



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES “ZARAGOZA”

EFFECTO DE LA UREA EN EL PLEGAMIENTO Y  
DESPLIEGAMIENTO DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE  
*Trypanosoma cruzi*

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

ANA MARIA ANAYA TAPIA

MÉXICO, D.F.

ABRIL DE 2008

Director de tesis  
Dr. Edgar Vázquez Contreras

Asesor de tesis  
Dr. Marco A. Rodríguez Medina



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.

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Edgar Vázquez Contreras en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México, Este trabajo esta financiado por los proyectos de CONACYT No. 40524-M y PAPIIT No. IN217206. Agradezco la beca otorgada por el proyecto de CONACYT.

*Hago lo mejor que  
conozco, hago lo mejor que puedo,  
y pienso seguir haciéndolo hasta el final.  
Si al final me doy cuenta de que estuve bien,  
Lo que se haya dicho en contra mía  
no tendrá ningún valor. Si al final me doy  
cuenta de que estuve mal, aunque  
diez ángeles juren lo contrario, ya nada podrá cambiar las cosas*

# DEDICATORIAS

A mis padres Ricardo Anaya Hidalgo y Socorro Tapia Silva por sus enseñanzas, amor, consejos y apoyo incondicional; durante toda mi vida me han inspirado para lograr todo lo propuesto me han alentado a dar lo mejor de mí.

A Rodrigo Anaya Tapia y a mis hermanos Ricardo, Benjamín, y Jocelyn Anaya Tapia por estar a mi lado siempre y compartir todos mis logros.

A Israel Hernández Ruz por acompañarme, ayudarme durante todo este tiempo.

Gracias ii.

Gracias a mi familia por estar conmigo siempre hasta en los momentos más difíciles iluminando mi vida, los amo. Gracias sin ustedes no lo lograría.

Al Dr. Edgar Vázquez Contreras que me ha acompañado a lo largo de la realización de este trabajo, el más importante y que sin su apoyo no sería posible gracias.

# AGRADECIMENTOS

Al instituto de Química UNAM departamento de bioquímica.

Al CONACyT por la beca otorgada

Al Dr. Edgar Vázquez Contreras por aceptarme en su proyecto y apoyarme en la realización de esta tesis Gracias por ser mi asesor.

A la Dra. María Elena Chánéz Cárdenas por asesorarme en todo lo relacionado al proceso de sobreexpresión de la enzima

A la QFB Beatriz Aguirre y al M en IBB Francisco Zarate por su valiosa ayuda en la purificación de la enzima.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
--------------	---

## CAPITULO I

ANTECEDENTES.....	2
1. LAS PROTEÍNAS.....	2-5
2. PLEGAMIENTO.....	5-10
3. DESNATURALIZACIÓN.....	10-11
4. RENATURALIZACIÓN.....	11-12
5. LA UREA COMO DESNATURALIZANTE.....	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
6. MODELO DE ESTUDIO.....	12-13
7. EL PLEGAMIENTO DE TIM.....	14-15

## CAPITULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
2. HIPÓTESIS.....	17

## CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
1. SOBREEXPRESIÓN DE TcTIM.....	18
2. PURIFICACIÓN DE TcTIM.....	19
3. ESTUDIOS DE ESTRUCTURA.....	20
a. Actividad Específica.....	20-21
b. Determinación de la Concentración de TcTIM.....	21-22
c. Tiempo de Equilibrio.....	22-24

d. Estudio de Intensidad de Fluorescencia Cambio en la Estructura Terciaria.....	24-26
4. CARACTERIZACIÓN.....	26
e. Método de Actividad en la Desnaturalización.....	26-27
f. Método de la Actividad en la Renaturalización.....	27-28
g. Método para Experimento de Reversibilidad del Proceso de Desnaturalización de TcTIM.....	28-29
h. Disminución de la Concentración de Urea (M).....	30-31
i. Preparación de Reactivos.....	31-32

## CAPITULO IV

RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	33
1. SOBREENPRESIÓN DE TcTIM.....	33
2. PURIFICACIÓN DE TcTIM.....	33
3. ESTUDIOS DE ESTRUCTURA.....	33
a. Actividad Específica.....	33-34
b. Tiempo de Equilibrio.....	34-35
c. Estudio de Intensidad de Fluorescencia Cambio en la Estructura Terciaria.....	36
1) Patrón de Desnaturalización y renaturalización de TcTIM con Urea, en Función de Longitud de Onda Máxima.....	36-37
2) Patrón de Desnaturalización y Renaturalización de TcTIM con Urea, en Función de Intensidad de Fluorescencia Máxima.....	38-39
3) Centro de Masa Espectral (SCM). Patrón de Plegamiento y Desplegamiento de TcTIM con Urea.....	39-41
4) Unión de la ANS (1-anillo-8 naftalenosulfonato).Patrón de Plegamiento y Desplegamiento de TcTIM con Urea.....	41-42
4. CARACTERIZACIÓN.....	42
a. Patrón de Caracterización por Actividad.....	42-43
b. Reversibilidad del Proceso de Desnaturalización de TcTIM.....	43



1) Efecto de la Concentración de Proteína (500µg, 200µg, 100µg, 50µg, 25µg).....	43-45
2) Resultados de la Concentración 100µg/mL y 150µg/mL.....	45-46
3) Resultados de la Concentración 200µg/mL.....	47

## CAPITULO V

CONCLUSIONES.....	48
1. CONCLUSIÓN DEL EXPERIMENTO DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA.....	48
2. CONCLUSIÓN DEL EXPERIMENTO DE TIEMPO DE EQUILIBRIO.....	48
3. CONCLUSIÓN CON RESPECTO AL PATRÓN DE DESNATURALIZACIÓN Y RENATURALIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA.....	49-50
4. CONCLUSIÓN ACERCA DE LA CARACTERIZACIÓN POR ACTIVIDAD (PROCESO DE REVERSIBILIDAD).....	50
PERSPECTIVAS.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	52-57
Apéndice 1 Resultados Sobreexpresión y Purificación.....	58-60
Apéndice 2 Tabla de Abreviaturas.....	61

## RESUMEN

En este trabajo estudiamos las reacciones de desnaturalización y renaturalización de la Triosafosfato Isomerasa de *T. cruzi* (TcTIM), inducidas por urea en un intervalo de 0.5 M a 9 M, a 25 ° C. El análisis del cambio en la Intensidad de Fluorescencia Intrínseca como función del tiempo indica que un adecuado tiempo de equilibrio es de 200 horas para la desnaturalización y 100 horas para la Renaturalización. Las muestras fueron analizadas por Intensidad de Fluorescencia y Actividad Catalítica. Los resultados indican que el patrón de plegamiento de TcTIM consta de dos estados para la renaturalización y tres estados para la desnaturalización donde se puede ver claramente que presenta un estado intermedio; que una ANS en un intervalo de concentraciones de 0.4-0.8 M de urea y en la concentración 0.5M presenta mayor intensidad de Fluorescencia y Actividad Catalítica que la enzima nativa. Además mediante el análisis de la actividad catalítica se determina que el fenómeno de plegamiento de TcTIM es casi reversible totalmente, esto es sumamente importante debido a que su pariente directa la TIM de *T. brucei* (TbTIM) no sigue un proceso reversible al renaturalizarla, a pesar de tener un 74% de identidad entre ellas. La información obtenida indica que la diversidad de formas por las cuales se puede llevar a cabo el plegamiento de una proteína homóloga no es siempre el mismo, y nos lleva a reconocer que el plegamiento es un proceso inescrutable del cual todavía nos queda bastante por conocer.

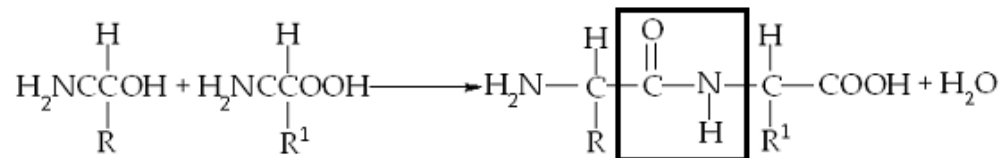
# CAPITULO I

## ANTECEDENTES

### 1. LAS PROTEÍNAS

Las proteínas son las biomoléculas encargadas de un gran número de funciones en las células, forman parte de la estructura básica de los tejidos como músculos, el cabello, la piel, las mucosas, etc. y desempeñan funciones metabólicas y reguladoras dentro y fuera de la célula como la absorción de nutrientes, el transporte de lípidos o el transporte de oxígeno; de ellas depende en gran parte el buen funcionamiento celular, también son los elementos que definen la identidad de los seres vivos, pues con ellas se expresa el código genético contenido en el genoma; (Voet 1992, Mathews 2002) sus funciones junto con el ambiente forman el fenotipo de los seres vivos.

Las proteínas son polímeros cuyas bases monoméricas son  $\alpha$ -aminoácidos. Los aminoácidos están unidos entre ellos por enlaces peptídicos que son uniones de carácter covalente que se dan entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente generando el desprendimiento de una molécula de agua (Voet 1992, Nelson 2000). (Figura 1). En la naturaleza existen 20 diferentes tipos de aminoácidos, con estas moléculas se pueden sintetizar millones de proteínas distintas, ya que en cada una, los aminoácidos se encuentran en una posición y una proporción específica determinada por la información genética del individuo.



**Figura 1.** Representación de la reacción de formación del enlace peptídico, estructura primaria de las proteínas.

Existen cuatro niveles estructurales básicos o esenciales en las proteínas denominados: estructura primaria, estructura secundaria, estructura terciaria y en el caso de proteínas oligoméricas también existe la estructura cuaternaria (Voet 1992).

La estructura primaria es la secuencia lineal de los residuos de aminoácidos de la proteína (Voet 1992). Se refiere a la secuencia de la cadena polipeptídica, ejemplificado en la Figura 2 recuadro A. El orden de aminoácidos en una proteína le da su conformación final y especificidad lo que influye en su función. Este orden se da por la información contenida en el material genético (ADN). Los codones son traducidos por los ribosomas en un aminoácido específico, por eso es importante conocer el genoma, pues en él están las instrucciones para todas las funciones que se necesitan para mantener a los organismos vivientes en condiciones óptimas (Griffiths 2000). Las cadenas polipeptídicas se diferencian, unas de otras, por el número y tipo de aminoácidos que contienen y en la secuencia de sus grupos R.

La estructura secundaria se refiere al ordenamiento espacial de la estructura primaria a través de diversos tipos de interacciones, generalmente puentes de Hidrógeno, formando estructuras repetitivas regulares y estructuras no repetitivas. Las estructuras no repetitivas son conocidas como rizos, asas o vueltas y se encuentran en menor cantidad que las de tipo repetitivo (Reardon 1995) (Figura 2 recuadro B). Las estructuras de tipo repetitivo encontradas comúnmente en las proteínas son las  $\alpha$ -hélices y las hojas  $\beta$ .

La estructura  $\alpha$ -hélice se forma al enrollarse la estructura primaria helicoidalmente sobre sí misma. Se debe a la formación de puentes de Hidrógeno entre el grupo carboxilo ( $-C=O$ ) de un residuo de un aminoácido y el grupo amino ( $-NH-$ ) del cuarto aminoácido que le sigue en la secuencia. Por cada cuatro aminoácidos la

secuencia da un giro de  $360^\circ$ . Los aminoácidos que favorecen la formación de la  $\alpha$ -hélice son: LEU, MET, GLU y ALA (Nelson 2000).

La conformación  $\beta$  de los aminoácidos no forman una hélice sino una cadena plana, los aminoácidos se acomodan de manera paralela o antiparalela uno respecto al otro y se conectan entre sí por puentes de Hidrógeno formando láminas (Nelson 2000, Mathews 2002).

La estructura terciaria es el empaquetamiento de la estructura repetitiva y la estructura irregular de un polipéptido para formar en algunas proteínas la conformación nativa (N), que tiene una función biológica. Un ejemplo de este tipo de estructura es la Figura 2 recuadro C; esta conformación se mantiene estable gracias a la existencia de enlaces no covalentes entre las cadenas laterales de los aminoácidos (Voet 1992). Estas interacciones son:

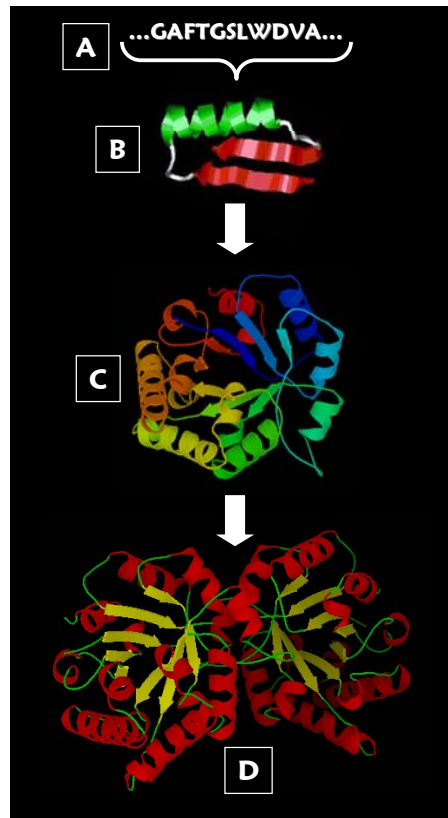
1. Las atracciones electrostáticas (puentes salinos)
2. Los puentes de Hidrógeno
3. Las interacciones hidrofóbicas (Van der Waals)

En algunas proteínas para dar mayor estabilidad a su estructura pueden formarse también enlaces covalentes como los puentes disulfuro. Estos enlaces se forman a través de aminoácidos que contienen azufre como la cisteína (Pace 1996).

La estructura cuaternaria se presenta cuando el estado nativo de la proteína consta de más de una cadena polipeptídica, es decir, cuando se trata de una proteína oligomérica, (Figura 2 recuadro D).

La estructura cuaternaria debe considerar el número y la naturaleza de las distintas subunidades; cada una de las cadenas polipeptídicas que forman al oligómero recibe el nombre de monómero (Chávez 2002). Este nivel estructural solo lo poseen algunas proteínas ya que para muchas la estructura terciaria es suficiente para tener actividad biológica (un ejemplo de proteína con estructura cuaternaria

es precisamente la Triosafosfato Isomerasa (TIM) con la cual se desarrolló este trabajo).



