



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CLONACIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE UNA MUTANTE DE LA TRIOSAFOSFATO
ISOMERASA DE *Trypanosoma brucei*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MÓNICA RODRÍGUEZ BOLAÑOS



México D. F.

2010



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: M. en C. Raúl Genaro Aguilar Caballero

VOCAL: Dr. Euclides Avila Chávez

SECRETARIO: Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort

1er. SUPLENTE: Dr. León Patricio Martínez Castilla

2do. SUPLENTE: Dr. Felipe Vaca Paniagua

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 201-OTE DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA
CELULAR, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DR. RUY ENRIQUE PÉREZ MONTFORT

SUSTENTANTE:

MÓNICA RODRÍGUEZ BOLAÑOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 201 oriente del Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del donativo No. 49872, por el programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través del donativo No. IN200507 y por el Programa Nacional de Becas para la Educación Superior (PRONABES)

Agradezco la ayuda técnica de la Bióloga Nallely Cabrera González en la realización del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química y al Instituto de Fisiología celular, por la oportunidad para realizar mis estudios profesionales.

A los miembros del Honorable Jurado por la revisión del manuscrito de tesis y por sus valiosas sugerencias.

Quiero agradecer especialmente:

A mis padres, por todo su cariño, esfuerzo y apoyo durante todo momento. Gracias por ser un ejemplo de lucha y determinación.

A mi hermano Luis Oscar por todos esos momentos de sano entretenimiento y consejos.

A Héctor por todo su amor, paciencia y apoyo a través de todos estos años, no sé en donde estaría yo sin ti...

Al Doctor Ruy por su apoyo, paciencia y por brindarme la oportunidad de integrarme a su grupo.

A Nallely por todas las enseñanzas y consejos que me ha brindado hasta ahora. Gracias por tu amistad y cariño.

Itzhel, gracias por mostrarme el panorama amplio de la biología molecular. Gracias por tu amistad, entusiasmo y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio Guadalupe, Selma, Lucia, Jorge, Edgar y Alex, por su amistad y ayuda. Chicos, gracias por hacer tan amena la estancia en el laboratorio. También gracias a los miembros honorarios, no crean que me he olvidado de ustedes.

A todas las personas que de una forma u otra contribuyeron en mi formación y que hicieron posible que pudiese llegar hasta aquí, en especial agradezco a todos mis maestros por todas sus valiosas enseñanzas. En especial a la Dra. Yolanda Caballero Quezada por mostrarme la entrega y el entusiasmo al transmitir el conocimiento.

Nitry, gracias por compartir todos los buenos momentos, y permanecer en los tiempos más oscuros quiero que sepas que siempre puedes contar conmigo. Difo gracias por compartir siempre esa gran sonrisa que te caracteriza. Chela creo que no tengo más que decirte que: "Tan bella, tan bella, tan bellaaaaaaaaa..." Gracias hacerme saber que siempre puedo llamar cuando lo necesite. Deli: ¡Por fin lo logramos!

Señor Panda, Nancy, Ileana, Pedro, Lalo, Jock, Lucy, César, Samuel, Brisa, Adriana, Ana Silvia, Rosalba, Aída, Ñu, Luisillo, Lauris, Moy, Elivier. ¡Gracias por todo el apoyo, alegría y cariño!

DEDICATORIAS

A mis padres Alicia y José Luis por enseñarme a luchar por mis objetivos.

A mi hermano Luis Oscar por su cariño.

A Héctor Vicente por todo su apoyo, amor y comprensión. Gracias por todo este maravilloso tiempo juntos, por escucharme, por ser mi amigo y hacer que la vida sea mejor a tu lado.

INDICE

Resumen	i
Abreviaturas	iii
1.- Introducción	1
1.1. Los tripanosomátidos	1
1.2. Tripanosomiasis Africana	3
1.3. Ciclo de vida de <i>T. brucei</i>	4
1.4. Manifestaciones clínicas	6
1.5. Tratamiento de la enfermedad	7
1.6. Tripanosomiasis Americana (enfermedad de Chagas)	9
1.7. Tratamiento	12
1.8. Diseño de compuestos especie específicos	12
1.9. Glucólisis en tripanosomátidos	15
1.10. Glicosoma	16
1.11. Características estructurales de la Triosafosfato Isomerasa	19
1.12. Sitio activo	23
1.13. Interfase del dímero	25
1.14. Diferencias entre TcTIM y TbTIM	27
2. Antecedentes.	30
3. Hipótesis	37
4.- Objetivos	38
5.- Estrategia experimental	39
6. Materiales y Métodos	40
6.1. Amplificación del gen de la TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8	40

6.2. Clonación en los vectores pGEM-T- Easy y pET-3a	44
6.3. Transformación en células de sobreexpresión	48
6.4. Ensayos de sobreexpresión	48
6.5. Purificación de la TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8	50
6.6. Determinación de la actividad catalítica de TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8	50
6.7. Estabilidad de la TcTIM1,4;TbTIM 2,3,5-8	52
6.8. Caracterización cinética de la TcTIM1, 4; TbTIM2, 3,5-8	52
6.9. Efecto de los compuestos derivatizantes del grupo sulhídrido (Inactivación por MMTS)	53
6.10. Determinación de las propiedades espectroscópicas	54
6.10.1. Dicroísmo circular	54
6.10.2. Desnaturalización térmica	55
7. Resultados	56
7.1. Amplificación del gen de la TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8	56
7.2. Clonación en los vectores pGEM- T Easy y pET-3a	57
7.3. Transformación en células de sobreexpresión	61
7.4. Ensayos de sobreexpresión	61
7.5. Purificación de la TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8	63
7.6. Determinación de la actividad catalítica de TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8	64
7.7. Estabilidad de la TcTIM1,4;TbTIM 2,3,5-8	66
7.8. Caracterización cinética de la TcTIM1, 4; TbTIM2, 3,5-8	68
7.9. Efecto de los compuestos derivatizantes del grupo sulhídrido (Inactivación por MMTS)	69
7.10. Determinación de las propiedades espectroscópicas	70
7.10.1. Dicroísmo circular	70

