada compuesto.

En los paneles D y E (correspondientes a los sustratos nucleofílicos) de la Figura 17.1 no se observa un incremento en la absorbancia de 460 nm, por lo que el comportamiento del gráfico de absorbancia con respecto a la concentración de sustrato es una línea constante indicando que estos sustratos no forman el intermediario aminoacrilato. Finalmente, en el panel F de la Figura 17.1 se muestra el espectro de interacción con el producto Cth, y se puede observar un ligero incremento en la absorbancia de 460 nm lo cual indica que existe la posibilidad de generar el intermediario aminoacrilato.

Tabla 17.2 Constante de disociación (Kd) para los sustratos estudiados en la cistationina β -sintasa (CBS).

Sustrato	$\Delta \text{Abs}_{\text{max}}$	Kd (μM)
Ser	0.19 ± 0.01	114 ± 15
Cys	0.15 ± 0.002	64 ± 4
OAS	0.19 ± 0.01	190 ± 26
H ₂ S	ND	ND
HCys	ND	ND
Cth	0.04 ± 0.01	161 ± 45

ND: No detectada, Ser (serina), Cys (cisteína), OAS (O-acetilserina), H₂S (sulfuro), HCys (Homocisteína) y Cth (Cistationina).

18.2 Estudios cinéticos de la CBS

Variación de la concentración de proteína

Con el objetivo de establecer las condiciones óptimas de los ensayos cinéticos, se realizaron ensayos donde se seguía la formación de producto a través del tiempo y variando la concentración de proteína.

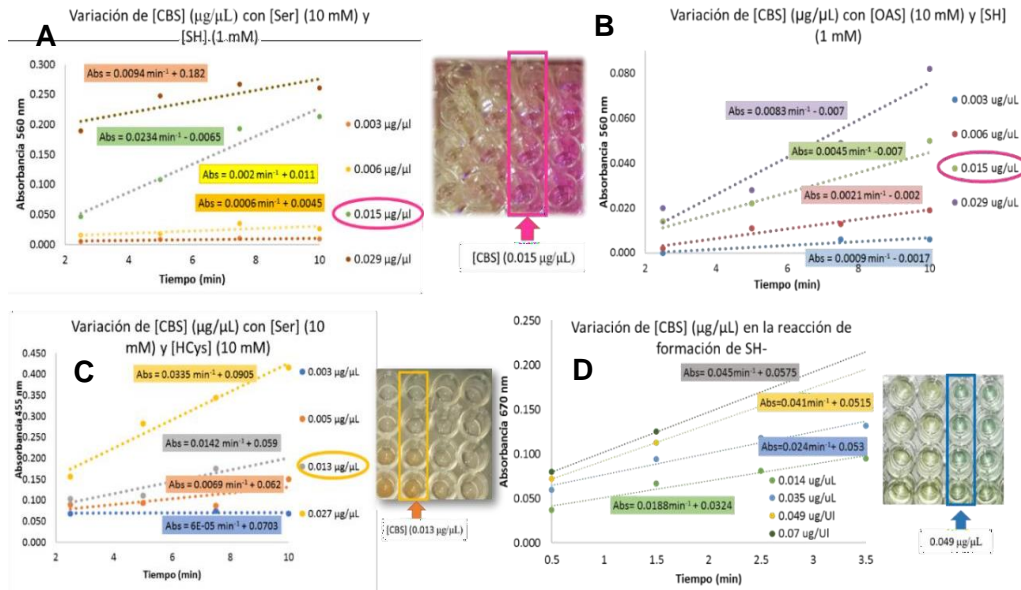


Figura 18.1. Establecimiento de las condiciones óptimas de los ensayos enzimáticos. **A)** Ser + SH $^-$ \Rightarrow OH $^-$ + Cys; **B)** OAS + SH $^-$ \Rightarrow Ace + Cys; **C)** Ser + HCys \Rightarrow H $_2$ O + Cth; y **D)** Cys + Cys \Rightarrow SH $^-$ + Lth.

Cinética de la reacción canónica e inversa de la CBS

La reacción canónica de CBS pudo caracterizarse cinéticamente en los dos sentidos de la reacción. En la figura 18.2 se presentan los gráficos de variación de la velocidad en el sentido de la formación de cistationina (Cth) con respecto a la concentración de los sustratos. A partir de los datos obtenidos de esta cinética de saturación, se pudieron estimar los parámetros cinéticos de K_m ($K_{\text{Ser}} 3.6 \pm 1.7$ mM; $K_{\text{HCys}} 1.4 \pm 0.5$ mM) y una k_{cat} de 698 ± 154 min $^{-1}$, lo cual quiere decir que la CBS puede completar 698 ciclos catalíticos de la reacción canónica cada minuto, o en otras palabras tarda 0.09 s en completar un ciclo catalítico de formación de Cth a partir de los sustratos Ser y HCys (Tabla 20.5).

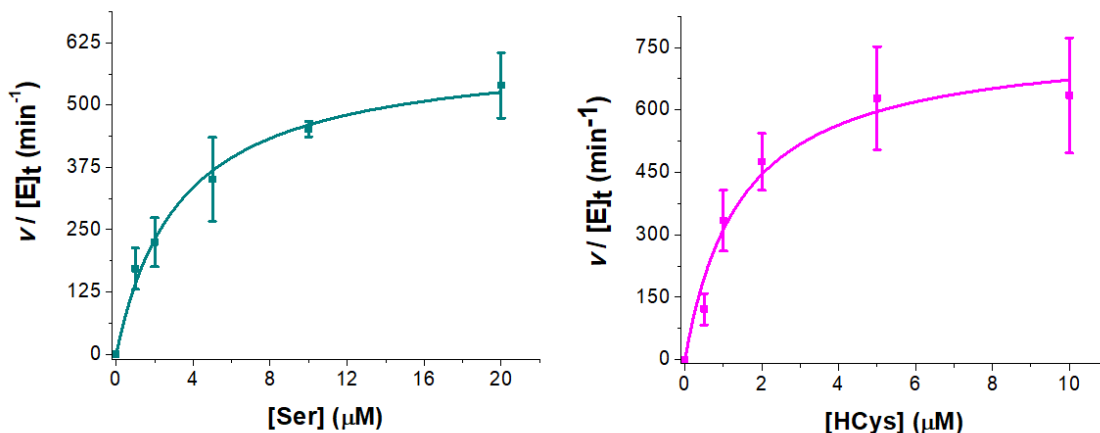


Figura 18.2. Cinética de saturación de la reacción canónica de cistationina β -sintasa (CBS). Los puntos son el promedio de los valores de velocidad inicial obtenido en tres experimentos independientes. La curva se obtuvo mediante el ajuste no lineal de estos datos a la ecuación de Michaelis Menten. **A)** homocisteína [HCys] variable y serina fija a 20 mM, **B)** [Ser] variable y [HCys] fija a 10 mM.

De acuerdo con Nozaki *et al.*, 2001, la Cth es hidrolizada por la cistationina γ liasa (CGL) en la segunda reacción de la vía de transulfuración inversa para el suministro de Cys. Sin embargo, estructuralmente además de poseer un carbono γ que favorece dicha reacción, la CBS puede actuar sobre el carbono β favoreciendo así a la reacción reversa de la reacción canónica (Figura 18.3).

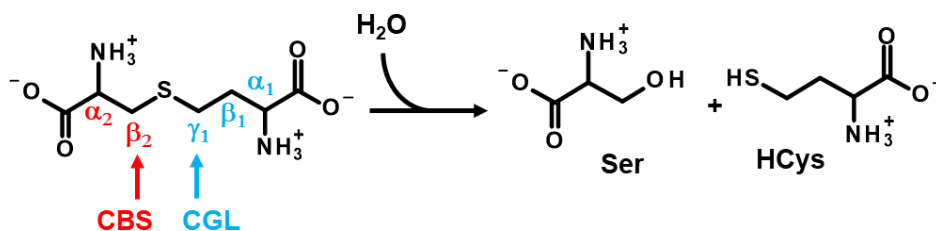


Figura 18.3. Reacción reversa de cistationina β -sintasa (CBS). La cistationina (Cth) es una molécula asimétrica sobre la cuál la CGL puede llevar a cabo la reacción de hidrólisis al actuar sobre el carbono γ , o favorecer la reacción reversa de CBS para la producción de serina (Ser) y homocisteína (HCys).