**Figura 2.** Niveles estructurales de la Triosafosfato Isomerasa. A) *Estructura primaria*: sólo se muestra un fragmento. B) *Estructura secundaria*: Las flechas representan hojas  $\beta$  y el espiral representa una  $\alpha$ -hélice ambas son de tipo repetitivo. C) *Estructura terciaria*: se muestra el monómero y D) *Estructura cuaternaria*: Dímero de la TcTIM, tomada de <http://www.rcsb.org/pdb>

## 2. PLEGAMIENTO

Se sabe que algunas enfermedades de tipo neurológico se encuentran relacionadas con anomalías o errores de conformación de algunas proteínas. En estos casos, proteínas cuya conformación nativa es globular adoptan una estructura fibrosa. Estas enfermedades tienen un origen genético, metabólico o infeccioso. Sin embargo, todas estas patologías se derivan de una aberración conformacional. Es por esto que nos referimos a ellas como "enfermedades del plegamiento

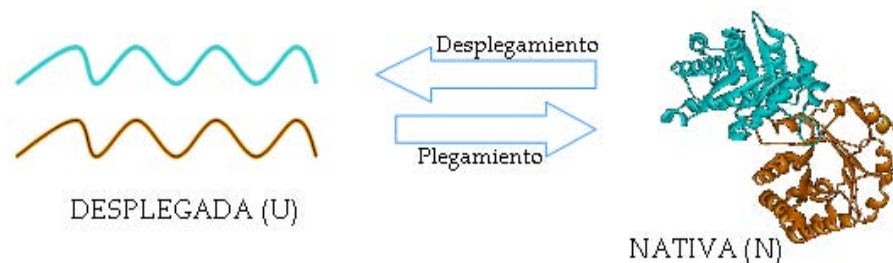
anómalo de las proteínas” (EPAP’s). Entre las enfermedades del plegamiento están el Alzheimer, Encefalopatías y diversas Amiloidosis (Ellis 2002).

Para que las proteína adquieran su estructura tridimensional debe ocurrir un proceso llamado plegamiento, en el cual, cada secuencia de aminoácidos particular adopta una conformación nativa (Nelson 2000). Es precisamente en este estado en el que una proteína permanecerá la mayor parte de su existencia. Este fenómeno comenzó a ser estudiado alrededor de 1960. Anfinsen en 1973, determinó que el proceso es complejo y aun no ha sido completamente descifrado. El proceso de plegamiento ocurre en el orden de los milisegundos a segundos es muy rápido. (Creighton 1993, Dill 1991).

Se conocen algunos detalles de cómo es que las proteínas adquieren su función biológica así como todas las fuerzas que participan en el proceso (puentes de Hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, atracciones electrostáticas y puentes disulfuro). El arreglo estructural que adoptan las proteínas al plegarse generalmente consiste en dirigir a los aminoácidos hidrofóbicos al interior de la molécula (ALA, VAL, PHE, PRO, MET, ILE Y LEU), mientras que los aminoácidos polares se localizan en la superficie (SER, THR, TYR, HYS, CYS, ASN, GLN, TRP); y es por eso que la mayoría de proteínas globulares son muy solubles en agua (Mathews 2002).

Se sabe por estudios *in vitro* que para algunas proteínas el proceso no necesita de información adicional o entrada de energía, por lo tanto se deduce que la información necesaria para la adquisición de la estructura tridimensional con actividad biológica se encuentra codificada, también, en la secuencia primaria (Ellis 2002, Pace 1996) de ahí que al plegamiento se conoce como segunda parte del código genético.

La reducción más sencilla que se puede hacer para estudiar el complejo proceso del plegamiento proteico, es considerarlo como una única reacción química de transformación, en donde la cadena de aminoácidos sin estructura denominada U (del idioma inglés “unfolded”) se transforma en la estructura tridimensional con actividad biológica N (del idioma inglés “native”) (Dill 1991, Dobson 2003) como se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.** Representación del plegamiento como una reacción química. A la izquierda se representa a la proteína sin estructura (U), y del lado derecho la estructura tridimensional que se obtiene después del plegamiento (N). (Programa utilizado Pymol).

Dado que el proceso *in vivo* puede llegar a ser muy complicado se han diseñado otras formas para poder estudiarlo *in vitro*. Estos experimentos consisten en ocasionar la pérdida de la estructura tridimensional de la proteína en cuestión y se conocen como de desnaturalización (Dobson 2003). La desnaturalización se puede inducir por cambios en el ambiente como variaciones de temperatura, presión, variaciones del pH o al agregar ciertas sustancias como la urea o algunas sales (Voet. 1992, Nelson 2000) ya que la estructura nativa está relacionada con las condiciones ambientales. Para algunas moléculas proteicas, si las condiciones originales de temperatura, presión, pH o fuerza iónica se restablecen, la proteína sin estructura o desnaturalizada (U) (Onuchic 1995, Creighton 1993) puede volver a su conformación tridimensional original, reestableciendo también su función. A este proceso se le denomina renaturalización la reacción es mostrada en la Figura 3.

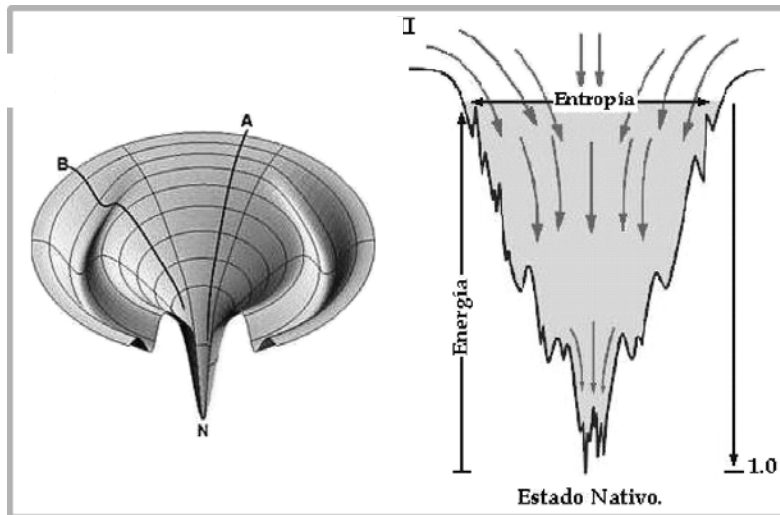


Para conocer las rutas mediante las cuales las proteínas adquieren su estructura tridimensional para tener el arreglo espacial que les permite obtener su estructura y función existen varios modelos los más reconocidos son los siguientes:

1. El modelo clásico de nucleación-propagación implica la formación de un núcleo de la cadena de aminoácidos hidrofóbicos, seguida de un rápido avance de la cadena polipeptídica hacia el estado plegado (Nelson 2000).
2. Modelo jerárquico del plegamiento de las proteínas, corresponde al orden de formación de la estructura de las proteínas (Voet 1992). Este modelo plantea que durante los primeros milisegundos del plegamiento la molécula se compacta y aparecen elementos de estructura secundaria ( $\alpha$ - hélices y hojas  $\beta$ ). La siguiente etapa involucra la formación de puentes de Hidrógeno estables de los aminoácidos hidrofóbicos al solvente, en esta etapa inicia la formación de la estructura terciaria y por lo tanto pueden presentarse intermediarios con estructura muy semejante a la nativa, siendo la etapa más lenta del plegamiento (Nelson 2000).
3. Modelo dinámico de difusión-colisión, en este modelo hay formación de microestructuras. Todas las posibles conformaciones pueden ser buscadas rápidamente pero no todas son estabilizadas. El plegamiento es realizado por una serie de pasos de difusión-colisión (Pace 1996).
4. Modelo del colapso hidrofóbico: Supone que el primer suceso relevante es el colapso al azar del polipéptido para ocultar los residuos hidrófobos. A partir del estado colapsado se va organizando el polipéptido y aparece un re-arreglo de la

estructura secundaria hacia la de los intermediarios y finalmente a la del estado nativo (Dill 1991).

5. El modelo de plegamiento en etapas implica varios niveles de estructuración en los cuales algunos elementos estructurales son formados y ensamblados; este modelo requiere una secuencia de eventos bien definidos asignando elementos estructurados con una relativa estabilidad a cada etapa del proceso (Creighton 1993).
  
6. Modelo del Embudo de Plegamiento: Examina los detalles del mecanismo de plegamiento basado en simulaciones. Reemplaza el concepto de vía de plegamiento de eventos secuenciales por el concepto de embudo de plegamiento de eventos paralelos (Figura 4) un embudo de plegamiento (Creighton 1996) representa las múltiples vías de plegamiento que puede tomar una proteína determinada bajo una condición en particular (A y B en Figura 4). El paisaje de energía corresponde a la energía libre de cada conformación en función de sus grados de libertad y puede tener una amplia cantidad de formas diferentes, con colinas, valles, canales, planos, fosos, etc., que representan barreras de energía, trampas cinéticas o caminos más directos al estado nativo. El eje vertical del embudo representa la suma de las energías libres de los puentes de Hidrógeno, pares iónicos, interacciones hidrofóbicas, solvatación, etc., para una cadena en una conformación particular. El área lateral de un paisaje de energía, a una profundidad dada, representa el número de conformaciones que tiene la cadena polipeptídica con esa energía libre. Cada conformación está representada por un punto en esta superficie de energía multidimensional. La forma del embudo de plegamiento depende tanto de la secuencia de aminoácidos de la proteína, como de las condiciones externas, determinando el mecanismo de plegamiento (Creighton 1996).



**Figura 4.** Representación del modelo del embudo propuesto por Leopold, Montal y Onuchic. A y B representan diferentes rutas de plegamiento. II. Horizonte energético del plegamiento de proteínas tomada de <http://biochemistry.utoronto.ca>.

### 3. DESNATURALIZACIÓN

Para estudiar la desnaturalización *in vitro* las proteínas se aíslan de la célula que las produce en su estado nativo de modo que el plegamiento de las mismas es un proceso que debe estudiarse *in vitro* por medio de reacciones de desnaturalización y renaturalización. Se le conoce como desnaturalización al cambio en la conformación nativa de una proteína debida a efectos en las interacciones no covalentes pero sin cambio alguno en las interacciones covalentes de la estructura primaria (Mathews 2002).

La finalidad de estudiar el proceso de desnaturalización de las proteínas se encuentra en determinar: 1º. La estabilidad de sus niveles estructurales bajo diferentes condiciones o concentraciones de algún agente desnaturalizante, y 2º. Seguir la ruta de plegamiento/desplegamiento (Creighton 1996, Dill 1991).

Hay agentes que provocan la desnaturalización de una proteína y se llaman desnaturalizantes. Pueden ser agentes físicos como la temperatura o la presión y agentes químicos como disolventes orgánicos, fuerza iónica, pH o detergentes. Se desnaturaliza una proteína modificando la condición de un desnaturalizante, esto producen cambios en la conformación nativa, provocando que la proteína llegue a un estado desnaturalizado sin estructura nativa; se considera que una proteína se desnaturaliza cuando pierde su organización estructural (Dill 1991, Dobson 2003).

#### **4. RENATURALIZACIÓN**

La renaturalización es el fenómeno en el cual una proteína recupera su estructura nativa cuando se eliminan los agentes que causan la desnaturalización, buscando que las características de la proteína antes y después de la desnaturalización sean idénticas. Esto sucede cuando el proceso es 100% reversible. Cuando hablamos de un proceso que es 100% reversible nos referimos a que en la reacción de plegamiento-desplegamiento las condiciones deben ser tales que la transformación de N a U se pueda regresar al estado N, y que la estructura obtenida sea indistinguible de la que se partió inicialmente. Se ha observado que en general las proteínas pequeñas se desnaturalizan reversiblemente mientras que las proteínas de mayor tamaño u oligoméricas lo hacen irreversiblemente o son parcialmente reversibles además de que se agregan o se precipitan antes de que la condición desnaturalizante sea modificada a su estado original (Garel 1992, Nelson 2000).

El objetivo de estudiar una reacción reversible tiene como fin el conocer los cambios energéticos asociados al proceso de plegamiento así como la caracterización de los intermediarios involucrados en el mismo, por lo tanto, es deseable que en los estudios de plegamiento de proteínas *in vitro* exista la reversibilidad total del proceso.

De manera similar a la desnaturalización, cuando en la renaturalización se disminuye la condición desnaturalizante, se modifica la proporción entre el número de moléculas que se encuentran en el estado N y U, y se puede obtener así un perfil de desnaturalización o renaturalización según el caso.

## **5. LA UREA COMO DESNATURALIZANTE**

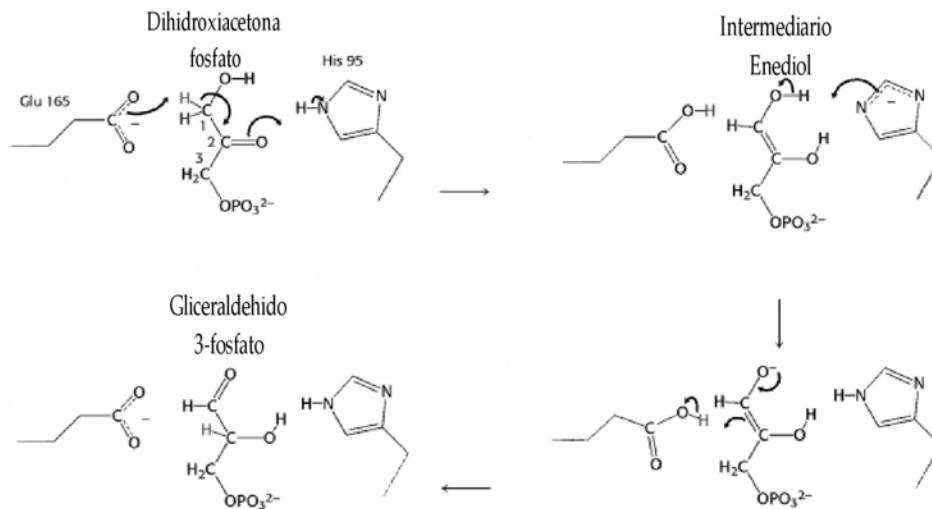
La urea es un desnaturalizante útil para estudiar el desplegamiento se pueden realizar estudios tanto en condiciones de equilibrio como experimentos cinéticos, porque se sigue la transformación entre el estado nativo y el estado completamente desnaturalizado de la proteína como función de la concentración de urea.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 6. MODELO DE ESTUDIO

Las enzimas son las proteínas encargadas de llevar a cabo todas las reacciones químicas que forman parte del metabolismo de la célula y, por lo tanto, de ellas depende en gran parte el buen funcionamiento celular.

El estudio realizado en esta tesis es experimental y tiene como sujeto de estudio a la enzima Triosafosfato Isomerasa (TIM) del *Trypanosoma cruzi*, (TcTIM) esta enzima participa en la glucólisis que es una vía metabólica anaerobia por la cual la mayoría de formas de vida degradan la glucosa en dos moléculas de piruvato con la producción de dos moléculas de ATP. Esta vía metabólica consta de 10 reacciones enzimáticas. En la quinta reacción, es donde actúa la TIM (Nelson 2000, Voet 1992) la hexosa difosforilada fructosa-1,6-bifosfato es dividida por la enzima aldolasa en el paso 4 en dos triosas: la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) que a su vez es una cetosa, y el Gliceraldehido-3-fosfato (GAP), que a su vez es una aldosa (Figura 5). La transformación de DHAP en GAP realizada por la TIM es una reacción muy rápida, entre  $10^8$  y  $10^9$  veces más rápido que en ausencia de la enzima (Nelson 2000, Mathews 2002).