7.10.2. Desnaturalización térmica	71
8. Discusión	73
9.- Conclusión	79
10. Perspectivas	79
Bibliografía	80
Apéndice A. Metodologías o Técnicas utilizadas	86
Apéndice B. Reactivos comerciales utilizados	90
Apéndice C. Soluciones	94

Resumen:

Trypanosoma cruzi y *Trypanosoma brucei* son dos parásitos muy relacionados causantes de la enfermedad de Chagas ó tripanosomiasis americana y de la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana. Las enzimas glucolíticas son un blanco atractivo para el diseño de fármacos contra estas enfermedades, ya que en ambos organismos la principal ruta de obtención de energía es la glucólisis. La triosafofato isomerasa (TIM) es una enzima glucolítica homodimérica de aproximadamente 250 aminoácidos, que cataliza la interconversión de gliceraldehído-3-fosfato (G3P) a dihidroxiacetona-fosfato (DHAP). Cada monómero de la TIM se compone de ocho hebras β -plegadas, ocho α -hélices y sus correspondientes asas o giros. En este estudio la TIM se dividió en ocho regiones. Cada región posee una α -hélice, una hoja β -plegada y su correspondiente asa de unión. La similitud de ambas TIMS es muy alta. Si se realiza un alineamiento de ambas secuencias de aminoácidos estas, revelan una identidad de un 73% y de un 82% en sus residuos de interfase. Los carbonos α en ambas estructuras cristalográficas se superponen con un RMS de 0.96Å. Las áreas ocultas al solvente son similares y ambas poseen una cisteína en la posición 15(en TcTIM) y 14 (en TbTIM). Contrariamente al alto grado de similitud que tienen las dos enzimas, estas presentan un comportamiento muy distinto cuando se les incuban con diversos compuestos que modifican la actividad enzimática de la proteína, tales como los agentes derivatizantes de grupo sulfhidrilo (en donde presentan un comportamiento completamente distinto), la susceptibilidad a la digestión con subtilisina (TcTIM es menos sensible que TbTIM), el desplegamiento de los monómeros por efecto del clorhidrato de guanidina (en la cual muestran cinéticas de reactivación muy diferentes). En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio observamos que existen algunas regiones implicadas en el cambio de susceptibilidad de los compuestos de grupo sulfhidrilo, específicamente con el metilmetanotiosulfonato (MMTS); estas regiones se denominaron 1 y 4. Se observó que cuando se introducían las

secuencias de estas regiones a TcTIM, provenientes de TbTIM, sus parámetros cinéticos cambiaron drásticamente, de tal modo que TcTIM se comportaba de como una TbTIM. El propósito de este trabajo fue continuar la investigación de estas regiones. La estrategia experimental a desarrollar incluyó la construcción de una mutante quimérica que contuviera las regiones 1 y 4 de TcTIM y el resto de TbTIM utilizando técnicas de biología molecular. Una vez obtenida, la enzima se sobreexpresó, purificó y caracterizó, a fin de conocer el comportamiento que produce la mutación generada, frente a la acción de agentes derivatizantes de grupo sulfhidrilo. La susceptibilidad de la mutante de TcTIM_{1,4};TbTIM_{2,3,5-8} al MMTS fue mayor, que la que presenta TbTIM; sin embargo, no fue de la misma magnitud que la que presenta TcTIM. Esto implica que el cambio de estas regiones no es suficiente para lograr la conversión de una TbTIM a una TcTIM, sin embargo, la hace mucho más sensible a la acción del MMTS. Lo anterior posiblemente se deba a que la estructura d TbTIM es un poco más rígida que la de TcTIM lo que evita una mayor exposición de las cisteínas en la proteína haciéndola ligeramente resistente al MMTS. Otra posibilidad podría ser que existiera otra región implicada en la diferencia de comportamiento de estas enzimas frente a agentes derivatizantes del grupo sulfhidrilo. La constante de Michaelis-Menten disminuyó un poco con respecto a la de las enzimas silvestres, mientras que su V_{max} se mantiene similar a las reportadas para estas enzimas.

Abreviaturas

BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
DHAP	Dihidroxi acetona fosfato
dNTPS	Mezcla de desoxinucleótidos fosfato
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácidoetilendiaminotetracético
FPLC	Cromatografía líquida de desarrollo rápido (fast performance liquid Chromatography).
GAP	Glicerol fosfato
G3P	D-gliceraldehido 3 fosfato
α -GDH	α -glicerol-3 fosfato deshidrogenasa
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranósido
K_{cat}	Constante catalítica
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio Luria-Bertani
LC	Lisado celular
MES	Ácido 2-N-morfolino etanosulfónico
MMS	Metil metano tiosulfonato
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida y adenina reducido

PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P _i	Fosfato inorgánico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SDS	Duodecil sulfato de sodio
Taq polimerasa	Polimerasa recombinante obtenida del gen de <i>Thermus aquaticus</i>
TbTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
TcTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T.brucei</i> , Tb	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T.b.g</i>	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
<i>T.b.r.</i>	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
<i>T.cruzi</i> , Tc	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TIM	Triosafosfato isomerasa
V _{max}	Velocidad máxima
VSG	Glicoproteína variante de superficie
V ₀	Velocidad inicial

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los tripanosomátidos

La familia de los *Trypanosomatidae* se encuentra compuesta por parásitos eucariontes unicelulares flagelados que pertenecen al orden *Kinetoplastida*, los cuales infectan a una amplia variedad de huéspedes (animales y humanos). Los miembros de estas familias son causantes de varias enfermedades muy severas, que incluso pueden llegar a ser fatales (Cox E., *et. al.*, 1998). Los tripanosomátidos de mayor importancia pública son: **a)** Leishmanias: ya que ocasionan una amplia gama de enfermedades (leishmaniasis visceral o kala azar, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis cutánea ó espundia) **b)** Tripanosomas africanos: que causan la enfermedad del sueño en humanos (*Trypanosoma brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense*) y enfermedades del ganado las cuales generan una considerable pérdida económica (*nagana*, *T. brucei brucei*, *T. congolense* y *T. vivax*) **c)** *Trypanosoma cruzi*: El agente causal de la tripanosomiasis americana, la cual es endémica en América latina. Los tripanosomátidos tienen complejos ciclos biológicos en los cuales generalmente participa un vector invertebrado (insecto hematófago) (Figura 1) y un hospedero mamífero (Cazzulo J., 1992).