La cinética obtenida de la reacción reversa de CBS produce un patrón de inhibición por sustrato (Figura 18.5), por esta razón, planteamos tres modelos que pudieran explicar el comportamiento obtenido (Figura 18.4). Los modelos de inhibición por sustrato pueden ser competitiva, incompetitiva y mixta, de estos tipos de inhibición sólo la incompetitiva y la mixta muestran un patrón similar a la cinética de hidrólisis de Cth por CBS, por lo que se realizaron los ajustes a ambos modelos (Figura 18.5).

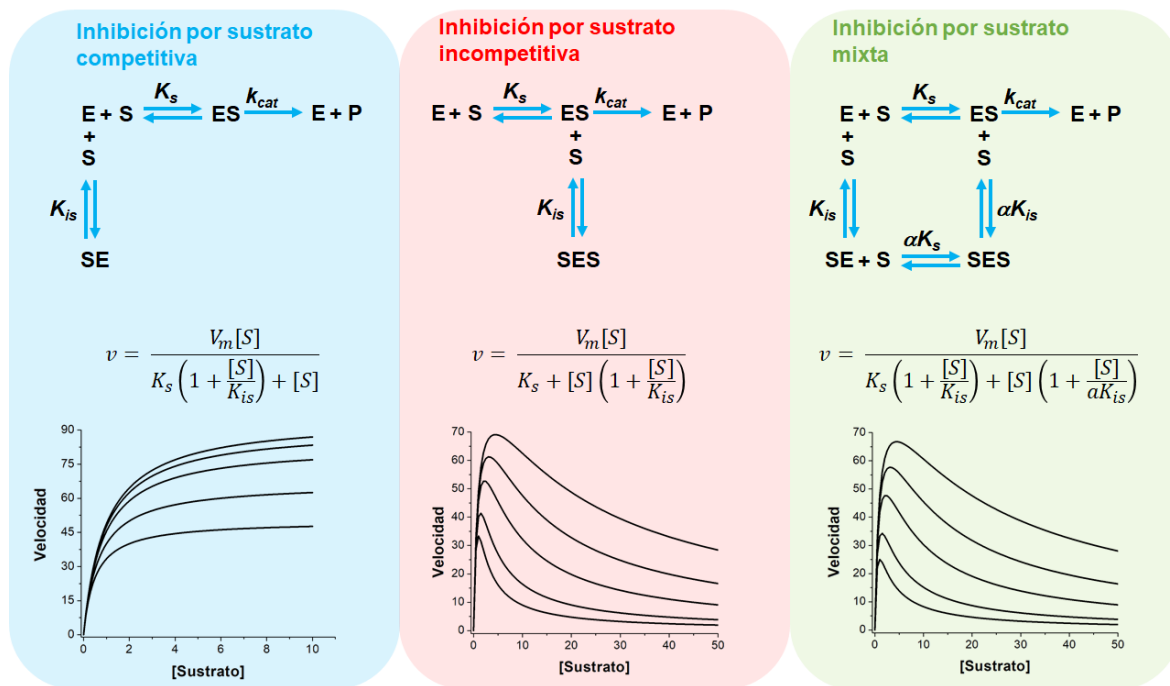


Figura 18.4. Tipos de inhibición por sustrato, ecuaciones de velocidad deducidas considerando una aproximación de equilibrio rápido y una simulación de la ecuación de velocidad llevada a cabo en origen 8®. Las simulaciones consideraron $V_m = 100$, $K_s = 1$, $K_{is} = 1-20$ y $\alpha = 1$.

Ambos modelos de inhibición por sustrato, incompetitiva y mixta, muestran ajustes similares a los datos experimentales y sin más evidencia experimental o teórica, no es posible discernir entre ambos modelos. En la tabla 18.1 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos en cada ajuste.

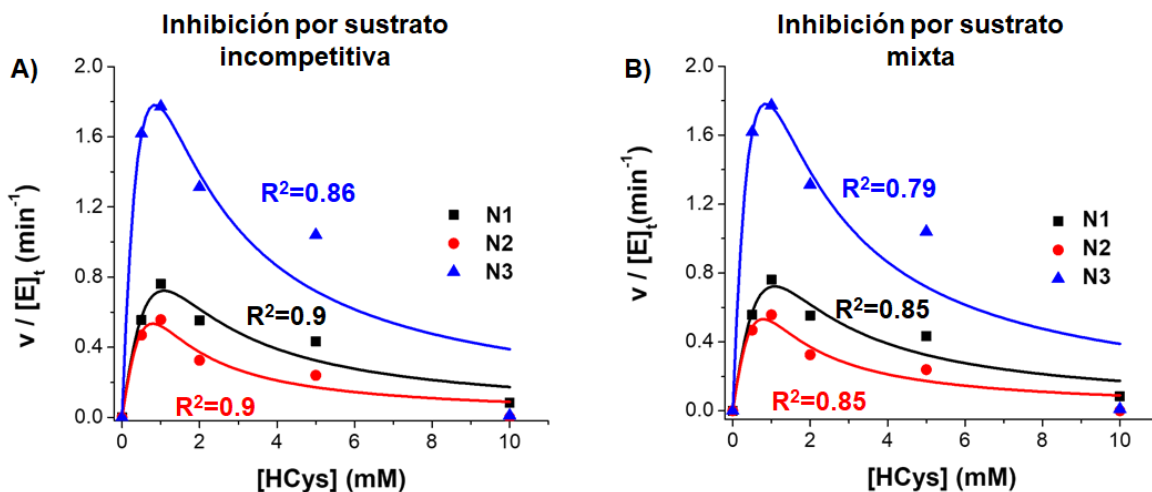


Figura 18.5. Cinética de la reacción reversa de CBS. Los puntos corresponden a tres experimentos independientes ajustados a la ecuación de inhibición por sustrato incompetitiva (A) y a la inhibición por sustrato mixta (B). En cada curva se presenta el valor del factor de correlación R^2 del ajuste obtenido con el software origin 8®.

Tabla 18.1. Parámetros cinéticos de la reacción inversa de CBS

Parámetro cinético	ISIC	ISM
k_{cat}	6.8 ± 2.1	9.8 ± 1.9
K_{Cth}	3.5 ± 2.6	5.1 ± 3.3
K_{iCth}	0.4 ± 0.3	7 ± 0.9
α	----	0.04 ± 0.03

ISIC = Inhibición por sustrato incompetitiva; ISM = Inhibición por sustrato mixta

Según los datos de inhibición por sustrato, la CBS puede catalizar entre 7-10 reacciones por unidad catalítica cada minuto en la reacción reversa (Figura 18.5) y tarda entre 6-9s en completar un ciclo; es decir, esta reacción es alrededor de 60 veces más lenta comparada con la forward en la que la CBS tarda tan solo 0.5 s en completar un ciclo catalítico.