**Figura 5.** Mecanismo catalítico de la Triosafosfato Isomerasa.

Se sabe que el mecanismo catalítico de la enzima es a través de un intermediario endiolatado. La TIM cataliza las reacciones uniéndose más fuertemente al estado de transición que al sustrato; de hecho el análogo del estado de transición el 2-fosfoglicolato se une de 100 a 155 veces con más afinidad a la TIM que el Gliceraldehído-3-fosfato o Dihidroxiacetona fosfato (Mathews 2002). La transformación de DHAP en GAP realizada por la TIM, es muy rápida, entre  $10^8$  y  $10^9$  veces más que en ausencia de la enzima, diversos estudios han confirmado por una parte, que la unión del GAP a la enzima está limitada por la frecuencia de encuentros entre las dos especies, y por otra, que no se debe a los ajustes conformacionales que la proteína desarrolla con el solvente para la catálisis o a los rearrreglos químicos entre el sustrato y la enzima, por ello se le conoce como “catalizador perfecto”. Cuantificar la actividad biológica de la enzima ayuda a determinar las transiciones estructurales a nivel de estructura nativa, pues es ésta la única que posee esta característica

## 7. EL PLEGAMIENTO DE TIM

Se han realizado estudios de desnaturalización inducida por clorhidrato de guanidinio (Gdn-HCl) para enzimas homólogas de TIM de diversas especies; estas investigaciones indican que el patrón de

plegamiento de la enzima varía según la especie (Chávez 2002) esto sucede a pesar de que el alineamiento de las secuencias primarias y la superposición de las estructuras tridimensionales de estas proteínas muestran únicamente diferencias muy sutiles. Se ha visto que la ruta de plegamiento va desde un proceso de dos estados, en el caso de *L. mexicana*, (Williams 1999) hasta procesos complicados como *T. brucei*. (Chávez 2002). Observándose a menudo un proceso de agregación irreversible.

En este proyecto se reportan las reacciones de desnaturalización y renaturalización de la enzima de *T. cruzi* (TcTIM), inducidas por urea en un intervalo de 0.0M a 9M, a 25 ° C

Debido al papel central que la TIM juega en el metabolismo anaerobio, se ha propuesto como blanco para diseñar fármacos específicos contra agentes infecciosos que en alguna parte de su ciclo de vida dependan básicamente de la glucólisis como fuente de energía. Tal es el caso del *T. cruzi*.

Eventualmente la información que se obtenga de estas investigaciones será de gran utilidad por ser una enzima proveniente de uno de los parásitos más patógenos de nuestros días, que a su vez es causante de una de las enfermedades que más afecta a la población "la enfermedad de Chagas" (Zaman 1999).

La enfermedad de Chagas que actualmente ha infectado a 24 millones de individuos tan solo en América Latina y según datos de la OMS por año se tienen un promedio de 45 mil muertes debido a este mal, a su vez se ubica en el tope de las enfermedades endémicas. Entre las afecciones parasitarias se encuentra en el tercer lugar detrás de la malaria y la esquistosomiasis.

En nuestros días, una de las principales preocupaciones del ser humano es tener la capacidad para elaborar medicamentos efectivos



contra enfermedades producidas por parásitos. Las drogas actuales para las tripanosomiasis han generado efectos colaterales malignos entre los pacientes, por tal motivo, el estudio detallado de la enzima está relacionado directamente con la información necesaria para el tratamiento y cura de las enfermedades mencionadas, esto puede lograrse debido a que existen pequeñas diferencias estructurales entre la enzima de los humanos y las de estos parásitos de ahí que toda la información generada sobre estas enzimas se aprovecha para el diseño racional de nuevos medicamentos.

Si se compara la estructura primaria de las TIM's de ambos parásitos *T. cruzi* y *T. brucei* (Chávez 2002, Chávez 2005), resulta que 185 de los 250 aminoácidos que las componen son idénticos en ambas proteínas; el 26% restante se compone de cambios conservativos, lo que indica que únicamente hay un 15% de cambios drásticos o no conservativos entre ambas proteínas (Chávez 2002).

A pesar de esta semejanza la estructura tridimensional de estas proteínas no muestra diferencias significativas. Pero el patrón de plegamiento sigue caminos diferentes. Experimentos publicados muestran que el patrón de plegamiento de la enzima de *T. cruzi* es reversible. Esta observación es interesante porque un pariente directo de *T. cruzi*, *T. brucei* es irreversible y forma agregados. Dado que los agregados están presentes en patologías como el Alzheimer, estudiar el origen de los mismos es un campo de vanguardia (Ellis 2002).

# CAPITULO II

## OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la renaturalización y desnaturalización de TcTIM utilizando como agente desnaturalizante a la urea, analizar el patrón de plegamiento, definir cuantos estados presenta y si estos procesos son reversibles.

### 2. OBJETIVOS PARTICULARES

- ✚ Definir el tiempo de equilibrio de TcTIM tanto en el proceso de desnaturalización como en el de renaturalización.
- ✚ Analizar el patrón de plegamiento-desplegamiento de TcTIM mediante cambios en la Intensidad de Fluorescencia Intrínseca, Extrínseca y Actividad Catalítica.
- ✚ Estudiar la reversibilidad del proceso desnaturalización/renaturalización en diferentes condiciones de concentración.

### 3. HIPÓTESIS

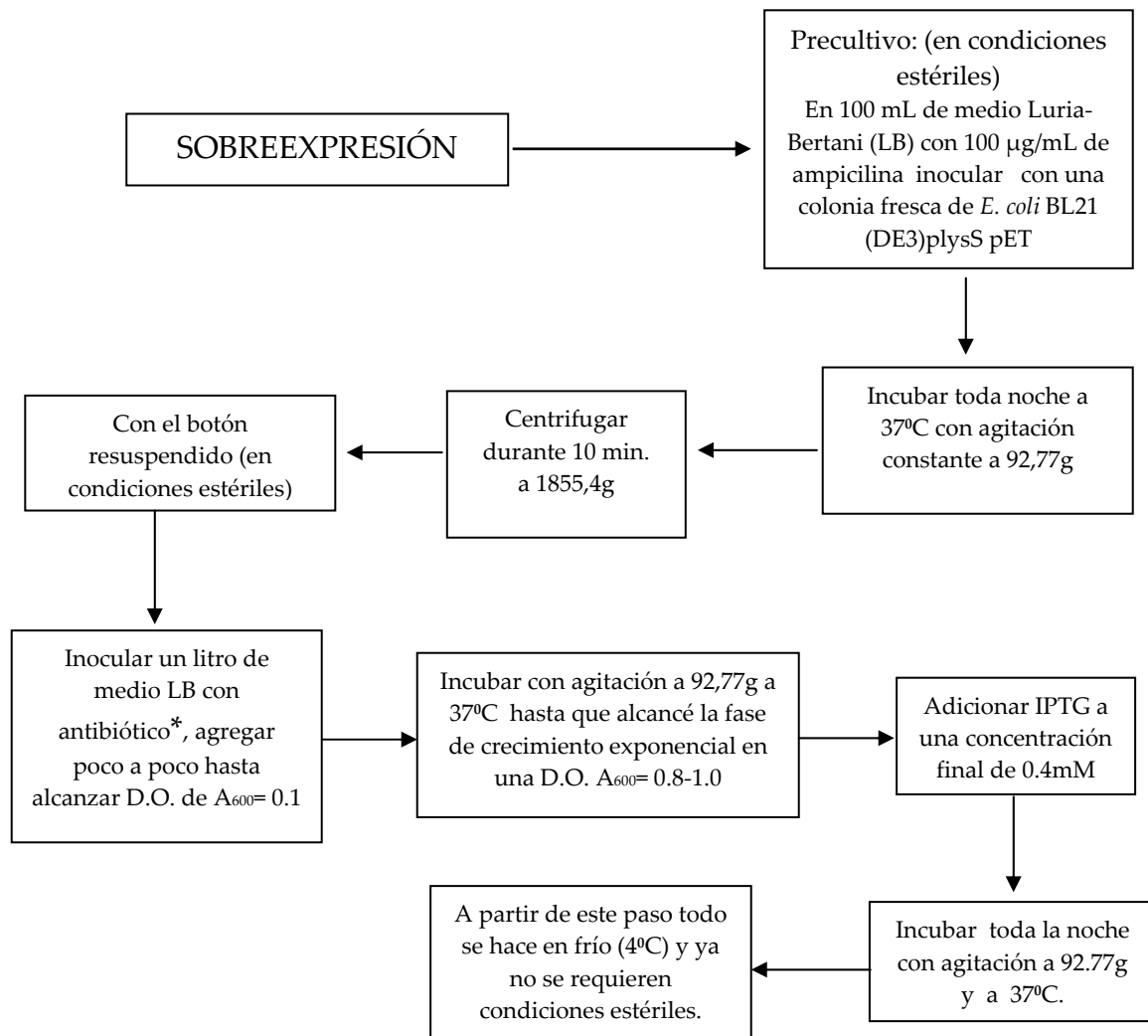
- ✚ Estudiando el efecto de la concentración de desnaturalizante en el proceso de plegamiento y desplegamiento de TcTIM se puede obtener el modelo que sigue así como evaluar si el proceso es totalmente reversible.

# CAPITULO III

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. SOBREENPRESIÓN DE TcTIM

El protocolo para la sobreexpresión de TcTIM así como; la purificación se realizó basándose en los protocolos descritos en: (Borchert 1993) y (Chávez 2005). Este experimento se llevó a cabo realizando con ligeras modificaciones que se ilustran en la Figura 6 y Figura 7.

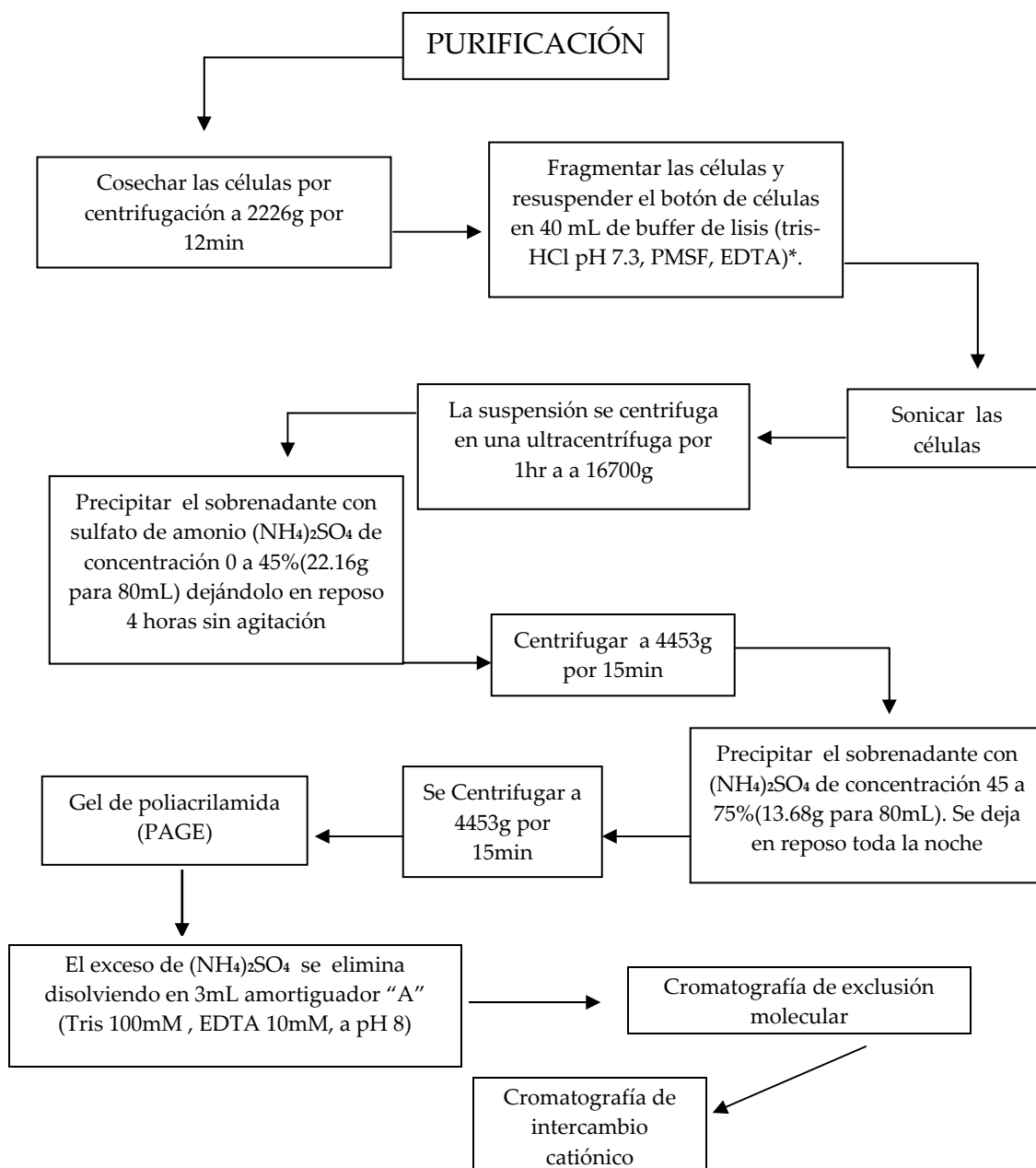


**Figura 6.** Protocolo para la sobreexpresión de TcTIM

\*Nota: Ver apéndice 1 y preparación de Reactivos.

## 2. PURIFICACIÓN DE TcTIM

El protocolo para la purificación de TcTIM así como; la purificación se realizó basándose en los protocolos descritos en: (Borchert 1993) y (Chánez 2005).



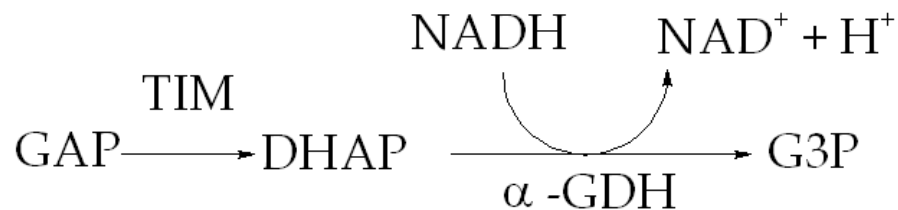
**Figura 7.** Protocolo para la purificación de TcTIM

\*Nota: Ver apéndice 1 y preparación de Reactivos.

### 3. ESTUDIOS DE ESTRUCTURA

#### a. Actividad Específica

El estudio de la actividad específica de TcTIM refleja el cambio en su estructura nativa así como su oligomerización, porque esta enzima sólo presenta actividad como oligómero. La actividad se cuantifica mediante la reacción acoplada de la Figura 8.



**Figura 8.** Reacción para la determinación de la actividad de TcTIM. Donde GAP: Gliceraldehído-3-fosfato; DHAP: Dihidroxiacetona Fosfato; NADH: Nicotin Adenin Dinucleótido reducido; NAD<sup>+</sup>: Nicotin Adenin Dinucleótido oxidado; G3P: Glicerol-3-fosfato y  $\alpha$ -GDH:  $\alpha$ -Glicerol fosfato Deshidrogenasa.