Figura 1.- Insectos vectores de dos tripanosomátidos. En la imagen se muestran dos de los insectos vectores: la chinche besucona o vinchuca (*Triatoma infestans*) que transmite a *T.cruzi* y la mosca tsé-tsé (*Glossina sp*), la cual transmite a *T.brucei*. Ambos insectos al alimentarse transmiten el parásito al hospedero.

La mayoría de los tripanosomátidos poseen una morfología básica muy similar, (Figura 2) la cual se encuentra compuesta por un cuerpo basal, núcleo, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, glicosomas (organelos esféricos de 0.7 μM de diámetro cuyo número varía entre especie y la etapa el ciclo del parásito), un flagelo (localizado en la base del cuerpo basal), un paquete flagelar, una mitocondria única con una estructura de DNA condensada en asociación con el cuerpo basal del flagelo y un cinetoplasto (organelo único en el género *Kinetoplastida*) cuya forma y estructura varía según el estadio del parásito. También presentan una membrana celular típica (bicapa lipídica) en asociación con otros componentes como mucinas, transialidasas y glicoproteínas que componen un glucocalix muy denso. Una de las glicoproteínas que se encuentran con mayor abundancia es la denominada glicoproteína variante de superficie (VSG) (Cox E., et. al., 1998; De Souza W., 2009).

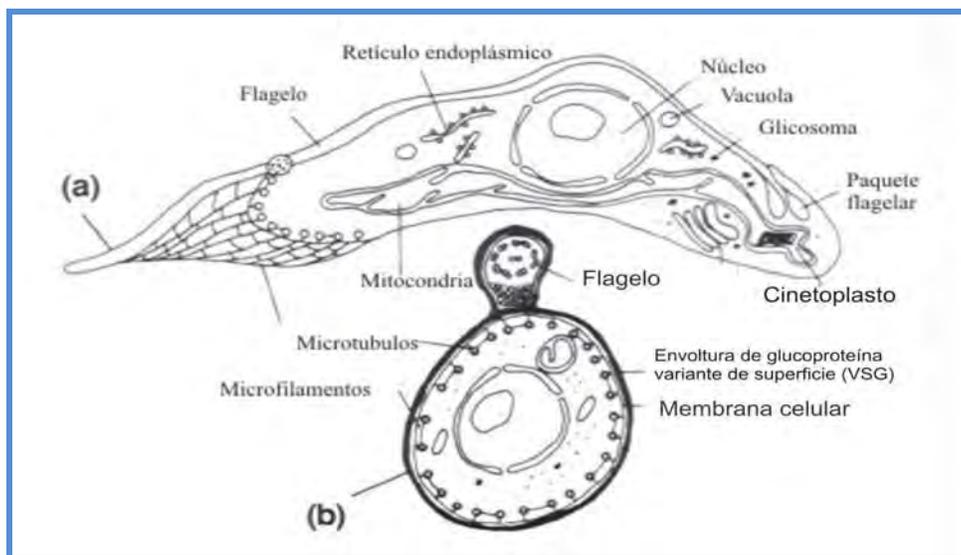


Figura 2.- Estructura básica de los tripanosomas. a) Vista longitudinal del parásito b) Vista transversal del parásito. Modificado de Cox E., et al., (1998).

Las tripanosomiasis son consideradas zoonosis, pues las enfermedades pueden transmitirse de los animales al hombre, generando un severo problema de salud pública debido al estrecho contacto que tiene la población con los diversos reservorios y el parásito (Févre E., *et al.*, 2008).

1.2. Tripanosomiasis Africana

La enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana es causada por algunas especies de *Trypanosoma brucei*. En el hombre, se presentan aproximadamente 70 000 casos nuevos cada año y se estima que existen 60 millones de personas en riesgo a contraer la enfermedad. La enfermedad se adquiere cuando el parásito se transmite al hospedero mediante la picadura (mordedura) de la mosca tsé-tsé (género *Glossina*), portadora del parásito. La mosca tse-tsé es endémica de la región del Subsahara pero solamente algunas especies se han confirmado como vectores del parásito. Por ello se pueden encontrar sitios en donde viven moscas tse-tsé y no se encuentra la enfermedad. En el hombre, existen dos variantes de la enfermedad, la diferencia entre ellas es el parásito que infecta al huésped. Cuando un individuo se encuentra infectado con *T. brucei gambiense* (*T.b.g*) la sintomatología propia de la enfermedad no se presenta en meses, incluso años. Los síntomas más graves se presentan cuando el cuadro de la enfermedad ya se encuentra muy avanzado, es decir, cuando la infección ya se extendió por el sistema nervioso central (SNC). Esta forma, representa casi el 90% de los casos y es propia de la zona central del continente. La otra variante es aquella producida por *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T.b.r*) en el cual se presenta un cuadro agudo; los primeros síntomas de la enfermedad se observan en las primeras semanas o meses después de la infección progresando rápidamente hasta alcanzar al SNC. Solo el 10% de los casos que se presentan se deben a la infección de *T.b.r*. La transmisión de la enfermedad, generalmente ocurre en

zonas rurales (áreas con acceso restringido a sistemas de salud) (Févre E., *et al.*, 2008, WHO control and surveillance of African trypanosomiasis., 2006)

1.3. Ciclo de vida *T. brucei*

El parásito atraviesa por muchos estadios hasta llegar a ser completamente maduro, básicamente cada fase difiere entre sí por el tamaño y metabolismo que presentan, pero su estructura es muy conservada durante todo el ciclo. Esencialmente los estadios por los cuales pasa el parásito son: promastigote procíclico, epimastigote y el tripoamastigote, en el insecto vector, y, en el hospedero mamífero son: epimastigote metacíclico, forma alargada, la forma intermedia y la forma pequeña (Figura 3). En la literatura se pueden encontrar otros nombres u otras subdivisiones aunque hasta ahora no se han encontrado evidencias significativas de que estos cambios sean funcionalmente significativos (Cazzulo J., 1992).