19. Estudio cinético de las reacciones no canónicas de la CBS

Evaluación de las reacciones de producción de Cys: Ser+H₂S y OAS+ H₂S

La Ser y la OAS se unen a la aldimina interna de la CBS mientras que el H₂S es un buen nucleófilo que de acuerdo con el ciclo catalítico puede interactuar con la CBS a partir de la modificación de su sitio activo para la nueva generación de una aldimina externa. Las reacciones catalizadas por la CBS entre Ser- H₂S y OAS-H₂S se representan en la figura 19.1

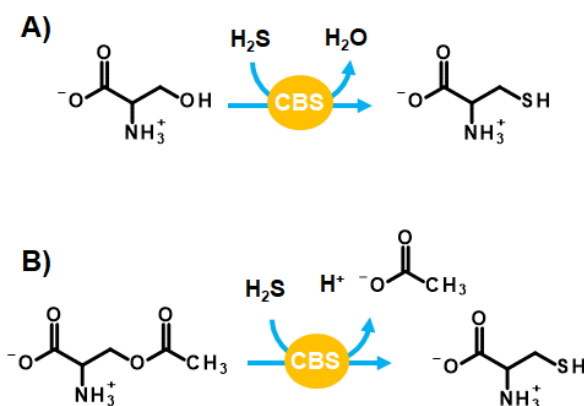


Figura 19.1. A) Reacción entre Serina (Ser) y Sulfuro (SH⁻) catalizada por CBS. Además, esta reacción entre Ser y SH⁻, es catalizada originalmente por la cisteína sintasa (CS) en la vía de síntesis de *novo*. **B)** Reacción entre O-Acetilserina (OAS) y Sulfuro (SH⁻) catalizada por CBS, que lleva a la producción de Cisteína (Cys).

Para las reacciones de producción de Cys, los valores estimados de K_m para Ser mM y OAS son 2 ± 1 y 5.4 ± 3.7 mM, respectivamente; mientras que la K_m estimada para H₂S es 2.5 ± 1.6 mM para la reacción con Ser y 1.5 ± 0.6 mM para la reacción con OAS (Figura 19.2) (Tabla 21.1). La diferencia más significativa entre las dos reacciones es la k_{cat} , teniendo 769 ± 216 reacciones por min cuando la reacción es con Ser y 155 ± 61 reacciones por min cuando la reacción se lleva a cabo con OAS (Figura 19.2) (Tabla 21.1).

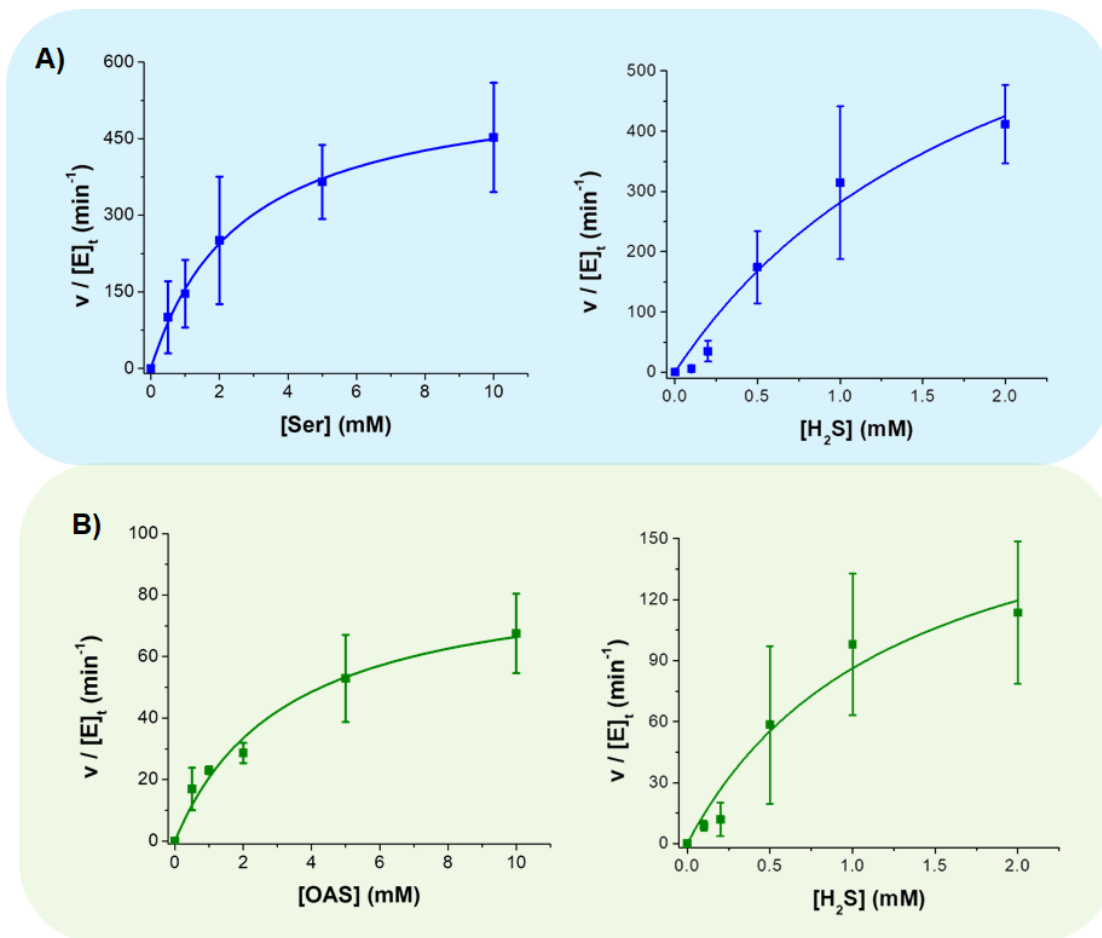


Figura 19.2. Cinética de las reacciones no canónicas que producen cisteína. A) Ser + H₂S ⇌ Cys + H₂O; B) OAS + H₂S ⇌ Cys + Ace

Evaluación de la reacción de producción de H₂S

La reacción de Cys catalizada por CBS lleva a la producción de Lth y SH⁻ (Figura 19.3).

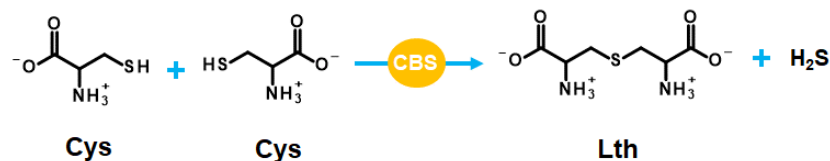


Figura 19.3. Reacción de catalizada por CBS con Cys como sustrato. La condensación de dos moléculas de Cys conduce a la formación de Lth y H₂S, este último puede ser detectable por el método de DMPD a 670 nm, mediante la formación de un complejo con H₂S para la producción de azul de metileno.

En la reacción de formación de H_2S a partir de Cys, la CBS cataliza 27 pasos de sustrato a producto por unidad catalítica por minuto (Figura 19.4); es decir, en 0.04 segundos completa un ciclo catalítico.

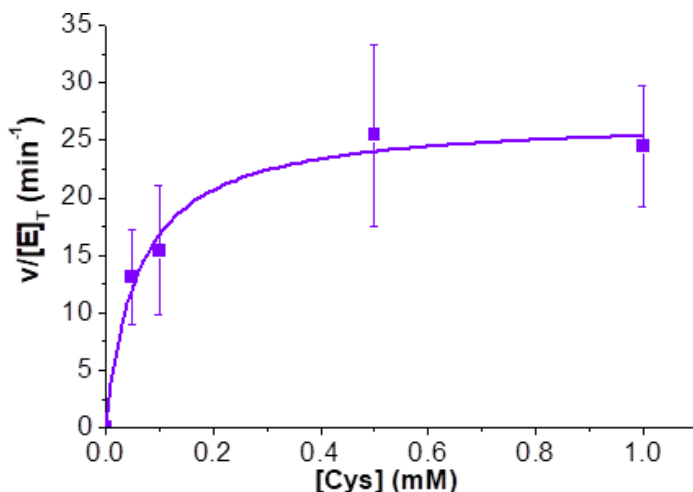


Figura 19.4. Gráfico de obtención de la K_{cat} de la reacción no canónica de CBS con Cisteína (Cys). La producción de Sulfuro (SH^-) a partir de Cys se completa en un ciclo catalítico con duración de 0.04 s.