Esta reacción permite evaluar la actividad de TcTIM de manera indirecta cuantificando espectrofotométricamente el consumo de NADH mediante la pérdida de color amarillo a 340nm.

Se analizan los resultados de cada muestra con cada lectura se obtiene una curva de actividad de la cual se calcula el valor de la pendiente en unidades de absorbancia (ua), se sustituyen en la siguiente fórmula y se cuantifica la actividad específica (AE) para cada muestra:

$$AE \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{mg}} = \frac{\frac{\Delta u.a}{\text{min}}}{6.22 u.a} \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} = \{Prot(mg / \text{mL})\}$$

Donde 6.22 u.a. es el coeficiente de extinción del NADH y la concentración de proteína es un valor constante de 5 ng/mL que debe transformarse a las unidades que la fórmula requiere (mg/mL).

La determinación de la actividad se realizó en el espectrofotómetro Beckman Coulter en el programa de Cinética Multiceldas, a una longitud de onda de 340 nm, con tabulaciones de 1.0, tiempo de 30 segundos entre cada lectura y con un total de tiempo de 420 segundos

El método utilizado para preparar la mezcla de reacción en la cual se cuantificó la actividad catalítica de las muestras es el siguiente:

Gliceraldehido - 3 - fosfato	50µL
α - glicerol - fosfato deshidrogenasa	20µL
NADH	2µL
TcTIM	5ng/mL
Amortiguador TED 100/10/1, pH 7.4	c.b.p. 1 mL

## **b. Determinación de la Concentración de TcTIM**

Para la cuantificación de la proteína se determinó por el método del Ácido Bicinconínico (BCA) por medio de una curva estándar de BSA con el kit *BCA Protein Assay (Pierce)*® (Smith *et al* 1985) 25 µL de cada estándar o de la muestra problema se adiciona en una microplaca (rango de trabajo 20 -2000 µL).

Nota: Si el tamaño de muestra es limitado, 10µL de cada muestra problema y estándar se puede utilizar muestra a WR (reactivo de trabajo / Working Reagent) cociente 1:20). Sin embargo la gama de trabajo del análisis en este caso será limitado a 125:2000 µL/mL.

- Agregar 200 µL del WR a cada uno de los pozos
- Cubrir la placa y se incubó a 37°C por 30 minutos
- Enfriar la placa a temperatura ambiente

## ■ Medir la absorbancia a 562nm en un lector para placa

Nota: Las longitudes de onda a partir de la 540-590 nm se han utilizado con éxito con este método. Porque los lectores de la placa utilizan una longitud de trayectoria de la luz más corta que los espectrofotómetros de cubeta, el procedimiento del microplaca requiere una mayor muestra para obtener la misma sensibilidad que el procedimiento con tubo de prueba del estándar. Si se desean lecturas más arriba 562nm, hay que aumentar el tiempo de la incubación a 2 horas se tratan idénticamente, tales modificaciones pueden ser útiles.

■ Posteriormente se resta el promedio de la absorbancia del blanco medida a 562nm a todos los otros estándares individuales y muestra desconocidas medidas a 562nm.

■ Finalmente se prepara una curva estándar trazando la medida corregida en blanco media de 562nm para cada estándar de BSA contra su concentración en  $\mu\text{l/mL}$ . Y se usó la curva estándar para determinar la concentración de la proteína de cada muestra problema.

### **c. Tiempo de Equilibrio**

El estudio del tiempo de equilibrio en la desnaturalización

■ Se elabora en tubos de vidrio con tapón de rosca de aproximadamente 5mL, en los cuales se coloca una solución que contiene 50  $\mu\text{g/mL}$  de TcTIM silvestre (esta concentración es fija para cada tubo).

■ La urea, aumentó gradualmente en un intervalo 0 - 9M todo el experimento se realiza con amortiguador TED (Trietanolamina, EDTA y DTT) 20:1:1 pH 7.4 y se incluyen dos tubos de referencia con la enzima nativa sin desnaturalizante como control.



- Todas las muestras son incubadas en baño de agua a 25°C, y posteriormente se analizaron mediante cambios en las propiedades fluorescentes como función de la concentración de urea excitando la molécula a 295nm en un intervalo de 310nm a 410nm.
- Se realizan lecturas de cada una de las muestras a las 48hrs, 120hrs, 196hrs y 288hrs.

El estudio del tiempo de equilibrio en la renaturalización:

Las muestras para el análisis de la renaturalización contuvieron el mismo intervalo de concentraciones de urea utilizadas para la desnaturalización para poder realizar una comparación de los valores obtenidos.

Para evaluar el desarrollo de este proceso se:

- Elabora una solución madre (Tubo "A") que contenga al desnaturalizante y a la enzima.

Nota: Se busca obtener una solución que tenga una concentración de proteína determinada, tal que al ser diluida nos permitía obtener la misma concentración que se utiliza para la desnaturalización (50 µg/mL) y nos proporcionara la concentración más baja de desnaturalizante que se puede obtener.

- La concentración original de urea que debe contener el tubo "A" debe ser lo más cercana a 10M para garantizar la completa desnaturalización de la enzima, por lo cual antes de comenzar a diluir a la proteína en estas condiciones se deja equilibrar en esta concentración por un lapso de 24hrs.
- Preparar las muestras en tubos de vidrio con tapón de rosca de aproximadamente 5mL, y colocar una alícuota del Tubo "A" que sea equivalente a 50 µg/mL TcTIM (esta concentración es

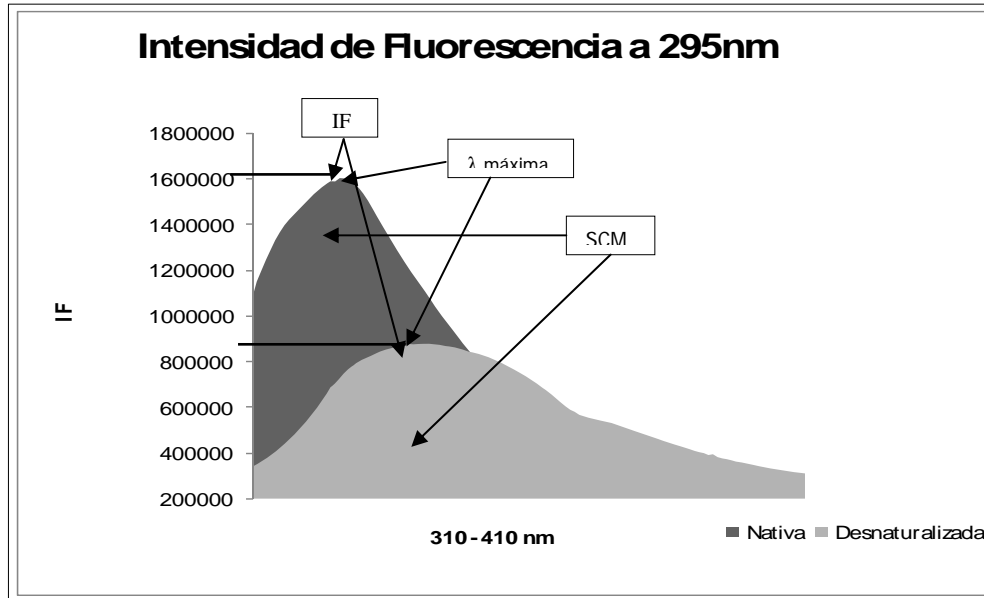
fija para cada tubo), la urea se disminuye gradualmente 10M – 0.5M en amortiguador TED (Trietanolamina, EDTA y DTT) 20:1:1 pH 7.4; además se deben incluir dos tubos de referencia con la enzima nativa sin desnaturizante como control.

- Incubar las muestras en baño de agua a 25°C, para posteriormente ser analizadas excitando las moléculas a 295nm en un intervalo de 310nm a 410nm cada una de las muestras a las 24hrs, 48hrs, 72hrs, 96hrs, 168hrs y 216hrs.

#### **d. Estudio de Intensidad de Fluorescencia Cambio en la Estructura Terciaria.**

La fluorescencia de los residuos aromáticos presentes en la molécula se analizaron de dos formas la primera determina la fluorescencia de los fluoróforos intrínsecos, es decir Triptófano, Fenilalanina y Tirosina, y esta a su vez se divide en dos lecturas.

La primera consiste en excitar cada muestra a 280nm tomando barridos de 300-400nm, a una sola temperatura 25 °C. En la segunda lectura la muestra se excitan a 295nm haciendo barridos de 310-410nm, buscando excitar solamente a los Triptófanos presentes en la proteína. Los parámetros analizados en los espectros de fluorescencia intrínseca se definen en la Figura 9.



**Figura 9.** Parámetros a evaluar para cada espectro de fluorescencia a 280nm y 295nm. IF máx.: es la máxima lectura en el espectro de una muestra en el eje y,  $\lambda$  máxima: longitud de mayor IF en el espectro en el eje X, SCM: área bajo la curva en cada espectro.

Los cambios por intensidad de fluorescencia se realizaron en un espectro-fluorómetro *Olis DM 4*, con temperatura controlada a 25 °C. Con los datos de longitud de onda máxima y la intensidad de fluorescencia de los espectros obtenidos se determinó el centro de masa espectral utilizando la siguiente ecuación:

$$CMS = \frac{\sum \lambda I(\lambda)}{\sum I(\lambda)}$$

donde,

$\lambda$  = longitud de onda

$I(\lambda)$  = Intensidad de Fluorescencia a la longitud de onda

La segunda forma en la cual se estudió la fluorescencia fue adicionando el fluoróforo extrínseco el ANS.

De cada una de las muestras se obtuvieron dos espectros a 280nm y otro 295nm esto con el fin de obtener la mayor información posible

del comportamiento de la proteína en cada una de las concentraciones de desnaturizante a las cuales fue expuesta.

### **▣ Patrón de Desnaturalización y Renaturalización**

Las muestras se estudian a diferentes concentraciones de TcTIM 20µg/mL, 50 µg/mL y 100µg/mL y urea en un rango de 0 a 9M en Amortiguador TED (Trietanolamina, EDTA y DTT) 20:1:1 pH 7.4.

## **4. CARACTERIZACIÓN**

El patrón de plegamiento se obtuvo mediante el análisis de la actividad catalítica de las muestras de renaturalización y desnaturalización, para todas las concentraciones estudiadas, la medición de la actividad para cada una de las muestras fue necesaria para caracterizar cada uno de los estados intermedios presentes en el proceso de desnaturalización-renaturalización de TcTIM.

Con este proceso también se pudo determinar si la proteína era capaz de regresar a su estado nativo completamente después de ser desnaturizada, con el fin de determinar si el proceso es o no reversible. Para lograrlo se siguió el método propuesto por Zomosa-Signoret 2003 (realizando algunas modificaciones).

### **e. Método de Actividad en la Desnaturalización**

El diseño de muestras fue el siguiente:

- ▣ Preparar tubos que contengan diferentes concentraciones de TcTIM (20µg/mL, 50 µg/mL y 100µg/mL) y urea en un rango de 0M a 9M en amortiguador TED (Trietanolamina, EDTA y DTT) 20:1:1 pH 7.4.

- Incubar al equilibrio a 25 °C, posteriormente se diluir y tomar una alícuota equivalente a la concentración de TcTIM 20µg/mL, 50 µg/mL y 100µg/mL respectivamente adicionar en un tubo que contenga TED (Trietanolamina, EDTA y DTT) 20:1:1 pH y 7.4 y urea c.b.p. llegar a la concentración 0.5 a 9M correspondiente (restando la urea residual de la alícuota original) incubar durante 6hrs a 25 °C y cuantificar la actividad para cada una tomar una alícuota de cada tubo equivalente a 5ng finales de TcTIM.

#### **f. Método de Actividad en la Renaturalización**

El diseño de muestras fue el siguiente:

- Tomar una alícuota de solución madre (Tubo A) que contenga al desnaturalizante a una concentración 10M y a la enzima en una concentración 150ug/mL.

Se buscó obtener una solución que tuviera una concentración de proteína determinada tal que al ser diluida permitiera obtener las mismas concentraciones que se utilizaron para el estudio de la desnaturalización 20µg/mL, 50 µg/mL y 100µg/mL y:

- Colocar en un tubo que contenga urea (restando la urea residual de la alícuota) en un rango de 0M a 9M y Amortiguador TED (Trietanolamina, EDTA y DTT) 20:1:1 pH 7.4.
- Incubar las muestras al equilibrio a 25°C, posteriormente diluir y tomar una alícuota cuya concentración de TcTIM corresponda a 20µg/mL, 50 µg/mL y 100µg/mL, y adicionar en un tubo que contenía TED (Trietanolamina, EDTA y DTT) 20:1:1 pH y 7.4 y urea c. b. p. alcanzar la concentración 0.5 a 9M correspondiente (restando la urea residual de la alícuota).

- Incubar durante 6hrs y cuantificar la actividad para cada una tomar una alícuota de cada tubo equivalente a 5ng finales de TcTIM.

**g. Método para Experimento de Reversibilidad del Proceso de Desnaturalización de TcTIM**

Para medir el proceso de reactivación, de TcTIM se realiza el siguiente experimento siguiendo la Tabla 1 y 2.

Concentración de TcTIM en la Desnaturalización	UREA	Diluir la Concentración de TcTIM para Renaturalización	Volumen de TcTIM en celda
Cuantificar la Actividad a las 12hrs a 340nm			
500µg/mL	7,3M	10 µg/mL	4.0µL
		5 µg/mL	4.0µL
		2,5 µg/mL	4.0µL
368 µg/mL	8M	5 µg/mL	4.0µL
		2,5 µg/mL	0
200 µg/mL	8M	4 µg/mL	4.0µL
		2 µg/mL	0
100 µg/mL	8M	10 µg/mL	1.0µL
		5 µg/mL	1.0µL
		2,5 µg/mL	1.5µL
50 µg/mL	8M	5 µg/mL	1.0µL
		2,5 µg/mL	1.5µL
25 µg/mL	8M	2.5 µg/mL	1.5µL

**Tabla 1.** Preparación de muestras para la renaturalización de TcTIM después de ser desnaturalizada con urea 9M

Controles sin Urea Cuantificación a las 12hrs a 340nm	
Concentración de TcTIM	Volumen de TcTIM en celda
10 µg/mL	1.0 µL
5 µg/mL	1.2 µL
4 µg/mL	1.5 µL
2,5 µg/mL	2.0 µL

**Tabla 2.** Preparación de los controles para el análisis de la renaturalización de TcTIM.

Una vez renaturalizada TcTIM llevar a cabo la determinación de la actividad catalítica, realizando una comparación con la enzima nativa a la misma concentración de la muestra, y se obtuvieron los valores de actividad específica reportados en las Tablas 7 y 8.