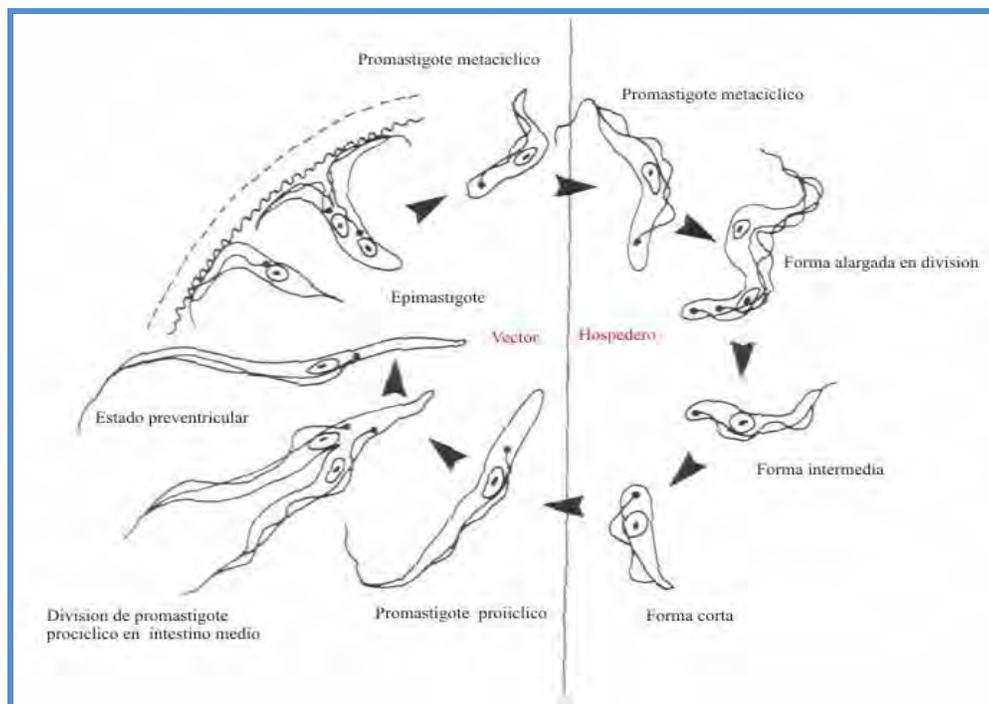


Figura 3.- *Ciclo biológico de los tripanosomátidos*. Modificado de Cox E., *et al.*, (1998).

El ciclo comienza cuando el insecto vector se alimenta de un sujeto infectado e ingiere al parásito, el cual pasa a través del esófago hasta llegar al intestino medio. En el intestino del vector se producen los cambios bioquímicos y morfológicos pertinentes para la transformación del parásito en un amastigote procíclico, en donde se completa la formación de su mitocondria y cambia su superficie para comenzar a dividirse. Una vez estando completamente diferenciado y funcional la forma procíclica comienza a transformarse a la forma sanguínea (fundamentalmente la diferencia entre el amastigote procíclico y las formas sanguíneas estriba en la posición relativa del cinetoplasto, núcleo y en el aumento de motilidad) y con ello se produce un cambio drástico en su actividad metabólica. Los promastigotes procíclicos se convierten en epimastigotes y se liberan para alcanzar las glándulas salivales del mosquito (etapa sanguínea) en donde se dividen repetitivamente hasta llegar a una forma no divisible denominada promastigotes metacíclicos los cuales son muy pequeños, muy móviles y con un cinetoplasto completamente localizado. Cuando las formas metacíclicas se encuentran maduras sintetizan una membrana muy similar a la de las formas sanguíneas y salen de las glándulas salivales convirtiéndose así en la forma infectiva. No se conoce nada acerca del tipo de señalización que ocurre en el insecto para que desencadenen los cambios en el parásito, pero se sabe que el tiempo que transcurre desde la ingesta del parásito por el insecto hasta la formación de la etapa infectiva es de aproximadamente 3-4 semanas aunque puede variar de las condiciones de temperatura, humedad y edad del vector.

Las formas infectivas (metacíclicas) son inyectadas en el hospedero por la picadura del mosquito. Los tripomastigotes metacíclicos, comienzan su reproducción hasta que un elevado número de parásitos desencadena el cambio morfológico a la forma alargada (forma sanguínea) (Figura 4).

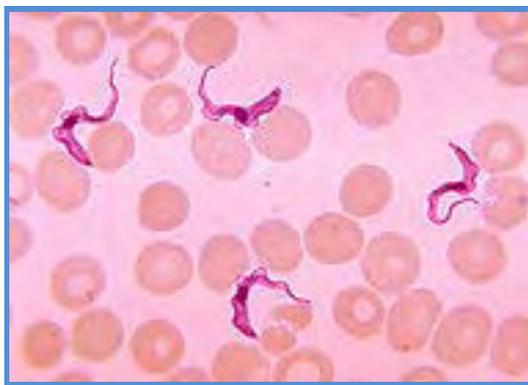


Figura 4.- Forma sanguínea de *T.brucei*. Frotis sanguíneo de un paciente infectado en donde puede observarse la presencia de los parásitos.