20. Inhibición de la formación de H_2S por Ser

La Cys puede unirse a la CBS como primer sustrato al tener un buen grupo saliente, pero también es un buen nucleófilo, por lo que puede actuar como primer sustrato (formando el aminoacrilato) y como segundo sustrato (formando un producto nuevo) (Figura 20.1). La versatilidad catalítica de la CBS permite que la Ser pueda actuar como primer sustrato y formar el intermediario aminoacrilato. El aumento en la concentración de Ser podría desplazar el equilibrio de la reacción cinética hacia la formación del aminoacrilato con Ser en lugar de la Cys, evitando así la formación de H_2S (Figura 20.1).

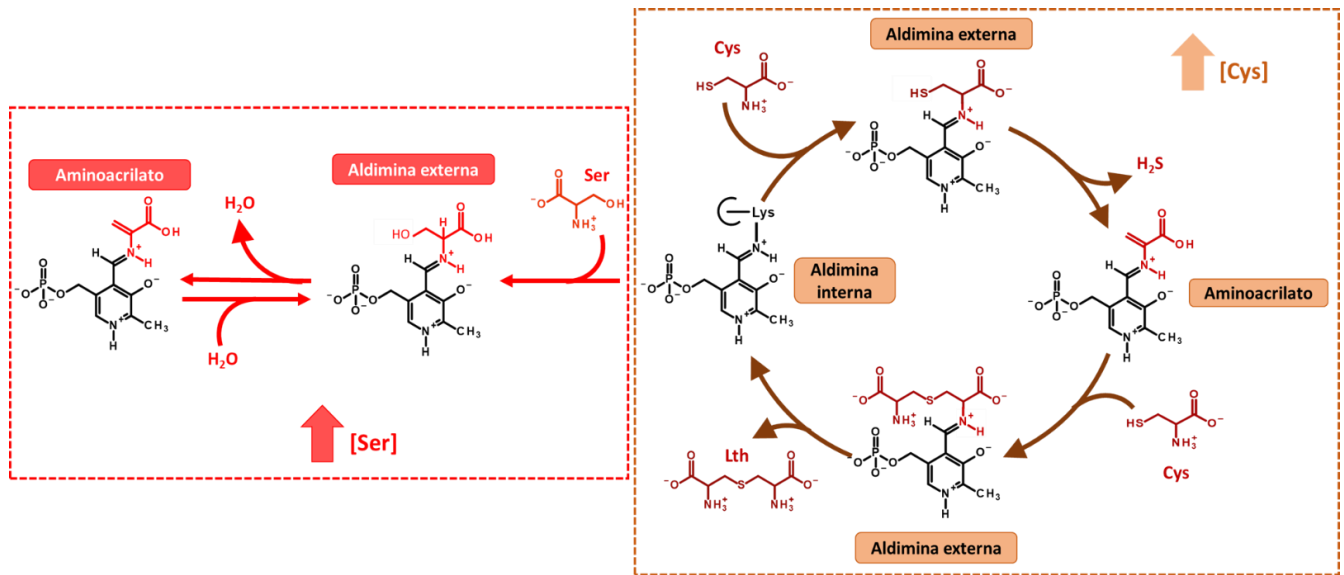
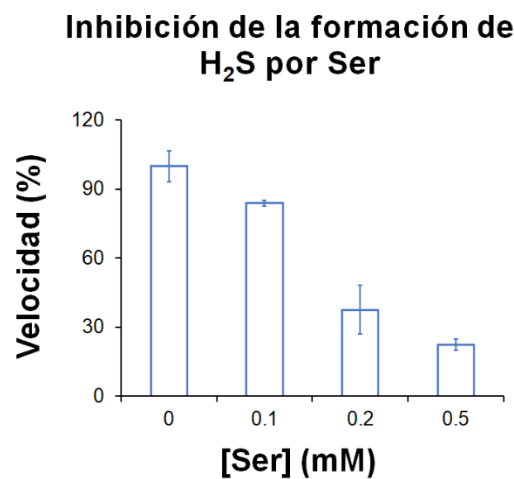


Figura 20.1. Vía de formación de Sulfuro (H₂S) y Lantionina (Lth) por la CBS a partir de Cisteína (Cys) en contraste con la reacción a partir de Serina (Ser). El aumento en la concentración de Ser podría provocar la disminución en la producción de H₂S.

Para evaluar la inhibición de la reacción CBS-Cys por Ser, se determinó la concentración de sulfuro producido por el método de DMPD (descrita en el apartado 14) obteniendo una disminución notable en la velocidad de formación de H₂S, conforme aumenta la concentración de Ser en el ensayo (Figura 20.2).

Figura 20.2. Inhibición de la producción de Sulfuro (H₂S) por la Serina (Ser). Los ensayos se hicieron en presencia de Cisteína (Cys) 1mM.



El H₂S es una molécula central en el metabolismo de Cys y cuyo papel fisiológico está comenzando a entenderse en mamíferos, sin embargo, el papel fisiológico que juega el H₂S y su regulación en *T. cruzi* es totalmente desconocido. En nuestro conocimiento este es el primer reporte donde se observa que la Ser puede inhibir la producción de H₂S, lo que sugiere que la proporción entre Cys/Ser podría ser un tipo de regulación donde al incrementar la concentración de Cys se tendría un incremento en la concentración de H₂S, mientras que se obtendría el efecto contrario al aumentar Ser.

21. Comparación de las reacciones no canónicas de la CBS

La tabla 21.1 presenta el resumen de los parámetros cinéticos obtenidos a partir de los ajustes no lineales de la reacción canónica, así como las reacciones no canónicas de CBS.

Tabla 21.1 Parámetros cinéticos de las reacciones catalizadas por CBS.

Reacción	Sustrato	K_m (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹)
HCys + Ser ⇌ *Cth + H ₂ O	HCys	1.4 ± 0.5	698 ± 154	545 ± 75
	Ser	3.6 ± 1.7		192 ± 15
Cth + H ₂ O ⇌ *HCys + Ser	Cth	$K_m = 3.5 ± 2.6$ $K_i = 0.4 ± 0.3$	7 ± 2	3 ± 2.5
Ser + H ₂ S ⇌ *Cys + H ₂ O	H ₂ S	2.5 ± 1.6	769 ± 216	423 ± 182
	Ser	2 ± 1		309 ± 96
OAS + H ₂ S ⇌ *Cys + Ace	H ₂ S	1.5 ± 0.6	155 ± 61	157 ± 98
	OAS	5.4 ± 3.7		25 ± 10
Cys + Cys ⇌ *H ₂ S + Lth	Cys	0.15 ± 0.1	27 ± 6	180 ± 22

*Productos monitoreados para la determinación de los parámetros cinéticos

En comparación con la reacción canónica de formación de Cth, la reacción reversa de la CBS es considerablemente más lenta de acuerdo con las k_{cat} de ambas reacciones, por lo que esta reacción estaría favorecida en el sentido hacia adelante. Otra característica a destacar es que la reacción canónica en sentido inverso presenta una cinética de inhibición por sustrato.

La Ser, es sustrato en la reacción canónica de la CBS pero también participa en la reacción de formación de Cys en presencia de H₂S. Esta reacción presenta parámetros cinéticos similares a la reacción canónica, sin embargo la K_m de CBS por H₂S es cercana a 2mM y la concentración intracelular en varios modelos celulares se estima en el rango de 20-160-μM (Marciano, *et. al.* 2012), por lo que se espera que la contribución de esta reacción a la concentración de Cys sea muy limitada.

Por otro lado el H₂S es utilizado como sustrato en la reacción con OAS para la producción de Cys en una reacción más lenta en comparación con la de Ser- H₂S, sin embargo, la K_m por H₂S también se encuentra alrededor de 2mM, por lo que tampoco se espera que esta reacción sea importante para la producción de Cys.

En lo que respecta a la reacción de producción de H₂S por la condensación de dos moléculas de Cys, al parecer si podría suceder en un contexto celular, ya que la concentración de Cys en *T. cruzi* es de alrededor de 500μM (Vazquez, *et. al.* 2017) y la K_m por Cys fue de 150μM. Por lo que adquiere más relevancia la inhibición de la producción de H₂S por Ser y es importante obtener una caracterización cinética completa de este hecho para valorar el posible papel regulatorio de Ser en la concentración de H₂S.