Se ajustó el protocolo del experimento (Tablas 3 y 5 con sus respectivos controles) para obtener un mejor porcentaje de actividad catalítica después de la desnaturalización y renaturalización valores obtenidos en las Tablas 9 y 11

Concentración de TcTIM en la Desnaturalización	UREA	Concentración de TcTIM en la Renaturalización	Volumen de TcTIM en celda
Cuantificar a las 6hrs de Renaturalización			
100 µg/mL	8M	10 µg/mL	1.0µL
100 µg/mL	8M	5 µg/mL	2.0µL
150 µg/mL	8M	10 µg/mL	1.0µL
150 µg/mL	8M	5 µg/mL	2.0µL
Cuantificar a las 12hrs de Renaturalización			
100 µg/mL	8M	10 µg/mL	1.0µL
100 µg/mL	8M	5 µg/mL	2.0µL
150 µg/mL	8M	10 µg/mL	1.0µL
150 µg/mL	8M	5 µg/mL	2.0µL

**Tabla 3.** Ajuste en el análisis de la renaturalización de TcTIM después de ser desnaturalizada con urea 9M.

Controles	
Concentración de TcTIM	Volumen de TcTIM en celda
Cuantificar la Actividad a las 6hrs	
10 µg/mL	1.0µL
5 µg/mL	2.0µL
cuantificar la Actividad a las 12hrs	
10 µg/mL	1.0µL
5 µg/mL	2.0µL

**Tabla 4.** Preparación controles para el análisis de la renaturalización de TcTIM.

## h. Disminución de la Concentración de Urea (M)

El objetivo de este experimento fue disminuir ligeramente la concentración de urea de 8 a 7.5M con el fin de mejorar la actividad de TcTIM, se disminuyó la concentración de urea residual de 0.5 a 0.49M y se observó una mejoría de 92% (Tabla 9) a 94% (Tabla 11).

Concentración de TcTIM en la Desnaturalización		Concentración de UREA	Volumen en celda
Cuantificación de Actividad a las 6hrs			
En la Desnaturalización	En la Renaturalización		
150 µg/mL	20 µg/mL	7,5M	0.5µL
150 µg/mL	15 µg/mL	7,5 M	0.75µL
150 µg/mL	10 µg/mL	7,5 M	1.0µL
Controles			
	20 µg/mL	0,99 M	0.5µL
	15 µg/mL	0,74 M	0.75µL
	10 µg/mL	0,49 M	1.0µL
	20 µg/mL	0	0.5µL
	15 µg/mL	0	0.75µL
	10 µg/mL	0	1.0µL
	20 µg/mL	0,99 M	0.5µL

**Tabla 5.** Disminución en la concentración de urea a 7.5M en el análisis de la renaturalización de TcTIM después de ser desnaturalizada.

En este experimento se aumentó ligeramente la cantidad de proteína (Tabla 6) para disminuir la cantidad de urea y observar el efecto que tiene la disminución de urea sobre la actividad catalítica de la TcTIM (Tabla 12).



Concentración de TcTIM en la Desnaturalización		UREA	Volumen en Celda
Cuantificación de Actividad a las 6hrs			
200 µg/mL	20 µg/mL	7,5 M	0.5µL
200 µg/mL	15 µg/mL	7,5 M	0.75µL
200 µg/mL	10 µg/mL	7,5 M	1.0µL
Controles			
Concentración de TcTIM en la Desnaturalización		Concentración de Urea	Volumen en celda
20 µg/mL		0,74 M	0.5µL
15 µg/mL		0,56 M	0.75µL
10 µg/mL		0,37 M	1.0µL
20 µg/mL		0	0.5µL
15 µg/mL		0	0.75µL
10 µg/mL		0	1.0µL

**Tabla 6.** Ajuste en la concentración de TcTIM después de ser desnaturalizada con urea 7.5M

### **i. Preparación de Reactivos**

1. Medio Luria-Bertani (LB) para un litro:

Colocar en un matraz Erlenmeyer 10g Hidrolizado de Caseína, 5g de Extracto de levadura, 9g NaCl, 1g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

2. Buffer de lisis:

Colocar en un recipiente 25mM MES, 1mM DTT, 1mM EDTA, 0.2mM PMSF y agua destilada.

3. Buffer A:

En un matraz Erlenmeyer de 1000mL 50mM TEA, 1mM DTT, 1mM EDTA 1mM Azida de sodio y agua destilada.

4. Buffer B:

En un matraz Erlenmeyer de 1000mL 50mM TEA, 1mM DTT , 1mM EDTA, 1mM Azida de sodio, 200mM NaCl y agua destilada.

5. Amortiguador TED (TED 100/10/1, pH 7.4):  
En un matraz Erlenmeyer de 250mL 100 mM, TEA, EDTA 10 mM, DTT 1mM.
6. Amortiguador TED (TED 20/10/1, pH 7.4): Colocar en un matraz Erlenmeyer de 250mL 20 mM, TEA, EDTA 10 mM, DTT 1mM.
7. Inductor Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM. 34  $\mu$ l de IPTG.

# CAPITULO IV

## RESULTADOS y ANÁLISIS

### 1. SOBREENPRESIÓN DE TcTIM

Ver apéndice 1

### 2. PURIFICACIÓN DE TcTIM

Ver apéndice 1

### 3. ESTUDIOS DE ESTRUCTURA

#### a. Actividad Específica

A partir de los experimentos de cuantificación de actividad específica se obtuvieron 2 pendientes que se muestran en la Figura 10 y se cuantificó por duplicado.



**Figura 10.** Determinación de la actividad de TcTIM. Grafica que señalan el proceso de actividad. Se cuantificó por duplicado.

Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la actividad específica:

$$\text{Actividad específica}(\mu\text{mol} / \text{min} * \text{mg}) = \frac{\frac{\Delta u.a}{\text{min}}}{\frac{E_{\text{NADH a } 340\text{nm}}}{\mu\text{mol} / \text{mL}} * \text{proteína}(\text{mg} / \text{mL})}$$

En donde:

$E_{\text{NADH a } 340\text{nm}} = 6.22 \text{u.a./}\mu\text{mol/mL}$

Concentración de proteína 5ng/mL

Valor de la pendiente: unidades/min.

$$Actividad\ específica(\mu mol / min * mg) = \frac{\frac{0.1069 u.a}{min}}{\frac{6.22_{NADH\ a\ 340nm}}{\mu mol / mL} * 0.000005(mg / mL)}$$

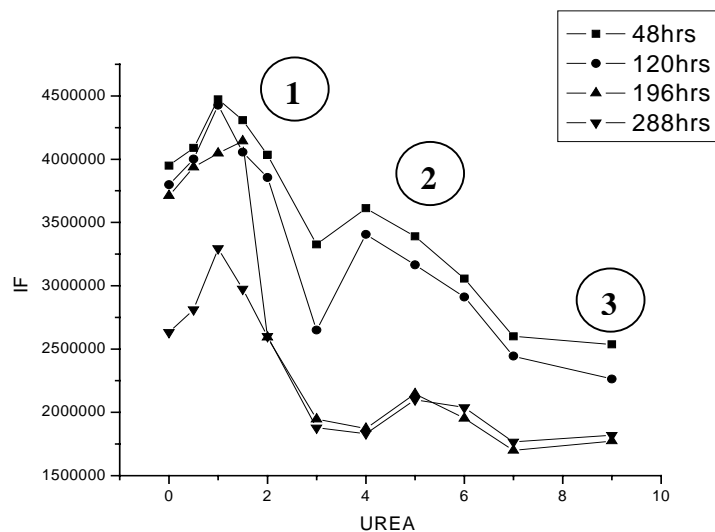
La actividad específica fue de 3437  $\mu mol/min * mg$ .

El comportamiento final del experimento indica que de acuerdo al valor teórico (Ostoa *et al* 1993) de 3600  $\mu mol/min * mg$ . La actividad de esta proteína es adecuada.

Para la pendiente de valor 0.1177 unidades/min., en donde la actividad específica fue de 3784  $\mu mol/min * mg$ .

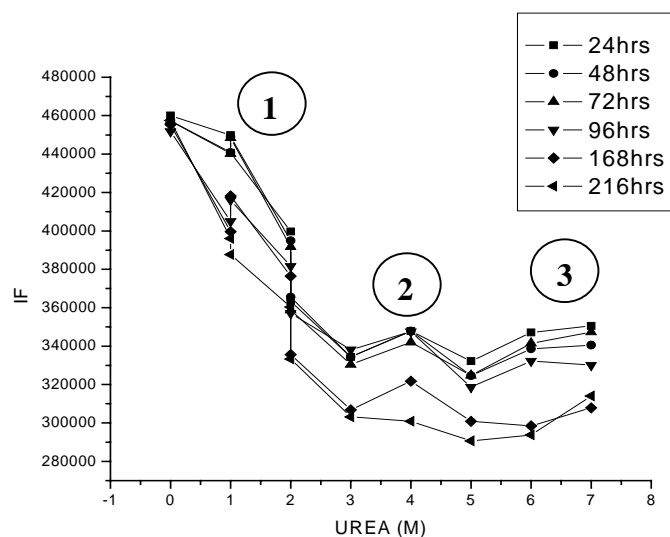
### b. Tiempo de Equilibrio

Los resultados obtenidos para el proceso de desnaturalización se muestran en la Figura 11.



**Figura 11.** Determinación del tiempo de equilibrio para la desnaturalización de TcTIM con urea las muestras se incubaron a los tiempos señalados y su intensidad de fluorescencia cuantificada a 295nm, se señala el numero de pasos.

Se determinó que el tiempo de equilibrio para el proceso de desnaturalización es de 200 hrs, después de este tiempo el perfil no presenta mayor cambio según el patrón obtenido por intensidad de fluorescencia. Se observa un patrón de 3 pasos a partir de 0.5 y hasta 3M hay una población y en 7M hay otra una población intermedia. Los resultados obtenidos para el proceso de renaturalización se muestran en la Figura 12.



**Figura 12.** Determinación del tiempo de equilibrio para la renaturalización de TcTIM con urea las muestras fueron incubadas a los tiempos señalados y su intensidad de fluorescencia cuantificada a 295nm se señala el numero de pasos.

Con este patrón se determinó que el tiempo de equilibrio para el proceso de renaturalización es de 96hrs, después de este tiempo, el perfil no presentó mayor cambio.

En las concentraciones 3 - 5M se observa un estado intermedio de la enzima.

Se puede determinar que la renaturalización se realiza en 3 estados.

### **c. Estudio de Intensidad de Fluorescencia Cambio en la Estructura Terciaria.**

#### **1) Patrón de Desnaturalización y Renaturalización de TcTIM con urea, en Función de Longitud de Onda Máxima.**

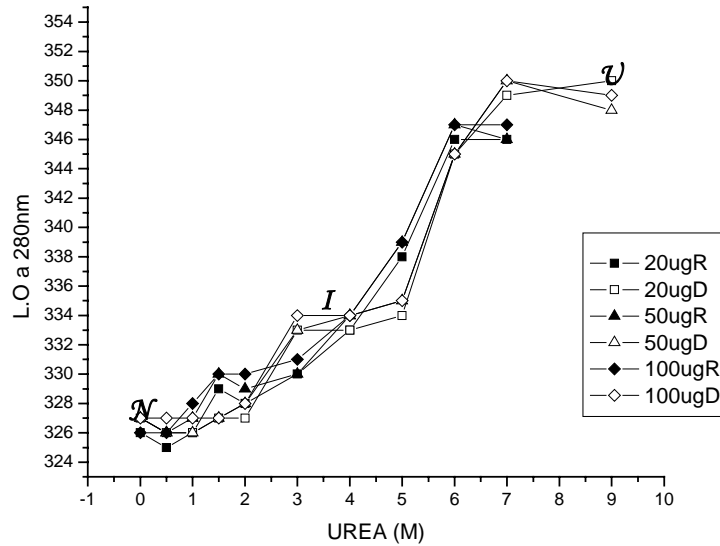
El análisis de la longitud de onda en función de la concentración de desnaturalizante para ambos procesos a 280 y 295nm es presentado en las Figuras 13 y 14.

Los procesos son distintos, en la desnaturalización a 280nm hay un intermediario en la concentración de 3M a 5M al excitar a los residuos aromáticos Triptófano, Fenilalanina y Tirosina, de la proteína en cambio en la renaturalización el desequilibrio se presenta en las concentraciones 1.5M-2M, en el patrón a 295nm al inicio algunas muestras de renaturalización presentaron mayor longitud de onda con respecto a las de desnaturalización.

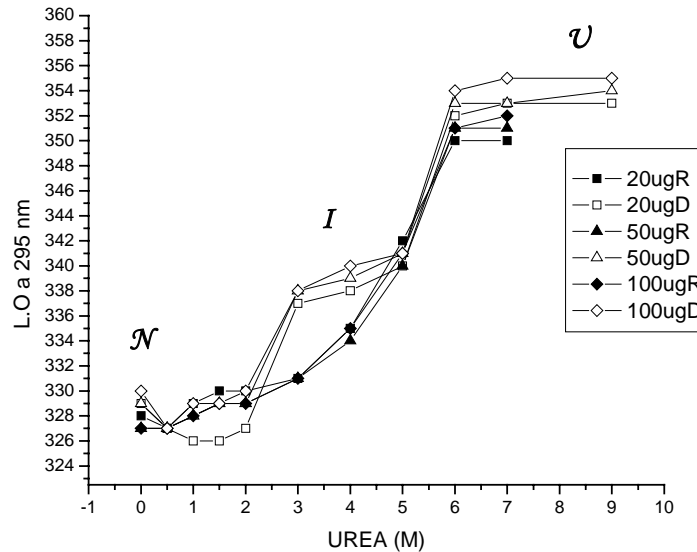
En ambos casos (280nm y 295nm) en la desnaturalización hay un intermediario entre 3-5M hay una pequeña meseta, las muestras desnaturalizadas tiene mayor longitud de onda que las de renaturalizadas.

De acuerdo a lo anterior, es posible suponer que el patrón es de 3 estados para la desnaturalización y el de renaturalización es de 2 estados.

En las Figuras 13 y 14 se muestran los patrones seguido por cambios en la intensidad de fluorescencia (IF) de TcTIM para los procesos de desnaturalización (o) y renaturalización (●).



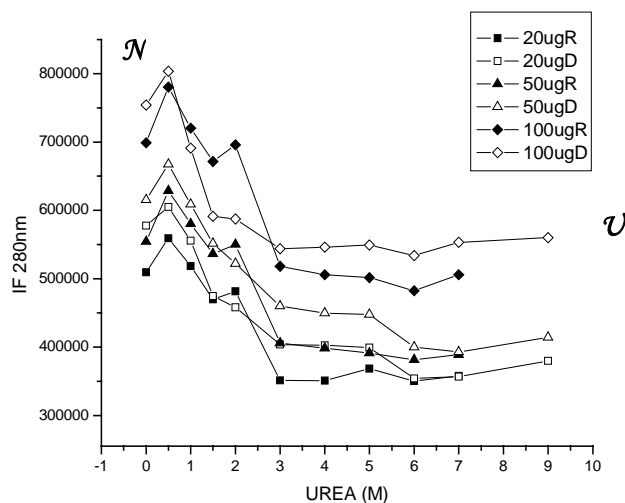
**Figura 13.** Cambio en la estructura terciaria de TcTIM. Comparación del proceso de desnaturalización (D) y renaturalización (R) determinando la  $\lambda$  máxima en función de la concentración de urea, excitando a 280nm (N) nativa, (I) intermediario, (U) desplegado.