1.4. Manifestaciones clínicas

Dependiendo del parásito que afecte al individuo, el progreso de la enfermedad tendrá un avance rápido o lento, pero a grosso modo se conoce que la enfermedad se desarrolla en dos fases: 1) etapa hemolinfática y 2) etapa meningoencefalítica.

Primera fase (etapa hemolinfática): En un principio, la primera fase de la enfermedad transcurre desapercibida. Durante el transcurso de esta etapa se lleva a cabo la multiplicación y dispersión (difusión) de los tripanosomas en la sangre y el sistema linfático (Legros D., *et al.*, 2002). Generalmente se presentan una serie de síntomas poco específicos como: fiebre, malestar general, edema facial, anemia, artralgia y linfadenopatía. Conforme avanza la enfermedad la sintomatología comienza a ser más puntual concentrándose en ciertos órganos y sistemas; entre los síntomas encontramos la aparición de lesiones en la piel (lesión tipo chancro), prurito, problemas cardiacos (falla cardiaca, miocarditis, endocarditis), problemas endocrinos (ginecomastia, pérdida del cabello, irregularidades menstruales y disfunción reproductiva), problemas gastrointestinales y en algunos casos patologías en los ojos.

Cabe resaltar que el corazón es uno de los órganos que tiene un mayor grado o riesgo de ser dañado por el parásito, especialmente en los casos debidos a la infección por *T. brucei*.

Otro de los sistemas que se ve afectado es el sistema inmune, el cual se encuentra constantemente estimulado, debido a la elevada tasa de mutación que los tripanosomátidos presentan, ya que cuando existen anticuerpos específicos contra el parásito, algunos de estos producen una variación en la VSG, burlando así al sistema inmune (Févre E., *et al.*, 2008).

Segunda fase (etapa meningoencefálica o neurológica): Cuando los parásitos cruzan la barrera hematoencefálica ocurre la segunda etapa de la enfermedad, es decir, ocurre cuando los tripanosomas pueden ser detectados en nódulos linfáticos, sangre y en el SNC. La mayoría de las funciones del SNC están afectadas al comenzar esta fase. Algunos signos neurológicos y trastornos mentales pueden comenzar a presentarse antes de que la infección sea detectable en el líquido cefalorraquídeo (líquido cerebroespinal). Entre los síntomas más comunes se presentan irregularidades en los ciclos de sueño (periodos de sueño cortos a lo largo del día y la noche los cuales van aumentando gradualmente mientras progresa la enfermedad), temores, debilidad motora, movimientos anormales, dificultad para caminar y hablar, decremento de la cantidad de glóbulos rojos, pérdida de la sensibilidad y dolor de cabeza. Cuando la enfermedad ha progresado los periodos de sueño aumentan hasta llegar a un estado comatoso y, finalmente, hasta la muerte (Févre E., *et al.*, 2008).

1.5. Tratamiento de la enfermedad

Los medicamentos utilizados para el tratamiento de la enfermedad se dividen en dos grupos: aquellos utilizados para tratar la primera etapa y aquellos usados para el tratamiento de la segunda fase. Los medicamentos utilizados en la

primer etapa son menos tóxicos, son más fáciles de administrar y más efectivos; a diferencia de aquellos utilizados durante la segunda etapa de la enfermedad. De cualquier modo, existen numerosas desventajas en la administración de estos medicamentos como:

- Elevado grado de toxicidad.
- Numerosos efectos adversos o colaterales.
- Elevado costo y difícil administración.
- Generación de resistencia (por parte del parásito) a algunos de ellos.

En el primer grupo tenemos al pentamidina y a la suramina. La pentamidina se utiliza en el tratamiento de la enfermedad causada por *T.b.r.* Los efectos colaterales más comunes tras su administración son: la hipotensión e hipoglucemia. El régimen es administrado intramuscularmente y consiste en la aplicación de 4 mg/kg del medicamento una vez por día. La suramina se utiliza en el tratamiento del cuadro generado por *T.b.g.* El protocolo de administración es el siguiente: se aplican 5 mg/kg en el día 1, 10 mg/kg en el día 3 y 20 mg/kg en los días 5, 11, 23 y 30, mediante una inyección intravenosa. Los efectos adversos que se presentan con mayor frecuencia son: choque anafiláctico y fallo renal (Legros D., *et al.*, 2002).

La segunda etapa de la enfermedad del sueño es tratada con tres medicamentos: melarsoprol, eflornitina y nifurtimox. Melarsoprol es un compuesto órgano-arsenical muy tóxico, utilizado en el tratamiento contra *T.b.g.* el cual puede causar la muerte del paciente o producir daños neurológicos importantes. El régimen administrado consiste en tres o cuatro series de cuatro inyecciones intravenosas por día, separados entre sí por periodos de descanso. La eflornitina (D-L-alfa-difluoromirtilornitina) también es utilizada en el tratamiento de la enfermedad producida por *T.b.g.* y en algunos casos también puede ser administrada para combatir el cuadro producido por

T.b.r. Una de las grandes desventajas de este medicamento es que su administración es muy difícil, ya que se necesitan alrededor de 400 mg/kg por día, repartidos en cuatro tomas, administradas mediante una infusión. Aunque es mucho mejor tolerada que el melarsoprol continua exhibiendo muchos daños colaterales como: diarrea, pancitopenia (reducción en el número de glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas), convulsiones, y alucinaciones (Legros D., *et al.*, 2002).