VIII. CONCLUSIONES

El estudio cinético de las reacciones de CBS nos permiten concluir que las reacciones no canónicas de la CBS recombinante son comparables con la reacción canónica de acuerdo con sus parámetros cinéticos. Sin embargo al analizar la concentración intracelular de los metabolitos involucrados, podemos concluir que la reacción canónica de CBS es la más importante para la producción de Cys, también que la CBS puede consumir Cys para producir H₂S y que la concentración de Ser podría jugar un papel importante en la regulación de H₂S.

IX. PERSPECTIVAS

Este estudio sirve como punto de partida para estudiar el papel que juega el H₂S en la fisiología de *T. cruzi* y sus mecanismos de regulación. Al entender los mecanismos de regulación de esta importante molécula señalizadora en *T. cruzi* se pueden buscar estos mecanismos en otros organismos o en padecimientos que involucren a la CBS y a la desregulación del H₂S.

REFERENCIAS:

Álvarez-Hernández, D.-A., Franyuti-Kelly, G.-A., Díaz-López-Silva, R., González-Chávez, A.-M., González-Hermosillo-Cornejo, D., & Vázquez-López, R. (2018). Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. *Revista Médica Del Hospital General de México*, 81(3), 154–164.

<https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.09.010>

Arce-Vega, R., Ángeles-Llerenas, A., Villegas-Trejo, A., & Ramos, C. (2017). Adherencia al tratamiento terapéutico en pacientes con enfermedad de Chagas del Estado de Morelos. *REVISTA BIOMÉDICA*, 28(1).

<https://doi.org/10.32776/revbiomed.v28i1.561>

Banerjee, R., Evande, R., Kabil, Ö., Ojha, S., & Taoka, S. (2003). Reaction mechanism and regulation of cystathionine β-synthase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1647(1–2), 30–35. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(03\)00044-X](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(03)00044-X)

Bern, C., Messenger, L. A., Whitman, J. D., & Maguire, J. H. (2019). Chagas disease in the united states: A public health approach. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-19>

Boiani, M., Piacenza, L., Hernández, P., Boiani, L., Cerecetto, H., González, M., & Denicola, A. (2010). Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? *Biochemical Pharmacology*, 79(12), 1736–1745.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.02.009>

Cardoso, M. S., Reis-Cunha, J. L., & Bartholomeu, D. C. (2016). Evasion of the immune response by *trypanosoma cruzi* during acute infection. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 6, Issue JAN). Frontiers Media S.A.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00659>

Centers for Disease Control and Prevention. (n.d.). *Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease)*. Retrieved March 3, 2022, from <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/>

Gaitonde, M. K. (1967). A Spectrophotometric Method for the Direct Determination of Cysteine in the Presence of Other Naturally Occurring Amino Acids. In *Biochem. J* (Vol. 104).

García-García, J. D., Peña-Sanabria, K. A., Sánchez-Thomas, R., & Moreno-Sánchez, R. (2018). Nickel accumulation by the green algae-like *Euglena gracilis*. *Journal of Hazardous Materials*, 343, 10–18.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.008>

Hall, B. S., Bot, C., & Wilkinson, S. R. (2011). Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13088–13095.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.230847>

Jackson, Y., Wyssa, B., & Chappuis, F. (2020). Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(3), 690–696.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkz473>

Jhee, K. H., McPhie, P., & Miles, E. W. (2000). Domain architecture of the heme-independent yeast cystathionine β -synthase provides insights into mechanisms of catalysis and regulation. *Biochemistry*, 39(34), 10548–10556.

<https://doi.org/10.1021/bi001020g>

Kong, M. C. R., & Salin, E. D. (2012). Spectrophotometric determination of aqueous sulfide on a pneumatically enhanced centrifugal microfluidic platform. *Analytical Chemistry*, 84(22), 10038–10043. <https://doi.org/10.1021/ac302507t>

Lima, C. R., Carels, N., Guimaraes, A. C. R., Tufféry, P., & Derreumaux, P. (2016). In silico structural characterization of protein targets for drug development against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Molecular Modeling*, 22(10). <https://doi.org/10.1007/s00894-016-3115-9>

Lucia Ospina, M., María Alexandra Durán Romero Director Técnico, C., Elvinia Rodríguez Rodríguez, R., Stella Ayala Sotelo, M., Cárdenas Bustamante Equipo Técnico, O., Carolina Flórez Sánchez Grupo de Parasitología, A., & Andrés Caicedo Díaz Grupo de Parasitología, R. (2017).

Marciano, D., Santana, M., & Nowicki, C. (2012). Functional characterization of enzymes involved in cysteine biosynthesis and H₂S production in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 185(2), 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.07.009>

Maya, J. D., Cassels, B. K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., Ferreira, A., & Morello, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the

mammalian host. In *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* (Vol. 146, Issue 4, pp. 601–620). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.004>

Nozaki, T., Shigeta, Y., Saito-Nakano, Y., Imada, M., & Kruger, W. D. (2001). Characterization of transsulfuration and cysteine biosynthetic pathways in the protozoan hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*: Isolation and molecular characterization of cystathionine β -synthase and serine acetyltransferase from *Trypanosoma*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(9), 6516–6523. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009774200>

Nunes, M. C. P., Beaton, A., Acquatella, H., Bern, C., Bolger, A. F., Echeverría, L. E., Dutra, W. O., Gascon, J., Morillo, C. A., Oliveira-Filho, J., Ribeiro, A. L. P., & Marin-Neto, J. A. (2018). Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. In *Circulation* (Vol. 138, Issue 12, pp. e169–e209). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000599>

Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. In *The Lancet* (Vol. 375, Issue 9723, pp. 1388–1402). Elsevier B.V.

Rojo-Medina, J., Ruiz-Matus, C., Salazar-Schettino, P. M., & González-Roldán, J. F. (2018). Enfermedad de Chagas en México. *Gaceta Médica de México*, 154(5), 605–612. <https://doi.org/10.24875/GMM.18004515>

World Health Organization. (2021). *La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana)*. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))

Organización Panamericana de la Salud, & Organización Mundial de la Salud. (n.d.). *Enfermedad de Chagas*. Retrieved March 2, 2022, from <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>

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 Letters*, 591(23), 3881–3894. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.1290>

ANEXO I. TÉCNICAS.

Purificación de cistationina β -sintasa (CBS):

1. Cultivar células E. coli (Rossetta) con el plásmido pET28a(+) que contienen el gen de CBS de T. cruzi en 2L de medio LB a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.7 a 600nm.
2. Inducir con 0.4 mM de IPTG toda la noche a 24 °C.
3. Cosechar a 3500 rpm, 10 min.
4. Resuspender el botón en 30 mL totales de amortiguador de lisis (Trietanolamina 0.1M, NaCl 0.3M, imidazol 2mM, ½ pastilla de cocktail de inhibidores de proteasas, pH 7.4) y romper las células en la prensa francesa con una presión de 1500psi.
5. Centrifugar el lisado a 10,000 rpm, 15 min.
6. Agregar el sobrenadante a 4 mL de resina (TALON® superflow™) de cobalto empacada y equilibrada. Incubar en agitación por 1 h a 4°C.
7. Centrifugar a 2000 rpm, 15 min.
8. Realizar dos lavados a la resina, agregando 10 mL de amortiguador de lisis, agitar 10 min y centrifugar a 2000 rpm, 5 min.
9. Agregar 10 mL de mortiguador de lisis, agitar 10 min y poner en una jeringa con un filtro en la salida para formar una columna.
10. Lavar con 20 mL de amortiguador de lisis con 10mM de imidazol.
11. Eluir la proteína con 20 mL de amortiguador de lisis con 100mM de imidazol.