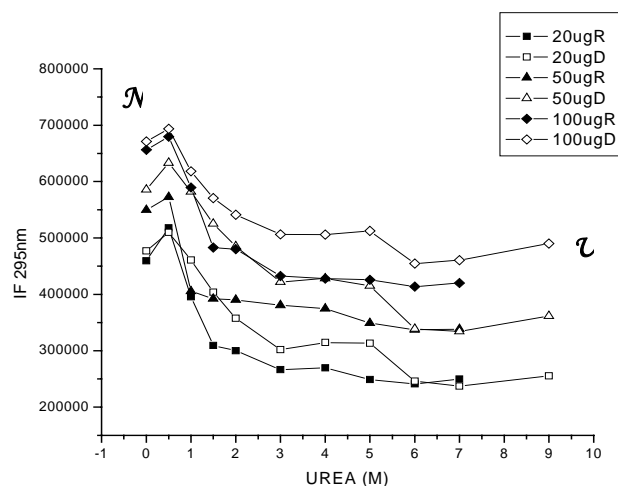
**Figura 14.** Cambio en la estructura terciaria de TcTIM. Comparación del proceso de desnaturalización (D) y renaturalización (R) determinando la  $\lambda$  máxima en función de la concentración de urea, excitando a 295nm, (N) nativa, (I) intermediario, (U) desplegado.

## 2) Patrón de Desnaturalización y Renaturalización de TcTIM con urea, en Función de Intensidad de Fluorescencia Máxima.

El análisis de la intensidad de fluorescencia (IF) en función de la concentración de desnaturalizante se presenta en las Figuras 15 y 16.



**Figura 15.** Cambio en la estructura terciaria de TcTIM. Comparación del proceso de desnaturalización (D) y renaturalización (R) determinando la IF máxima en función de la concentración de urea, excitando a 280nm.



**Figura 16.** Cambio en la estructura terciaria de TcTIM. Comparación del proceso de desnaturalización (D) y renaturalización (R) determinando la IF máxima en función de la concentración de urea, excitando a 295nm.



Los procesos son distintos ya que se puede observar en la desnaturalización a 280nm hay un cambio en la intensidad mínimo en la concentración de 3M y 5M y en la renaturalización el cambio es en 1.5M a 2M y es más visible, este perfil se puede deber a que a 280nm se excitan a los residuos aromáticos Triptófano, Fenilalanina y Tirosina y a 295nm el perfil es más claro porque a esta longitud solo se excita al residuo aromático Triptófano. En la excitación a 295nm para la desnaturalización hay una disminución de IF en la concentración 3M y se mantiene hasta 5M, en 6M hay otra disminución, en la renaturalización solo hay una disminución considerable en 1.5M a 2M después la Intensidad de Fluorescencia se mantiene con ligeros cambios.

### **3) Centro de Masa Espectral (SCM). Patrón de Plegamiento y Desplegamiento de TcTIM con Urea.**

Una vez obtenidos los datos de Intensidad de Fluorescencia y longitud de onda se puede determina el Centro de Masa Espectral, basándose en la siguiente fórmula:

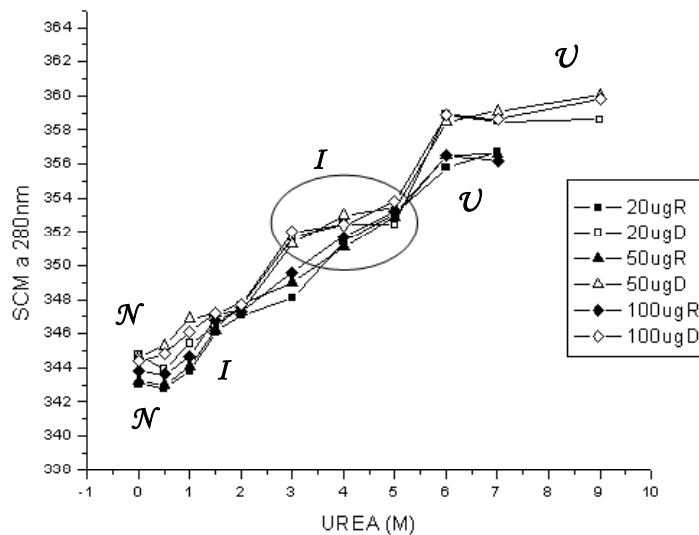
$$SCM = \frac{\sum \lambda I(\lambda)}{\sum I}$$

Donde,

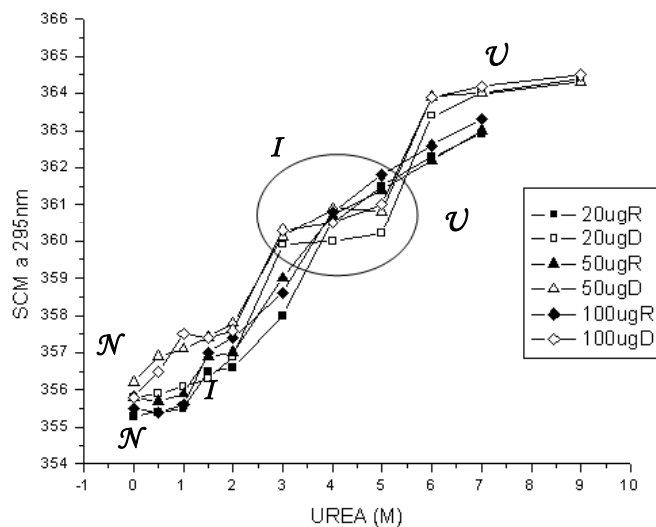
$\lambda$  = longitud de onda

$I(\lambda)$  = Intensidad de Fluorescencia a la longitud de onda particular

El patrón del cambio en el Centro de Masas Espectral (CMS) para la desnaturalización y la renaturalización, obtenido mediante la fórmula mencionada anteriormente, a 280nm y 295nm se muestra en las Figuras 17 y 18.



**Figura 17.** Cambio en la estructura terciaria de TcTIM. Comparación del proceso de desnaturalización (D) y renaturalización (R) siguiendo el cambio en el CMS, excitando a 280nm. (N) nativa, (I) intermediario, (U) desplegado.



**Figura 18.** Cambio en la estructura terciaria de TcTIM. Comparación del proceso de desnaturalización (D) y renaturalización (R) siguiendo el cambio en el CMS, excitando a 295nm. (N) nativa, (I) intermediario, (U) desplegado.

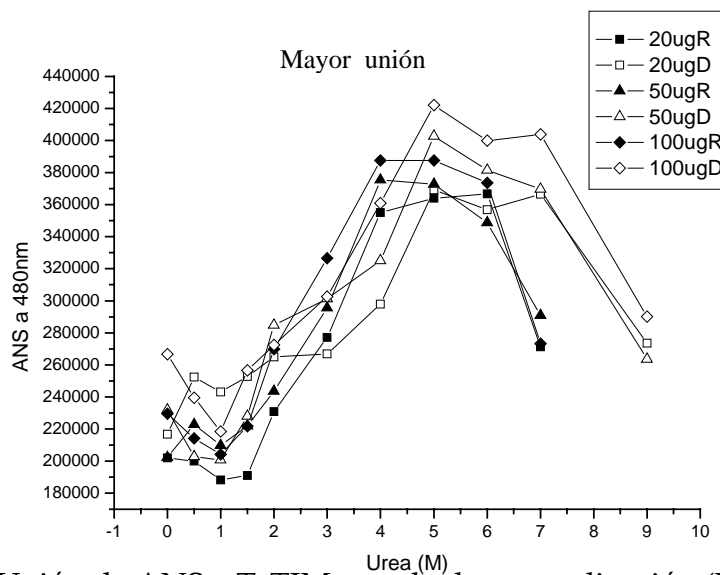
En el SCM se ve un estado intermedio en la desnaturalización en las concentraciones 3-5M de urea (Figuras 17 y 18) para 20 $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL y 100 $\mu$ g/mL de TcTIM, en la longitud de onda también está presente este cambio (Figuras 13 y 14), el estado intermedio lo encontramos en la renaturalización en 0.5 a 2M pero es mínimo

(Figuras 17 y 18 para 20µg/mL, 50 µg/mL y 100µg/mL de TcTIM) después de la concentración 3M de urea el patrón es monofásico.

#### 4) Unión de la ANS (1-anillo-8 naftalenosulfonato) Patrón de Plegamiento y Desplegamiento de TcTIM con Urea

Para lograr obtener el espectro de fluorescencia extrínseca se adicionó 100µM de ANS a cada muestra antes de su lectura. La IF se tomó del primer pico presente en el espectro alrededor de 480nm.

La lectura de fluorescencia del ANS se realiza excitando la muestra a 360nm con barridos de 400-560nm, después de adicionar a la celda una alícuota de una solución madre de ANS, buscando que la concentración final sea de alrededor de 100µM. Los resultados obtenidos para los procesos de desnaturalización y renaturalización de TcTIM (20µg/mL, 50 µg/mL y 100µg/mL) a diferentes concentraciones de desnaturalizante se presentan en la Figura 18.



**Figura 19.** Unión de ANS a TcTIM para la desnaturalización (D) y renaturalización. (R) Determinación de la IF del ANS a 480nm en función de la concentración de urea.

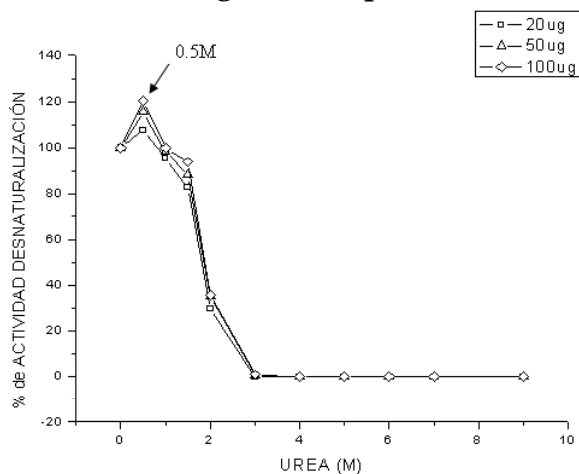
La Figura 19 representa el patrón de la unión del ANS con TcTIM la unión del fluoróforo se encuentra en la concentración 5M de urea para la desnaturalización y la renaturalización.

## 4. Caracterización por Actividad

### a. Patrón de Caracterización por Actividad

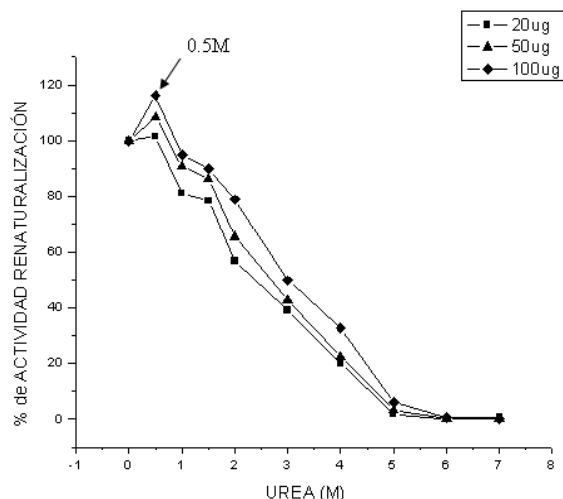
Actividad en la desnaturalización

Se tienen como resultado los siguientes patrones:



**Figura 20.** Patrón de desnaturalización de TcTIM seguido por cambios en la actividad catalítica como función de la concentración de urea.

Como se puede observar en la Figura 20 el patrón obtenido al cuantificar la actividad catalítica como función de la concentración de urea es más sencillo que aquel encontrado al estudiar cambios en la estructura terciaria (ver Figuras 13 y 14) aparentemente es una transición monofásica con un pequeño incremento a la concentración 0.5M de urea. La señal de actividad se pierde en la concentración 3M.



**Figura 21.** Patrón de renaturalización de TcTIM seguido por cambios en la actividad catalítica como función de la concentración de urea.

Como se puede observar en la Figura 21 el patrón obtenido al cuantificar la actividad catalítica como función de la concentración de urea es más sencillo que aquel encontrado al estudiar cambios en la estructura terciaria (ver Figuras 13 y 14) aparentemente es una transición monofásica con un pequeño incremento a la concentración 0.5M de urea.

En la desnaturalización la enzima pierde la señal de actividad biológica en la concentración 3M que es donde presenta un cambio de estado seguido por cambios en la IF, en la LO y en el SCM (Figuras 13 a 18)

## **b. Reversibilidad del Proceso de Desnaturalización de TcTIM**

### **1) Efecto de la Concentración de Proteína (500µg, 200µg, 100µg, 50µg, 25µg)**

Concentración de Tc TIM en la Desnaturalización	UREA	Concentración de Tc TIM en la Renaturalización	Concentración de urea residual	Actividad específica (5ng TcTIM) $\mu\text{mol}/\text{min. mg}$	% normalizado al control correspondiente	Volumen de TcTIM en celda
Cuantificación de Actividad a las 12hrs a 340nm						
500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7,3M	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,15M	214	10	4.0 $\mu\text{L}$
		5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,07M	122	7	4.0 $\mu\text{L}$
		2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,04M	51	8	4.0 $\mu\text{L}$
368 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8M	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,1M	29	2	4.0 $\mu\text{L}$
		2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,1M	0	0	0
200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8M	4 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,16M	289	36	4.0 $\mu\text{L}$
		2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,08M	0	0	0
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8M	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,8M	3688	86	1.0 $\mu\text{L}$
		5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,4M	1378	76	1.0 $\mu\text{L}$
		2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,2M	23	4	1.5 $\mu\text{L}$
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8M	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,8M	420	23	1.0 $\mu\text{L}$
		2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,4M	11	2	1.5 $\mu\text{L}$
25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8M	2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,8M	153	25	1.5 $\mu\text{L}$

**Tabla 7.** Análisis de la renaturalización de TcTIM después de ser desnaturalizada con urea 9M

Controles sin Urea Cuantificación a las 12hrs a 340nm		
Concentración de TcTIM	Actividad específica $\mu\text{mol}/\text{min. mg}$	Volumen de TcTIM en celda
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4119	1.0 $\mu\text{L}$
5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1814	1.2 $\mu\text{L}$
4 $\mu\text{g}/\text{mL}$	807	1.5 $\mu\text{L}$
2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	617	2.0 $\mu\text{L}$

**Tabla 8.** Lecturas obtenidas de los controles para concentraciones

De este experimento podemos observar que en concentraciones elevadas (500 $\mu\text{g}$ -200 $\mu\text{g}$ ) de proteína (en desnaturalización) la enzima no presenta actividad esto se puede deber a que en estas concentraciones hay gran cantidad de proteína que no permite que el sitio activo sea expuesto con facilidad tal vez existe agregación inespecífica. A concentraciones bajas (50 $\mu\text{g}$ -25 $\mu\text{g}$ ) la TcTIM no presenta actividad puede deberse a que una cantidad baja de proteína contenida en un alto volumen de amortiguador y urea afectaron a la enzima de

tal modo que no pudo unirse como dímero y por tal motivo no presentó actividad, se favorece la disociación más que la asociación.