1.6. Tripanosomiasis Americana (enfermedad de Chagas).

La enfermedad de Chagas es producida por la infección de *Trypanosoma cruzi*. El parásito se transmite por el triatoma (insecto hematófago) (Figura 1). La enfermedad se distribuye desde el sur de Estados Unidos (paralelo 42° N) hasta Argentina (paralelo 42° S) (Figura 5) (Teixeira A., *et al.*, 2006). La enfermedad por lo general se desarrolla en zonas rurales y de pobreza extrema, en donde el insecto vector puede reproducirse y alimentarse de sus reservorios (armadillos, marsupiales, animales salvajes y domésticos como gatos, perros, etc.). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la enfermedad afecta entre 16 - 18 millones de personas y 100 millones más están en riesgo de contraerla (WHO: Chagas disease 2006).



Figura 5.- Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas. La zona en color gris oscuro denota las áreas donde existen mayor cantidad de casos, aunque en todo centro y Sudamérica se presenta la enfermedad. Modificado de Teixeira A., *et al.*, (2006).

Al menos se conocen 40 especies de triatomas que pueden ser portadoras del parásito. Cuando el triatoma se alimenta, este deyecta en el lugar de la mordedura, evacuando en sus heces miles de tripoamastigotes metacíclicos (forma infectiva del parásito). La infección se adquiere cuando el hospedero se rasca el sitio de la mordedura y arrastra las heces infectadas del vector a la herida; otra forma en la que se adquiere la infección es mediante la transfusión sanguínea o vía materno-fetal. Una vez dentro de la célula, el tripoamastigote se transforma en amastigote y comienza a replicarse por fusión binaria. Nuevamente los amastigotes se transforman en tripoamastigotes y son liberados al estallar la célula para propagar la infección a otros tejidos (cada célula del cuerpo humano, con excepción de las neuronas, puede ser infectada por *T. cruzi*) (Figura 6).

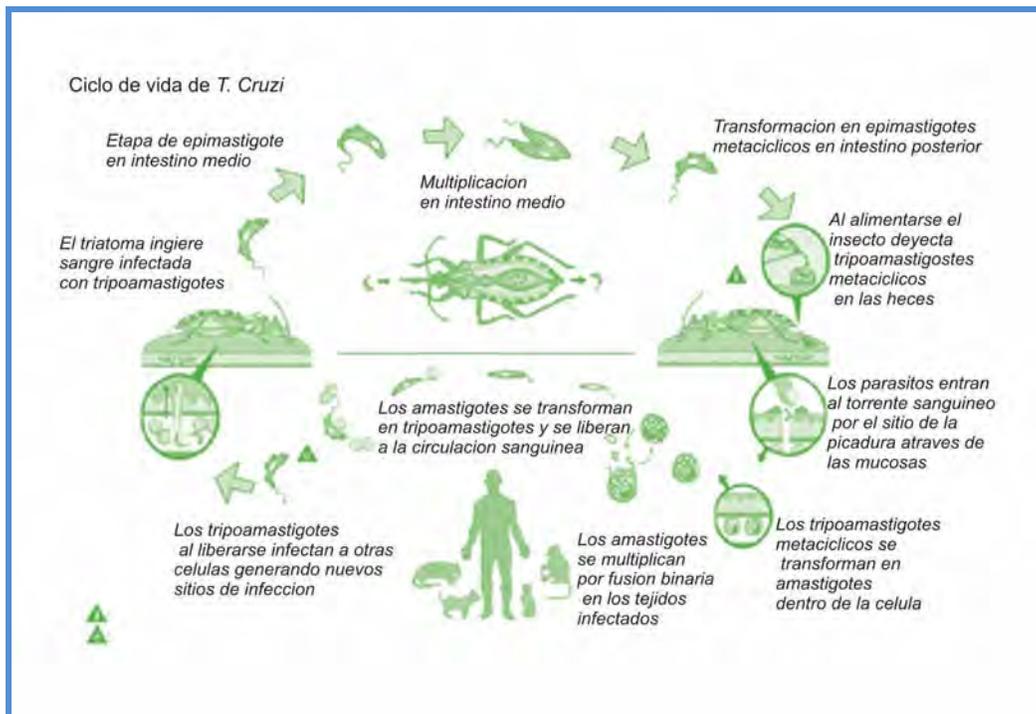


Figura 6.- *Ciclo biológico de T. cruzi*. Modificado de Pérez de Ayala-Balzola A., et al., (2009).

La enfermedad se presenta por lo general en tres estadios: fase aguda, fase indeterminada y fase crónica. La primera fase de la enfermedad se caracteriza por la presencia del parásito en sangre del paciente; sin embargo, no en todos los casos se pueden detectar a los parásitos en un frotis sanguíneo por lo que, en muchos casos, la enfermedad pasa desapercibida (alrededor del 95% de los pacientes) pero, pueden presentarse una serie de síntomas inespecíficos como fiebre, dolor muscular, malestar general, somnolencia, calambres, diarrea, edema, dificultades respiratorias, cianosis y coma. Muy pocos casos son mortales en la fase aguda, pero la mayoría de los casos sufren una remisión instantánea (Teixeira A., *et al.*, 2006). Algunos casos agudos (10 a 20%) se resuelven en un período de dos a tres meses, dando lugar a una fase llamada indeterminada, la cual se caracteriza por la persistencia de la infección, sin presentar problemas clínicos, y reapareciendo algunos años más tarde. En algunos pacientes muestran algunas lesiones en corazón muy discretas (Teixeira A., *et al.*, 2006).

La etapa crónica es sintomática y puede aparecer años o décadas después de la infección inicial. La enfermedad afecta mayoritariamente al sistema digestivo y al corazón. La insuficiencia cardiaca, arritmias, formación de trombos y miocardiopatías son síntomas que se presentan cuando la infección se encuentra muy avanzada. Aproximadamente más de la tercera parte de los pacientes presentan complicaciones llamadas "Megs" (dilataciones y engrosamiento de las paredes de tejidos). A lo largo del tracto gastrointestinal se pueden presentar lesiones como megacolon, megaesófago, megaestómago, megaduodeno, megayeyuno, etc., desórdenes motores gastrointestinales como acalasia y problemas con en el vaciado intestinal. (Matsuda M., *et al.*, 2009). Finalmente los daños cardiacos conllevan a la muerte del paciente.