Precipitación de proteína:

1. Realizar una mezcla con 20 μL de proteína, 200 μL de agua y 26 μL de ácido tricloroacético al 13% v/v
2. Incubar toda la noche, 4°C
3. Centrifugar con velocidad máxima, 20 min a 4°C y retirar el sobrenadante.
4. Una vez obtenido el botón, resuspender en 100 μL de solución A de Lowry.
5. Realizar una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA) en concentración 1 mg/mL.

H ₂ O (μL)	BSA (μL)	Reactivo de Lowry (μL)
20	0	200
19	1	200
18	2	200
16	4	200
12	8	200
8	12	200
4	16	200

Realizar la preparación de la muestra considerando 12 y 16 μL de H₂O en conjunto con 4 y 8 μL de muestra de CBS.

6. Incubar a temperatura ambiente, 10 min.
7. Agregar 20 μL de reactivo de Folin (1:1).
8. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
9. Leer absorbancia a 660 nm.

Evaluación de la afinidad enzima-sustrato:

Utilizar el espectro de haz dividido, en la primera cubeta se coloca el blanco de proteína y en la segunda se realizan las adiciones sucesivas.

Preparación de CBS: Master mix de CBS hasta obtener absorbancia constante entre 0.4 y 0.6. Realizar espectros por separado con lecturas de concentraciones sucesivas para sustratos Ser, Cys, OAS, y HCys, considerando la siguiente tabla:

[Sustrato] mM	Volumen de sustrato (μ L)	Concentración final (μ M)
2	1	10
	1	20
	3	50
10	1	100
	2	200
	6	500
	6	800
	6	1100

Nota: Para obtener HCys, se debe considerar que el reactivo es HCys tiolactona, por lo que a partir de este se requiere de la obtención de HCys.

Para obtener HCys 500 mM a partir de HCys tiolactona 2 M se toman 40 μ L de HCysy se transfieren a un tubo con 40 μ L de amortiguador HEPES 40 mM, pH 7.4 más 80 μ L de NaOH. Se incuba a 100°C por 3 min. Terminado el tiempo de incubación de conserva en hielo para neutralizar a pH 7.0 con aproximadamente 7 μ L de HCl

Cuantificación de tioles:

Preparación de 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzónico) (DTNB) 0.1 mM: Tomar 10 μ L de DTNB en 5 mL de amortiguador de fosfatos.

Realizar lecturas de absorbancia a 455 nm del tiol en una dilución 1:250 con 1 mL de DTNB 0.1 mM.

Electroforesis SDS-Page

Preparación de los reactivos:

A) Amortiguador de muestra:

Glicerol: 1 mL

SDS 10%: 2 mL

Azul de bromofenol: 2 mg

B-mercaptoetanol: 1 μ L por cada 20 μ L de amortiguador de muestra

Amortiguador concentrador: 1,25 mL

B) Amortiguador separador:

Tris: 18.17 g

SDS 10%: 4 mL

Llevar a pH 8.8 con HCl 12 N

Aforo a 100 mL

C) Amortiguador concentrador:

Tris: 6.06 g

SDS 19%: 1 mL

Llevar a pH 6.8 con HCl 12 N

Aforo a 100 mL

D) Gel separador:

H₂O: 3.1 mL

Acrilamida: 2.4 mL

Amortiguador separador pH 8.8: 1.9 mL

APS: 112 µL

Tetrametiletilendiamina (TEMED): 5 µL

E) Gel concentrador:

H₂O: 1 mL

Acrilamida: 300 µL

Amortiguador concentrador pH 8.8: 444 µL

APS: 28 µL

TEMED: 2.5 µL

Nota: Agregar al gel separador y concentrador al final la acrilamida y el TEMED.

Incubar la CBS en amortiguador de muestra a 100°C, 1 min. Transcurrido este tiempo, cargar 10 µL de muestra y de marcador de peso molecular en cada pozo del gel de acrilamida al 10% con amortiguador de corrida.

Iniciar la electroforesis a 120 V durante 60 min.

Cinética de reacciones. Variación de proteína.

1. Preparar un master mix de 3 mL con 60 µL de Ser y 60 µL de PLP. En tubos eppendorf de 500 µL y agregar las cantidades de master mix, proteína y sustrato de acuerdo a las tablas AI1 a AI4.

Tabla AI.1 Variación de proteína en ensayo Ser + HCys -> Cth + H₂O

# Ensayo	Master mix	Proteína (1:10)	HCys (500 mM)
1	480 µL	1 µL	20 µL
2	478 µL	2 µL	20 µL
3	475 µL	5 µL	20 µL
4	470 µL	10 µL	20 µL

Tabla AI.2 Controles de proteína en ensayo de Ser + HCys -> Cth + H₂O

# Ensayo	Master mix o HEPES/ PLP	Proteína (1:10)	HCys (20 mM)
5	500 µL (Master mix)	NA	NA
6	490 µL (Master mix)	10 µL	NA
7	470 µL HEPES + 10 µL PLP	NA	20 µL
8	480 µL HEPES + 10 µL PLP	10 µL	NA

Tabla AI.3 Variación de proteína en ensayo Ser + SH⁻ -> Cys + H₂O

# Ensayo	Master mix	Proteína (1:10)	SH ⁻ (Cf: 2 mM)
1	490 µL	1 µL	10 µL
2	488 µL	2 µL	10 µL
3	485 µL	5 µL	10 µL
4	480 µL	10 µL	10 µL

Tabla AI.4 Controles de proteína en ensayo de Ser + SH⁻ -> Cys + H₂O

# Ensayo	Master mix o HEPES/ PLP	Proteína (1:10)	SH ⁻ (Cf: 2 mM)
5	500 µL (Master mix)	NA	NA
6	490 µL (Master mix)	10 µL	NA
7	470 µL HEPES + 10 µL PLP	NA	10 µL
8	480 µL HEPES + 10 µL PLP	10 µL	NA

2. Incubar a 37°C los ensayos 1 a 8 y comenzar el arranque con HCys o SH⁻

según sea el caso.

3. En una placa de 96 pozos con ninhidrina (preparada de acuerdo a los puntos 3.1 y 3.2) agregar 100 μL para el ensayo de Cth a los 2.5, 5.0, 7.5 y 10 min del arranque de la reacción y 50 μL para el ensayo de Cys a los 0.5, 1.5, 2.5 y 3.5 min del arranque de la reacción.

3.1 Preparación de ninhidrina para la identificación de Cth

Pesar 0.0625 g de ninhidrina y disolver en 6 mL de ácido acético (vortéx).

Agregar 4 mL de H_3PO_4 concentrado y agitar.

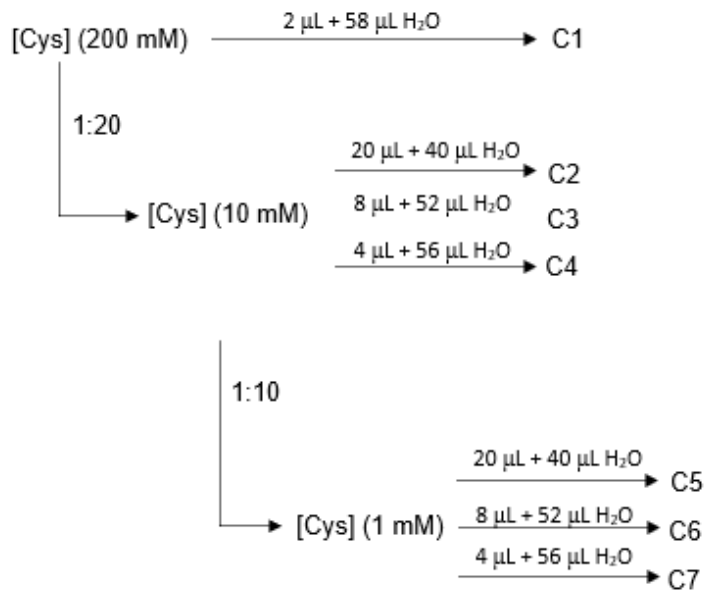
3.2 Preparación de ninhidrina para la identificación de Cys

Pesar 0.0625 g de ninhidrina y disolver en 6 mL de ácido acético (vortéx).