Sin embargo a concentraciones intermedias en la concentración de 100µg en la desnaturalización se observó una reversibilidad del 86% para muestras incubadas a una concentración de 10µg en la renaturalización y del 76% para aquellas incubadas a 5µg en la renaturalización.

## 2) Resultados de la Concentración 100µg/mL y 150µg/mL

Los resultados obtenidos al realizar el protocolo en donde se incubaron las muestras a 150µg/mL de TcTIM y a concentraciones crecientes de desnaturalizante llevándolas al equilibrio a 25 °C. Una vez obtenidas dichas condiciones se renaturalizó durante 6hrs eliminando la urea. Posteriormente, se cuantificó la actividad catalítica de cada muestra obteniendo los siguientes comportamientos presentados en las Tablas 9 y 11.

Concentración de Tc TIM en la Desnaturalización	UREA	Concentración de Tc TIM en la Renaturalización	Concentración de urea residual	Actividad específica (5ng TcTIM) µmol/min. mg	% normalizado al control correspondiente	Volumen de TcTIM en celda
Cuantificación de Actividad a las 6hrs de Renaturalización						
100 µg/mL	8M	10 µg/mL	0,8M	3645	91	1.0µL
100 µg/mL	8M	5 µg/mL	0,4M	444	11	2.0µL
<b>150 µg/mL</b>	<b>8M</b>	<b>10 µg/mL</b>	<b>0,5M</b>	<b>3706</b>	<b>92</b>	<b>1.0µL</b>
150 µg/mL	8M	5 µg/mL	0,3M	511	13	2.0µL
Cuantificación de Actividad a las 12hrs de Renaturalización						
100 µg/mL	8M	10 µg/mL	0,8M	3154	85	1.0µL
100 µg/mL	8M	5 µg/mL	0,4M	608	72	2.0µL
150 µg/mL	8M	10 µg/mL	0,5M	3297	89	1.0µL
150 µg/mL	8M	5 µg/mL	0,3M	441	17	2.0µL

**Tabla 9.** Concentraciones 100 y 150µg/mL en la desnaturalización y renaturalización a 10 µg/mL.

Controles		
Concentración de TcTIM	Actividad específica $\mu\text{mol}/\text{min. mg}$	Volumen de TcTIM en celda
Cuantificación de Actividad a las 6hrs		
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4003	1.0 $\mu\text{L}$
5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3817	2.0 $\mu\text{L}$
Medición de Actividad a las 12hrs		
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3684	1.0 $\mu\text{L}$
5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	839	2.0 $\mu\text{L}$

**Tabla 10.** Lecturas obtenidas de los controles para concentraciones 100 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$  en la desnaturalización.

Concentración de Tc TIM en la Desnaturalización	UREA	Concentración de urea residual	Concentración de Tc TIM en la Renaturalización	Actividad específica $\mu\text{mol}/\text{min. mg}$	% Promedio normalizado al control con urea	% Promedio normalizado al control sin urea	Volumen de TcTIM en celda
Cuantificación de Actividad a las 6hrs							
150 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7,5M	0,99 M	20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1614	39	35	0.5 $\mu\text{L}$
150 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7,5 M	0,74 M	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2752	70	61	0.75 $\mu\text{L}$
150 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7,5 M	0,49 M	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4479	97	94	1.0 $\mu\text{L}$
Controles							
Concentración de Tc TIM en la Desnaturalización		Concentración de urea		Actividad específica $\mu\text{mol}/\text{min. mg}$	Volumen en celda		
20 $\mu\text{g}/\text{mL}$		0,99 M		4170	0.5 $\mu\text{L}$		
15 $\mu\text{g}/\text{mL}$		0,74 M		3945	0.75 $\mu\text{L}$		
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$		0,49 M		4614	1.0 $\mu\text{L}$		
20 $\mu\text{g}/\text{mL}$		0		4605	0.5 $\mu\text{L}$		
15 $\mu\text{g}/\text{mL}$		0		4547	0.75 $\mu\text{L}$		
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$		0		4746	1.0 $\mu\text{L}$		

**Tabla 11.** Lecturas obtenidas de la Concentración 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$  en la desnaturalización y renaturalización a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Con lo anterior, se demuestra que el proceso de desnaturalización de TcTIM es un proceso totalmente reversible cuando se parte de la enzima totalmente desnaturalizada en 8M de urea y a una concentración de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de TcTIM incubado durante 6 horas en la renaturalización. En estas condiciones se observó una reversibilidad del 92% a una concentración de 10 $\mu\text{g}$  (en la renaturalización) y del 11% en la de 5 $\mu\text{g}$  (en la renaturalización).



### 3) Resultados de la Concentración 200µg/mL

Concentración de Tc TIM en la Desnaturalización	UREA	Concentración de urea residual	Concentración de Tc TIM en la Renaturalización	Actividad específica µmol/min. mg	% Promedio normalizado al control con urea	% Promedio normalizado al control sin urea	Volumen en celda
Cuantificación de Actividad a las 6hrs							
200 µg/mL	7,5 M	0,74 M	20 µg/mL	1598	38	38	0.5µL
200 µg/mL	7,5 M	0,56 M	15 µg/mL	1240	30	29	0.75µL
200 µg/mL	7,5 M	0,37 M	10 µg/mL	1061	25	23	1.0µL
Controles							
Concentración de Tc TIM en la Desnaturalización		Concentración de urea		Actividad específica µmol/min. mg	Volumen en celda		
20 µg/mL		0,74 M		4186	0.5µL		
15 µg/mL		0,56 M		4074	0.75µL		
10 µg/mL		0,37 M		4293	1.0µL		
20 µg/mL		0		4154	0.5µL		
15 µg/mL		0		4283	0.75µL		
10 µg/mL		0		4559	1.0µL		

**Tabla 12.** Resultados del ajuste en la concentración de TcTIM y disminución de la concentración de urea.

Al aumentar la cantidad de proteína ligeramente para disminuir la cantidad de urea y observar el efecto que tiene la disminución de urea sobre la actividad catalítica de la TcTIM es claro que, el porcentaje de reactivación de la enzima depende de la concentración de proteína, del tiempo de incubación en la renaturalización y de la cantidad de desnaturalizante en la primera etapa ya que a 150µg/mL/8Murea/6hrs presenta una mayor recuperación de la actividad y a 200µg/mL la enzima tiende a perder más fácilmente su actividad.

# CAPITULO V

## CONCLUSIONES

### 1. CONCLUSIÓN DEL EXPERIMENTO DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA

El estudio nos permitió determinar que la actividad catalítica de cada una de las muestras desnaturalizadas y renaturalizadas con urea, presentan las cualidades necesarias de actividad biológica para utilizarla en los siguientes experimentos.

### 2. CONCLUSIÓN DEL EXPERIMENTO DE TIEMPO DE EQUILIBRIO

La caracterización de los procesos de desnaturalización y renaturalización de la TIM de *Trypanosoma cruzi*, seguido por el cambio en la estructura terciaria por intensidad de fluorescencia en función de la concentración de urea indica que los procesos alcanzan el equilibrio después de 200hrs para la desnaturalización y 100hrs para la renaturalización a una temperatura de 25 °C.

Comparando el patrón obtenido en los experimentos de tiempo de equilibrio para la desnaturalización y renaturalización se observa que la enzima sigue el mismo patrón al renaturalizarse que al desnaturalizarse la diferencia estriba en que la aparición del estado intermediario no ocurre en las mismas concentraciones de desnaturalizante.

### 3. CONCLUSIÓN CON RESPECTO AL PATRÓN DE DESNATURALIZACIÓN Y RENATURALIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA

En patrón de desnaturalización y renaturalización para longitud de onda máxima, intensidad de fluorescencia máxima, y el centro de masa espectral se concluye que para la desnaturalización hay un estado intermedio en las concentraciones 3M a 5M de urea que no se observa, en la renaturalización se puede observar claramente que se presenta un intermediario, a bajas concentraciones de urea, que presenta mayor actividad que la enzima nativa, en la concentración de desnaturalizante de 0.5M. Este mismo comportamiento se puede apreciar en los anteriores experimentos en el que a la misma concentración presenta mayor IF que la enzima nativa. Se determina que la enzima resiste concentraciones de hasta 1M sin perder totalmente su actividad.

En la renaturalización la señal de actividad biológica se pierde totalmente en concentración 5M sin embargo hay un cambio significativo de ésta en la concentración 1.5M-2M a partir de 2M descende la actividad de la enzima se ve un aumento en la concentración 0.5M con respecto a la nativa alrededor de 25% en cual se observa en los patrones de IF, LO y SCM (Figuras 13 a 18) con esto podemos decir que el modelo es de 2 estados para la renaturalización y 3 estados para la desnaturalización. Con respecto a la concentración el patrón de actividad no varió significativamente aunque se observan patrones mejor definidos a concentraciones bajas de proteína. La Unión del ANS (1-anillo-8 naftalenosulfonato) es en las concentraciones 1.5 a 3M de urea en ambos casos y para todas las concentraciones de TcTIM. (Figura 19).

Con la Figura 20 se determina que TcTIM logra recuperar su actividad después de su desnaturalización-renaturalización con urea, a

una concentración de alrededor de 0.5 M de desnaturizante presenta mayor actividad catalítica que la enzima nativa, y que en el caso de la incubación a 3M de urea la enzima mantiene cerca del 40% de su actividad hasta concentraciones alrededor de 3M de urea para la renaturalización y 2M para la desnaturalización.

#### **4. CONCLUSIÓN ACERCA DE LA CARACTERIZACIÓN POR ACTIVIDAD (PROCESO DE REVERSIBILIDAD)**

En este experimento podemos concluir que en concentraciones elevadas (500 $\mu$ g-200 $\mu$ g) de TcTIM (en desnaturalización) la enzima no presenta actividad a concentraciones bajas (50 $\mu$ g-25 $\mu$ g) la TcTIM (en desnaturalización) no presenta actividad.

Sin embargo a concentraciones intermedias, en la concentración de 100 $\mu$ g y 150 $\mu$ g de TcTIM en la desnaturalización la enzima presentó una reversibilidad de 89% y 91% respectivamente, siendo a 150 $\mu$ g /mL con 7.5M urea en la desnaturalización y 6hrs de incubación, estas muestras presentan una mayor recuperación de la actividad.

## PERSPECTIVAS

Este proyecto tiene una gran importancia ya que el modelo de estudio obtenido podría ser extrapolado al comportamiento de otras enzimas es por eso que se debe ampliar su estudio y dilucidar la con más detalle la estructura secundaria analizarla y así obtener mayor información acerca del patrón de TcTIM con urea.

Además con la información recabada en estos experimentos se pretende en un futuro confirmar la presencia o no de un intermediario en la concentración de 0.5M de urea en esta concentración se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia y en la actividad de la enzima y así conocer aun más acerca del patrón de plegamiento y desplegamiento conocer todo acerca de estas reacciones es importante por la repetida participación de esta proteína y otras en el metabolismo.

Otra perspectiva es realizar estudios de intensidad de fluorescencia pero a diferentes temperaturas con el propósito de observar el comportamiento de la enzima aumentando o disminuyendo la temperatura y ver efectos sobre la velocidad de reacción de TcTIM y los efectos que tiene sobre su actividad como hemos visto es una enzima muy resistente a las condiciones a las que ha sido sometidas en este proyecto.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Albert T, Davenport RC, Rose D, Hartman FC, Petsco GA. 1990. Structure of Yeast Triosephosphate Isomerase at 1.9 Å Resolution. *Biochemistry*. 29: 6609-6618.
2. Alvarez WJ, Zelen JP, Mainfroid V, Rentier-Delrue F, Martial JA, Wyns L, Wierenga RK, Maes D. 1998. Triosephosphate Isomerase of the Psychrophilic Bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* 273: 2199-2206.
3. Anfinsen C B. 1973. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science*. 181: 223-230.
4. Aparicio R, Ferreira ST, Polikarpov I. 2003. Closed Conformation of the Active Side Loop of Rabbit Muscle Triosephosphate Isomerase in the Absence of Substrate: Evidence of Conformational Heterogeneity. *J. Mol. Biol.* 334: 1023-1041.
5. Banner DW, Bloomer AC, Petsco GA, Phillips DC, Pogson CI, Willson IA, Connan PH. 1975. Structure of Chicken Triosephosphate Isomerase Determined Crystallographically at 2.5 Å Resolution. *Nature*. 255: 609-614.
6. Beissinger, M y Buchner, J. 1998. How Chaperones Fold Proteins. *Biol. Chem.* 379: 245-259.
7. Blacklow S C, Raimes R T, Lim W A, Zamore P D, Nowles J R. 1988. Triosephosphate Isomerase Catalysis in Diffusion Controlled. *Biochemistry*: 23; 27(4): 1158-1167.

8. Borchert T, Prat K, Zeelen J, Callens M, Noble M, Opperdoes F. 1992. Overexpression of Trypanosomal Triosefosfate Isomerase in *Escherichia coli* and Characterisation of a Dimer-Interface Mutant; *Ital. Biochem.* 211, 703-710
6. Chánez ME, Fernández A, Vázquez E, Coria R, Saab G, and Pérez R.. 2002. Unfolding of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma brucei*: Identification of Intermediates and Insight into the Denaturation Pathway Using Tryptophan Mutants. *Arch Biochem Biophys.* Vol. 399, No. 2, March 15, pp. 117–129.
7. Chánez ME, Pérez G, Sánchez BG, Costas M, and Vázquez E. 2005. Reversible Equilibrium Unfolding of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma cruzi* in Guanidinium Hydrochloride Involves Stable Dimeric and Monomeric Intermediates. *Biochemistry.* 44, 10883-10892.
8. Creighton T. E. Protein Folding. W. H. Freeman and Company. 2da New York, E. U. A. 1993.
9. Creighton T. E. Proteins: Structure and Molecular Properties. 2da. Editorial W. H. Freeman and Company. New York, E. U. A. 1996. 507 pp.
10. Dill KA, Shortle D. 1991. Denatured States of Proteins. *Annu Rev Biochem.* 60: 795-825.
11. Dobson CM. 2003. Protein Folding and Misfolding. *Nature.* 18; 426(6968): 884-890.
12. Ellis RJ, y Pinheiro TJ. 2002 Medicine: Danger--Misfolding Proteins. *Nature.* Apr 4;416(6880): 483-4.