1.7. Tratamiento:

El tratamiento de la infección por *T. cruzi* consiste en la administración de dos medicamentos: Nifurtimox (4-(5-nitro-furilidenoamina)-tetrahydro-4-4-1,4-tiacin-1-1dióxido) y o-benzimidazol (N-bencil-2-nitroimidazolacetamida). Estos medicamentos presentan efectos citotóxicos y genotóxicos asociados su estructura, pues generan radicales libres como nitro-anión, $H\cdot$, $O_2\cdot^-$ y H_2O_2 . El efecto de estos nitroderivados no es muy prometedor, de hecho, son bastante limitados ya que no erradican al parásito, aunque en la fase aguda ayudan a controlar a la enfermedad para que ésta no evolucione a la fase crónica en casi un 85% de los casos.

1.8. Diseño de nuevos compuestos especie específicos

Si bien, los tratamientos utilizados para el control de estas enfermedades no son satisfactorios, en la actualidad no existe gran esperanza para el desarrollo de nuevos medicamentos eficaces (generalmente las compañías farmacéuticas poseen poco o nulo interés por invertir en el desarrollo de un nuevo fármaco debido a que al sector para el cual el medicamento estaría diseñado, difícilmente podría solventar los gastos para la adquisición de éste). Tampoco el desarrollo de una vacuna parece ser viable, debido a la alta capacidad que tienen estos organismos para evadir al sistema inmune (Verlinde C., *et al.*, 2001). Afortunadamente en la actualidad existen muchos grupos de investigación interesados en la búsqueda de nuevas alternativas para la eliminación del parásito. En un principio el diseño de nuevos inhibidores se apoya en la búsqueda de alguna enzima o ruta metabólica esencial en el parásito y no vital en el hospedero. Una vez logrado esto se realiza una comparación entre ambas enzimas buscando explotar al máximo las diferencias totales, las diferencias en el sitio activo y cambios en la reactividad de los residuos cercanos al sitio activo (Verlinde C., *et al.*, 2001).

La glucólisis en los tripanosomátidos resulta ser un blanco muy atractivo debido a la importancia que esta ruta representa para el parásito. En un principio, se piensa que la interrupción de la ruta glucolítica conlleva a la muerte del parásito (Eisenthal R. y Cornish-Bowden A., 1998 y Verlinde C., *et al.*, 2001). Existen varios blancos tangibles a lo largo de la vía glucolítica algunos de ellos se encuentran ya en estudio y son: la hexocinasa, la glucosa-6-fosfato isomerasa, fosfofructocinasa, triosafosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y fosfoglicerato cinasa.

La triosafosfatoisomerasa (TIM) es considerada un buen modelo de estudio debido a que es una enzima muy estudiada y por ende se conocen muchos datos acerca de ella (datos cinéticos, de reactivación, de degradación, estructura tridimensional, secuencia de aminoácidos, etc.). Sin embargo, la elección de la TIM como un blanco de inhibición fue controversial ya que durante cierto tiempo, se especuló que la inhibición de esta enzima no era suficiente para generar un efecto mortal en los parásitos (específicamente, durante su etapa sanguínea), ya que estos tienen la posibilidad de convertir la dihidroxiacetonafosfato en glicerol, con la concomitante producción de ATP. Sin embargo, se ha demostrado que la TIM es esencial para la supervivencia del parásito, ya que al menos se requiere un 15% del funcionamiento de esta para que el parásito presente un crecimiento óptimo (Helfert S., *et al.*, 2001 y Verlinde C., *et al.*, 2001). Existen dos posibles explicaciones por las cuales la TIM resulta ser necesaria para la supervivencia del organismo; la primera de ellas es que cuando la TIM no se encuentra presente, la producción de ATP se encuentra muy reducida dejando al parásito sin una cantidad suficiente de energía. La segunda proposición indica que la baja cantidad de TIM genera la acumulación de la dihidroxiacetonafosfato en el glucosoma, la cual podría inhibir la actividad de la aldolasa, convirtiéndose así, en metilglioal que resulta ser muy tóxico para los parásitos (Helfert S., *et al.*, 2001).

Gómez-Puyou y colaboradores, han utilizado a la TIM como modelo de estudio para la búsqueda y diseño de nuevos fármacos antiparasitarios que inhiban a esta enzima de manera especie específica. La presencia de aminoácidos no conservados importantes para la catálisis y estabilidad enzimática abren la posibilidad de alcanzar dicho fin. Uno de los residuos no conservados que posee la TIM de ambos parásitos es la cisteína 14 la cual es de suma importancia para conservar la estabilidad y actividad de la enzima. La cisteína 14 se posiciona en la interfase de ambos monómeros, pero no forma parte del sitio activo (Gómez-Puyou A., *et al.*, 1995, Garza-Ramos G., *et al.*, 1998, Hernández-Alcántara G., *et al.*, 2002). Al ser un residuo no conservado, la cisteína 14 se ha convertido en un blanco atractivo y por ello ha sido ampliamente estudiado, específicamente su susceptibilidad ante agentes derivatizantes de grupo sulfhidrilo como el metilmetano tiosulfonato (MMTS) y el ácido ditionitrobenzónico (DTNB).

En la actualidad se han diseñado compuestos derivados del benzotiazol capaces de inhibir a la TIM de *T. cruzi* en concentraciones del orden de μM (Figura 7). Los compuestos más eficaces han sido el ácido 3-(2-benzotiazol-2-yl)propano sulfónico, el ácido 2-(p-aminofenil)-6-metilbenzotiazol-7-sulfónico, el ácido 2-(2,4 (aminofenil)-6-metilbenzotiazol-7-sulfónico y el 6,6'-bisbenzotiazol-2,2'-diamina (V7). La mitad de la inactivación máxima para TcTIM inducida por estos compuestos se alcanzó en concentraciones de 33, 56 y 81 μM respectivamente y para el compuesto V7 fue de 21 y 35 μM (para TcTIM y TbTIM, ya que es capaz de inhibir a ambas enzimas) (Tellez-Valencia A., *et al.*, 2002 y Olivares-Illana V., *et al.*, 2006). Se piensa que los compuestos derivados de benzotiazoles afectan a la cisteína 14, perturbando la interfase del dímero inactivando así a la enzima.