Agregar 4 mL de HCl concentrado y agitar.

4. Incubar a 100°C , 20 min para ensayo de Cth y 10 min para ensayo de Cys.
5. Agregar 100 μL de etanol absoluto a la placa del ensayo de Cys.
6. Leer de 455-800 nm para Cth y de 560-800 nm para Cys.

Curva patrón de Cys.



1. En una placa de 96 pozos con 50 μL ninhidrina agregar 60 μL de Cys a distintas concentraciones de acuerdo al diagrama.

2. Incubar a 100°C, 10 min.
3. Agregar 100 µL de etanol absoluto.
4. Leer a 560-800 nm para Cys.

ANEXO II. ESTANDARIZACIÓN DE LOS ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Previo a la realización de los ensayos cinéticos de las reacciones no canónicas, se realizó la evaluación de las técnicas y reactivos empleados con la finalidad de controlar las variables no asociadas a la medición de los productos de estudio y mejorar las metodologías descritas en la literatura de cuantificación de Cys y SH⁻ en reacciones enzimáticas para lograr la obtención de parámetros cinéticos robustos.

Evaluación de la estabilidad de OAS por HPLC

La OAS es una molécula cuya estructura, al hidratarse podría llevar a cabo la reacción que conduce a la formación de Ser como se muestra en la figura All.1

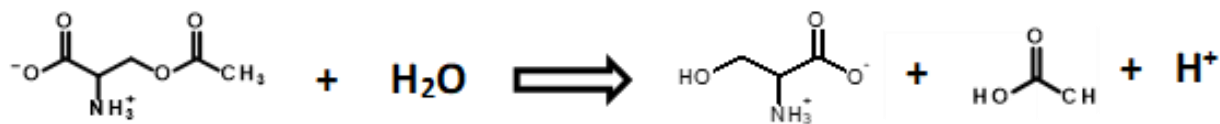


Figura All.1 Reacción de formación de Ser a partir de OAS. Al hidratarse, la OAS puede conducir a la formación de Ser y acetato.

El interés en la evaluación de la estabilidad de este reactivo surge a partir de la consideración de que la OAS se almacena a -20°C, lo que podría conducir a que debido a las condiciones de almacenamiento ocurra la reacción de formación de Ser por la hidratación del reactivo consecuente de la congelación y descongelación.

¿Cuáles serían las consecuencias de realizar un ensayo enzimático con OAS hidratada? Considerando la gran versatilidad catalítica de la CBS, en los ensayos en los que se utilizó la OAS se observaría señal de formación de Cys no solo debido a este sustrato, sino también debido a la presencia e incremento de Ser.

Para evaluar la estabilidad de la OAS utilizada para los ensayos de la CBS se llevó a cabo un ensayo de HPLC (descrito en metodología apartado 15) por día con un control de Ser y una preparación de OAS almacenada durante 160 h a -20°C obteniendo los cromatogramas de la figura All.2

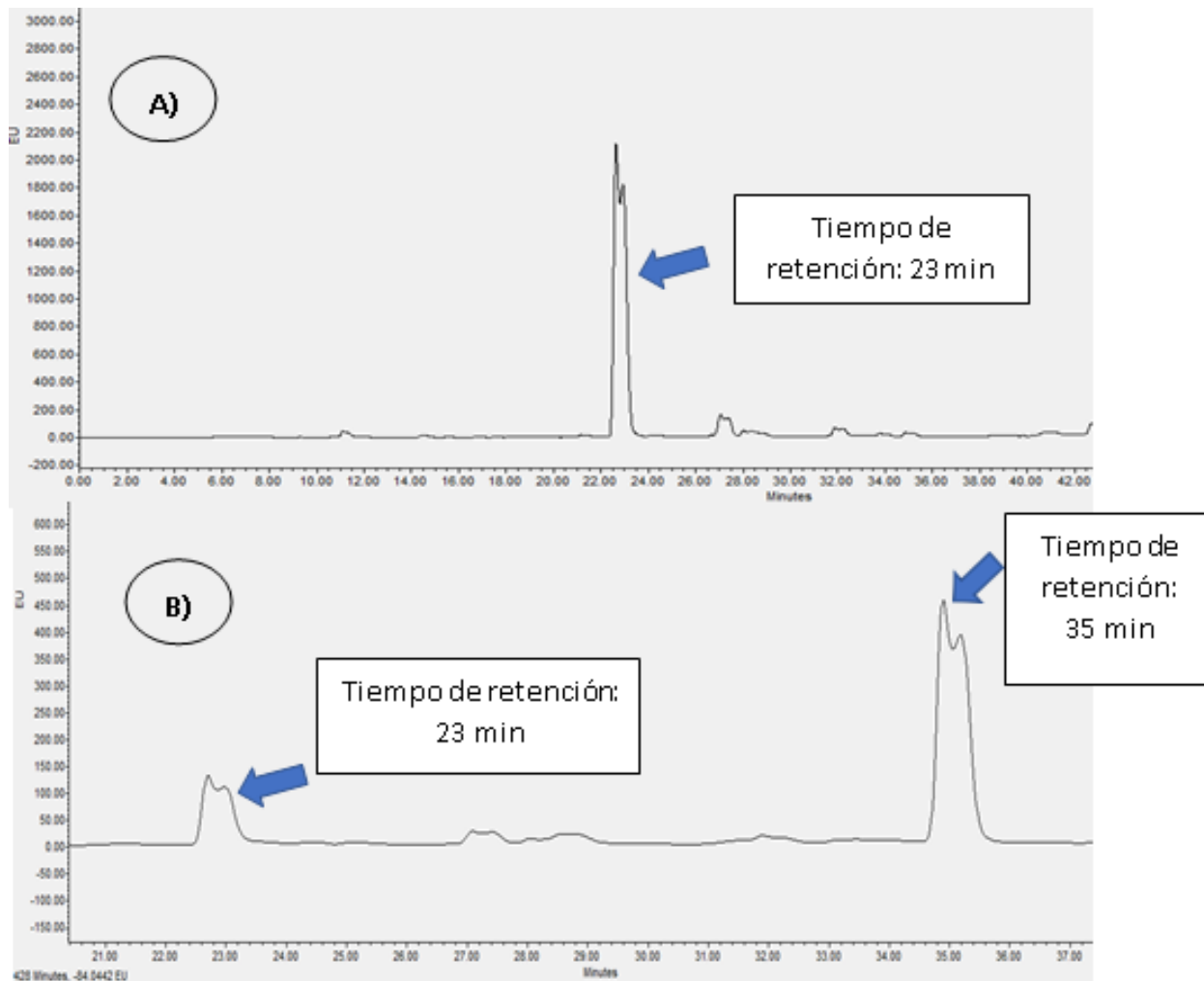


Figura All.2. Cromatogramas de HPLC. **A) Control de Ser.** **B) OAS pH 7.4 después de 24 h almacenada a -20°C .** Para OAS existe la aparición notable de un primer pico tras las 24 h de almacenamiento a -20°C cuya aparición cualitativamente coincide con el del pico del control Ser.

En los cromatogramas de la muestra de OAS se observaron dos picos. El primero con tiempo de retención de 23 min; mientras que el segundo pico con tiempo de retención entre 35 min (Figura All.2). Estos resultados sugieren que el primer pico en la muestra de OAS corresponde a la Ser ya que es comparable con el control de Ser (Figura All.2 A). Además, durante el análisis cada 24 h de almacenamiento se observó un incremento notable de Ser y disminución de OAS (Figura All.3).