13. Garel J. R. 1992. Folding the Large Proteins: Multidomain and Multisubunit Proteins. In: Protein Folding. T. E. Creighton. 405 - 454.
14. Griffiths, A., Gelbart, W., Miller, J. & Lewontin, R. Genética moderna. McGraw-Hill. Interamericana de España. 2000. 676 pp.
15. Knowles J R. 1991. Enzyme Catalysis: Not Different, Just Better. *Nature*. Mar 14; 350: 121-124.3
16. Leopold PE, Montal M, Onuchic JN. (1992). Protein Folding Funnels: a Kinetic Approach to the Sequence-Structure Relationship. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 15;89(18):8721-5.
17. Maes D, Zeelen JP, Thanki N, Beauchamp N, Alvarez M, Thi MH, Beckmann J, Martial JA, Wuns L, Jaenicke R, Wierenga RK. 1999. The Crystal Structure of Triosephosphate Isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a Comparative Thermostability Structural Analysis of Ten Different TIM Structures. *Proteins Struct. Funct. Genet*. 37: 441-453.
18. Maldonado E, Soriano-García M, Moreno A, Cabrera N, Garza-Ramos G, de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Pérez-Montfort R. 1998. Differences in the Intersubunit Contacts in Triosephosphate Isomerase from Two Closely Related Pathogenic Trypanosomes. *J Mol Biol*. 283: 193-203.
19. Mande SC, Mainfroid V, Kalk KH, Goraj K, Martial JA, Hol WGJ. 1994. Crystal Structure of Recombinant Human Triosephosphate Isomerase a 2.8 Å Resolution. Triosephosphate Isomerase-Related Human Genetics Disorders and Comparison with the Trypanosomal Enzyme. *Protein Sci*. 3: 810-821



20. Martínez Zapién Denise. 2004. Caracterización de la Estabilidad Conformacional de la Subunidad  $\beta$  de la ATP-Sintasa de la Bacteria termofílica *Bacillus PS3*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 76.
21. Mathews C. K, Hole K E, Ahem K G. 2002. Bioquímica. 3ra edición. Addison Wesley. 414.
22. Mullis K. B. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction *Scientific American* vol. 262, págs. 56-65.
23. Nelson D. L. y M. M. Cox. 2000. Lehninger Principles of Biochemistry. 3ra. edición. Editorial Worth. Nueva York, E.U.A. 1152
24. Noble M. M, Celen J. P, Wierenga R. K. 1993. Structure of Triosephosphate Isomerase from *Escherichia coli* Determined a 2.6 Å resolution. *Acta Crystallogr.* D49: 403-417.
25. Onuchic JN, Wolynes PG, Luthey-Schulten Z, Socci ND. 1995. Toward an Outline of the Topography of a Realistic Protein-Folding Funnel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 11; 92(8):3626-30.
26. Ostoa P, Garza G, Ramirez J, Becker I, Berzunza M, Landa A, Gomez A, Tueno de Gomez M, Perez R. 1997. Cloning, Expression, Purification, and Characterization of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J Biochem*, 244, 700-705
27. Pace CN, Shirley BA, McNutt M, Gajiwala K. 1996 Forces Contributing to the Conformational Stability of Proteins. *FASEB J.* Jan; 10(1):75-83.
28. Reardon D, Farber GK. 1995. The structure and evolution of alpha/beta barrel proteins. *FASEB J.* Apr; 9(7): 497-503.

29. Rodríguez-Romero A, Hernández-Santoyo A, del Pozo Yauner L, Kornhauser A, Fernández-Velasco DA. 2002. Structure and Inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Entamoeba histolítica*. *J. Mol. Biol.* 322: 669-675.
30. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk. (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, Volume 150 ;(1): 76-85.
31. Straus Donald, Rainest Ronald, Kawashimat Eric, Knowlest Jeremy R., and Gilbert Walter. 1985. Active Site of Triosephosphate Isomerase: *in vitro* Mutagenesis and Characterization of an Altered Enzyme. *Biochemistry*. April.82: 2272-2276.
32. Symersky J, Li S, Carson M, Luo M. 2003. Structural Genomics of *Caenorhabditis elegans*: triosephosphate isomerase. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 51: 484-486.
33. Vázquez E., Zubillaga, R., Mendoza G., Costas M., and Fernández A. 2000. Equilibrium Unfolding of Yeast Triosephosphate Isomerase: A Monomeric Intermediate in Guanidine-HCl and Two-State Behavior in Urea. *Protein Pept. Lett.* 7, 57-64
34. Velanker SS, Ray SS, Gokhale RS, Suma S, Balaram H, Balaram P, Murthy MRN. 1997. Triosephosphate Isomerase from *Plasmodium falciparum*: the Crystal Structure Provides Insights into Antimalarial Drug Desing. *Structure*. 5: 751-761.
35. Voet D., Voet J. G. 1992. Bioquímica. Editorial Omega. Barcelona, España. 1315.

36. Waley SG. 1973. Refolding of Triosephosphate Isomerase. *Biochem J.* Sep;135 (1): 165-72.
37. Wierenga RK, Noble MEM, Vriend G, Nauche S, Hol WGJ. 1991. Refined 1.83 Å Structure of Trypanosomal Triosephosphate Isomerase Crystallized in the Presence of 2.4 M-ammonium Sulphate. A Comparison with the structure of the Trypanosomal Triosephosphate Isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *J. Mol. Biol.* 220: 295-1015.
38. Williams JC, Zeelen JP, Neubauer G, Vriend G, Backmann J, Michels PA. 1999. Structural and Mutagenesis Studies of *Leishmania* Triosephosphate Isomerase: a Point Mutation Can Covert a Mesophilic Enzyme into a Superstable Enzyme Without losing Catalytic Power. *Protein Eng.* 12: 243-250
39. Zomosa V, Hernández G, Reyes H, Martínez E, Garza G, Pérez R, Tuena de Gómez M, and Gómez A. 2003. Control of the Reactivation Kinetics of Homodimeric Triosephosphate Isomerase from Unfolded Monomers. *Biochemistry*, 42, 3311-3318
40. Zaman V. 1996, Atlas a Color de Parasitología Clínica. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina: 59-92.

# APENDICE 1

## RESULTADOS DE SOBREENPRESIÓN

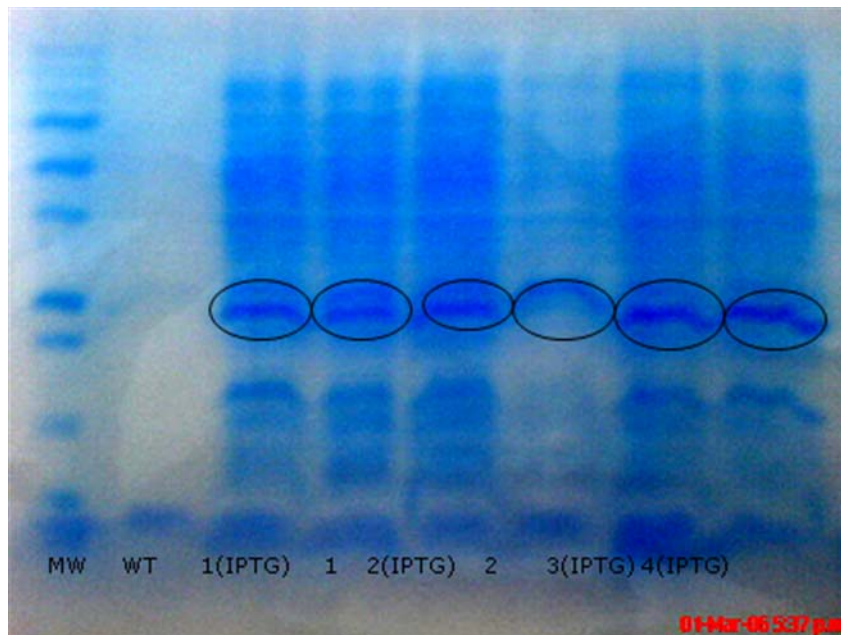


Figura 22. Gel poliacrilamida de sobreexpresión de TcTIM

- Carril 1 MW
- Carril 2 TcTIM WT
- Carril 3 muestra 1 con inductor IPTG
- Carril 4 muestra 1 sin inductor IPTG
- Carril 5 muestra 2 con inductor IPTG
- Carril 6 muestra 2 sin inductor IPTG
- Carril 7 muestra 3 con inductor IPTG
- Carril 8 muestra 3 sin inductor IPTG
- Carril 9 muestra 4 con inductor IPTG
- Carril 10 muestra 4 sin inductor IPTG

## RESULTADOS DE PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EXCLUSIÓN MOLECULAR

- Leer las muestras en el espectrofotómetro a 280nm
- Se obtuvo el siguiente patrón:

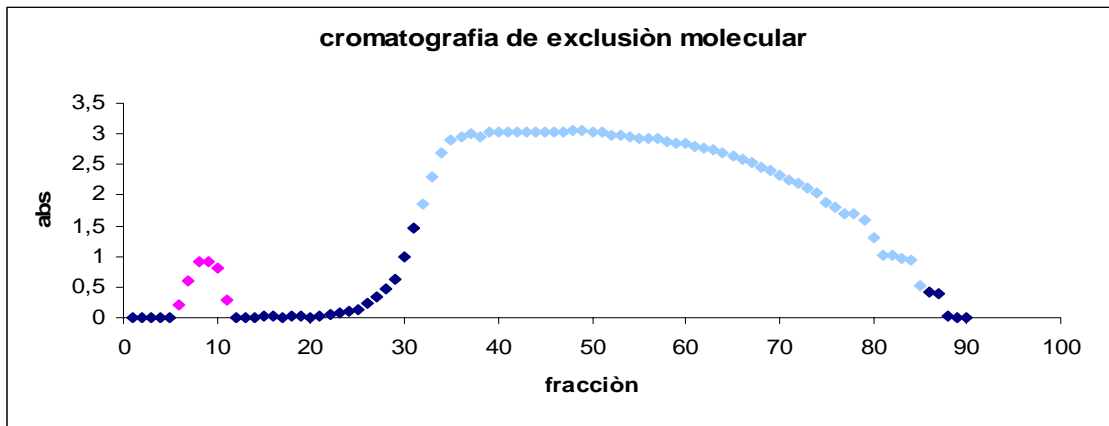


Figura. 23 Patrón de cromatografía de exclusión molecular de TcTIM.

## RESULTADO DE LA PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

- Se llevaron las muestras al espectrofotómetro y se siguieron a 280nm obteniéndose el siguiente patrón :
- Cromatografía por intercambio catiónico (carboximetil sepharosa) Buffer B. NaCl 110 mM, pH 8.0 Muestra cargada en la columna 10 ml

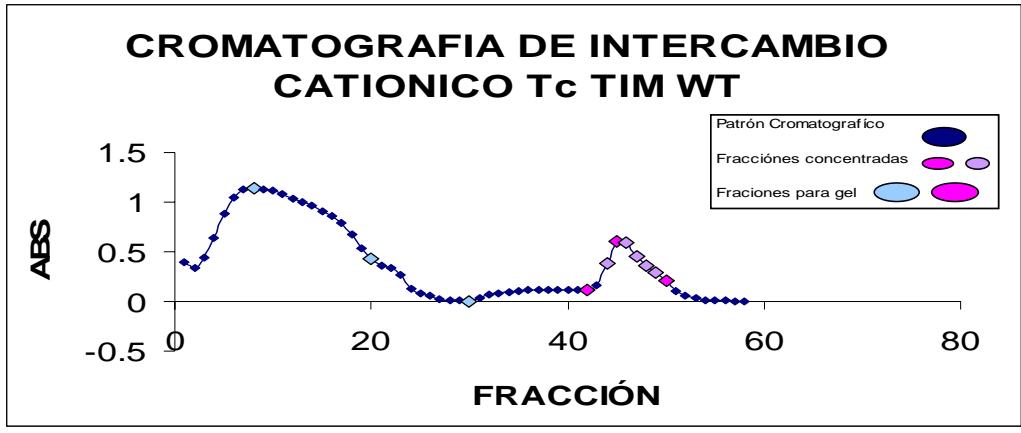


Figura. 24 Patrón de cromatografía de intercambio catiónico de TcTIM.

**PROCESOS DE PURIFICACIÓN**

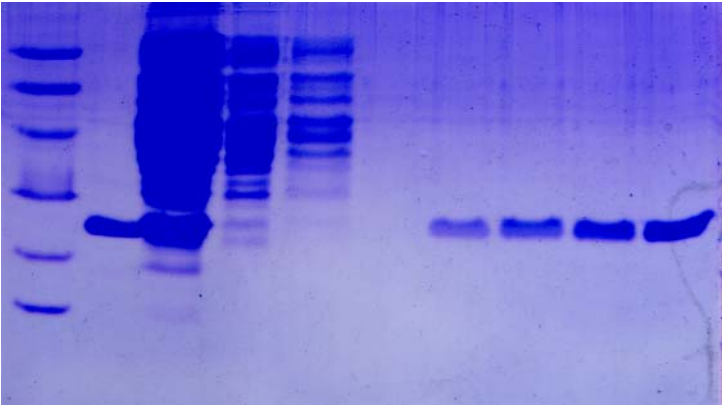












Figura. 25 gel de poliacrilamida purificación de TcTIM wt

-  Carril 1 MW
-  Carril 2 TcTIM WT
-  Carril 3 extracto de exclusión molecular
-  Carril 4 muestra 8
-  Carril 5 muestra 20
-  Carril 6 muestra 30
-  Carril 7 muestra 37
-  Carril 8 muestra 41
-  Carril 9 muestra 45
-  Carril 10 muestra 50

## APENDICE 2

### TABLA DE ABREVIATURAS.

TIM	Triosafosfato isomerasa
TcTIM	Triosafosfato isomerasa del <i>Trypanosoma cruzi</i>
TbTIM	Triosafosfato isomerasa del <i>Trypanosoma brucei</i>
N	Estado nativo
U	Estado desplegado
Gdn- HCl	Clorhidrato de guanidina
SDS	Duodecil sulfato de sodio
DC	Dicroísmo circular
EEB	Encefalopatía epongiforme bovina
EPAP's	Enfermedades relacionadas con el plegamiento anómalo de las proteínas
GAP	Gliceraldehido -3- fosfato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
ATP	Adenosin de trifosfato
N2	Dímero nativo
N2*	Dímero NO nativo
2M	Monómeros compactos
2U	Monómeros desnaturalizados
A	Agregado
pb	Pares de bases
LB	Luria Bertami
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
MES	Ácido 2-[N- Morfolino] etansulfónico
EDTA	Ácido etilendiamin tetraacético
DTT	Ditiotreitol
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
TEA	Trietanolamina
NaN <sub>3</sub>	Azida de sodio
CM	Carboximetil
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina de suero de bovino
SCM	Centro de masa espectral
AE	Actividad específica
IF	Fluorescencia intrínseca
α-GDH	α-glicerol deshidrogenasa
NADH	Nicotin adenin dinucleótido reducido
NAD <sup>+</sup>	Nicotin adenin dinucleótido oxidado
dNTP's	Desoxinucleotidos trifosfatados
dNMP's	Desoxinucleotidos monofosfatados
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amonio
WR	Reactivo de trabajo / Working Reagent