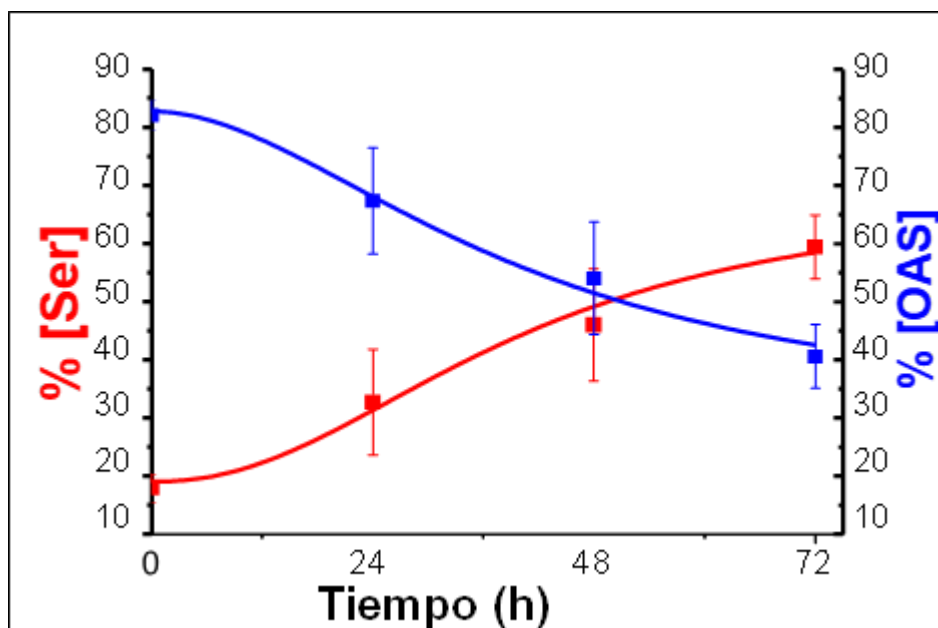


Figura All.3 Porcentaje de Ser en OAS almacenada a -20°C durante 72 h (n=3): En la preparación en fresco la OAS está presente en un 80% mientras que el 20% restante es de Ser, conforme aumenta el tiempo de almacenamiento el %Ser es mayor.

El porcentaje de OAS disminuye con respecto al tiempo transcurrido (Fig All.3), mientras que se observa un incremento notable en el porcentaje de Ser bajo las condiciones de almacenamiento, por lo que a partir de estos resultados para todos los ensayos se considera trabajar con la preparación de OAS en fresco para obtener

una mayor robustez en los análisis realizados con este reactivo y evitar la interferencia que pudiera causar la presencia de Ser debido a su hidratación.

Evaluación de la cuantificación de Cys por la técnica con ninhidrina

La Cys, es el producto de la reacción catalizada por CBS entre Ser y SH^- así como de la reacción entre OAS y SH^- . De acuerdo con Gaitonde, 1967; la ninhidrina puede formar un complejo visible a 560 nm con Cys en condiciones ácidas (HAcO/HCl). Para las reacciones cinéticas se utilizaron concentraciones variables de sustrato A y sustrato B con la finalidad de tener un comportamiento cercano a la saturación de la enzima que permita obtener el ajuste global del modelo cinético. Para evaluar la sensibilidad de la técnica de identificación de Cys con ninhidrina se realizó un ensayo de curvas patrón de Cys en presencia de las concentraciones utilizadas en los ensayos cinéticos de Ser, OAS y SH^- (Fig. AII.4).

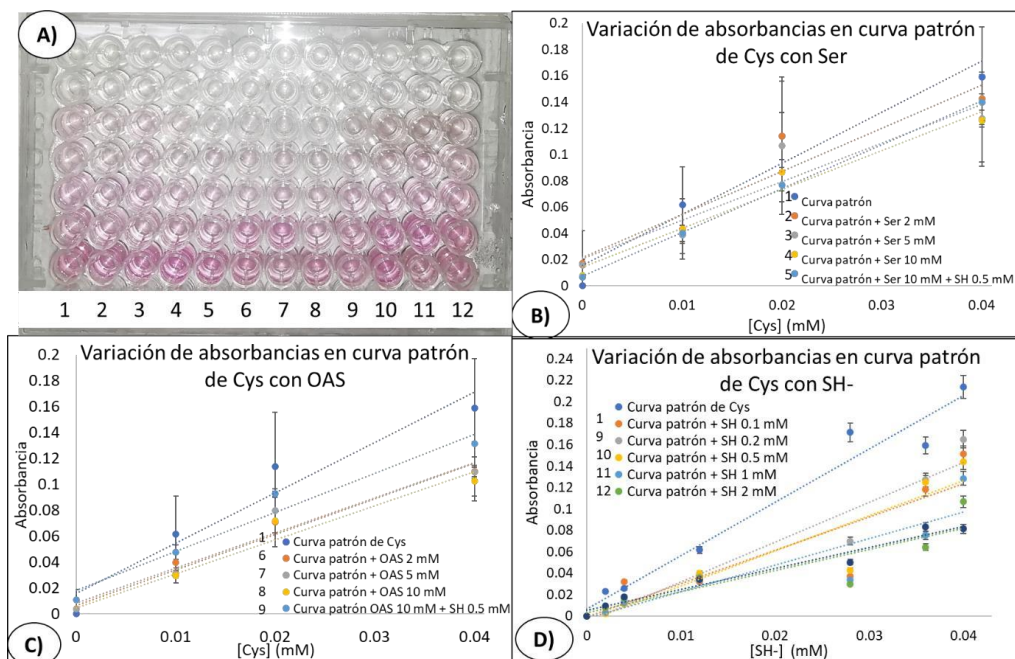


Figura AII.4. Ensayo de evaluación de la técnica de identificación de Cys a concentraciones variables de sustratos. **A) Placa de ensayo con ninhidrina:** En las filas 1 a 12 se encuentran curvas de [Cys] (mM). **B) Variación de absorbancias de [Cys] a diferentes concentraciones de [Ser] (mM):** En las filas 2 a 4 se encuentran concentraciones de 2 a 10 mM de [Ser] y en la fila 5 se tiene el control [Ser] (10 mM) y [SH⁻] (0.5 mM) utilizadas para el ensayo cinético de CBS. **C) Variación de absorbancias de [Cys] a diferentes concentraciones de [OAS] (mM):** En las filas 6 a 8 se encuentran concentraciones de 2 a 10 mM de [OAS]. **D) Variación de**

absorbancias de [Cys] a diferentes concentraciones de [SH⁻] (mM): En las filas 9 a 11 se encuentran concentraciones de 2 a 10 mM de [SH⁻].

En relación con la figura AII.4, se concluye que no existe una variación significativa en la disminución de absorbancias por el método de ninhidrina con respecto a la curva control de Cys, incluso en presencia de las concentraciones más altas de sustrato empleadas (Ser y OAS) para los ensayos enzimáticos de CBS, mientras que es importante considerar no trabajar a concentraciones superiores a 2 mM de SH⁻ para evitar interferencia en la absorbancia. Por lo que al emplear esta técnica para la obtención de los parámetros cinéticos dentro de las concentraciones de 2 a 10 mM para Ser y OAS y de 0.1 a 2 mM de SH⁻, se afirma que no existirán variaciones significativas debido a interferencias entre la técnica y los sustratos para la cuantificación de la formación del producto C

ANEXO III. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA CBS RECOMBINANTE.

Se ligó un fragmento obtenido por PCR de la CBS recombinante al vector de clonación pJET1.2/blunt para la obtención de un plásmido recombinante.

El vector de clonación pJET1.2/blunt contiene un sitio de múltiple de restricción y un sitio de resistencia a Kanamicina.

Una vez obtenido el plásmido recombinante se realizó la transformación en células competentes de *E. coli* Top10.

El gen obtenido del plásmido recombinante se purificó y se ligó al vector de expresión pET18a(+) para la obtención de un nuevo plásmido recombinante que se añadió a células competentes de *E. coli* BL21 por transformación para la obtención del gen que codifica para la CBS recombinante y llevar a cabo el proceso de purificación descrito en el apartado 7.1 y anexo I.