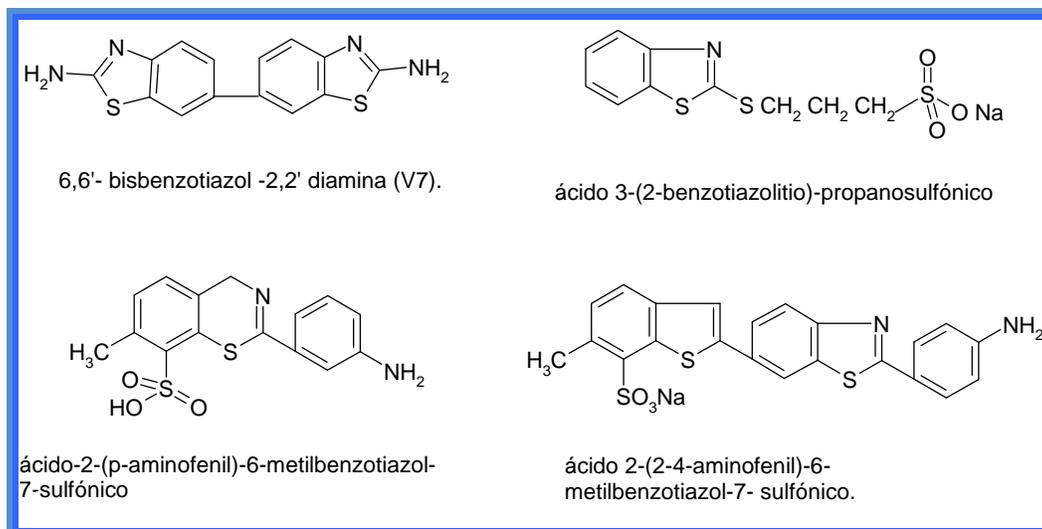


Figura 7. Estructura de algunos compuestos derivados del benzotiazol que inactivan a la TIM. Los compuestos sintetizados inactivan principalmente a la TIM de *T.cruzi*. El compuesto V7 también inactiva a otras TIMs como la de *T.brucei*. Modificado de Téllez-Valencia A., et al., (2002).

1.9. Glucólisis en tripanosomátidos

El metabolismo energético del género *Trypanosomatidae* varía considerablemente entre especie y especie, y también en cada etapa del ciclo biológico en el que se encuentre (Van Hellemond J., et al., 2007). En algunas fases de crecimiento el parásito depende únicamente de la glucólisis para la obtención de ATP como en la etapa sanguínea de *T.brucei* (en donde el consumo de glucosa es 10 veces mayor que en cualquier otra célula de eucarionte, debido a que durante esta etapa aún no posee mitocondrias funcionales) (Cazzulo J., 1992). Sin embargo, conforme el parásito se va diferenciando requiere del uso de otras rutas metabólicas para poder satisfacer la demanda energética (parece haber una correlación entre la abundancia de nutrimentos que existe en el medio y las rutas energéticas que utiliza), aunque la glucólisis nunca deja de estar activa a lo largo de su ciclo de vida (Tielens A. y Van Hellemond J., 1998).

1.10. Glicosoma

El glicosoma es un organelo especializado presente solamente en el género *Kinetoplastida*, muy parecido a los peroxisomas, cuyo contenido se encuentra conformado casi en su totalidad por proteínas (aproximadamente un 90%). El número de glicosomas presentes en el parásito varía con respecto a la etapa del ciclo en la cual se encuentre. Se sabe que *T.brucei* posee alrededor de 230 glicosomas durante la etapa sanguínea mientras que en otros tripanosomátidos sólo se han encontrado alrededor de 50 (Soares M. y De Souza W., 1988). Dentro del glicosoma se encuentran nueve enzimas compartimentalizadas, y sólo siete de ellas son glucolíticas. El resto pertenecen al metabolismo del glicerol (a diferencia de otros organismos en donde estas enzimas se encuentran en el citosol) (Helfert S., *et al.*, 2001 y Verlinde C., *et al.*, 2001). La compartimentalización de las enzimas dentro del glicosoma parece proteger al parásito de la acumulación excesiva de metabolitos y también parece representar un factor importante en la regulación glucolítica debido a la baja permeabilidad de la membrana del glicosoma hacia algunos metabolitos (Cazzulo J., 1992). Las enzimas encontradas dentro de los glicosomas de estos parásitos difieren de aquellas encontradas en el citosol de células de mamíferos, ya que éstas poseen puntos isoeléctricos diferentes (de 1 a 4 unidades de diferencia con respecto a mamíferos y de 3 a 6 unidades con respecto a organismos unicelulares) (Misset O., *et al.*, 1986).

La glucólisis en estos organismos comienza en el glicosoma con las reacciones clásicas de la vía Embden-Meyerhof (la glucosa es degradada a 3-fosfoglicerato dentro del glicosoma el cual después es degradado a piruvato en el citosol) (Figura 8). El balance redox dentro del glicosoma se conserva mediante la lanzadera glicerol-3-fosfato y la oxidasa alternativa en mitocondria (El NADH producido por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa se reoxida en la mitocondria por la glicerol-3-fosfato oxidasa; los electrones se transfieren

al glicosoma mediante la lanzadera glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, glicerol-3-fosfato–dihidroxiacetona fosfato). La síntesis neta de ATP ocurre en el citosol con ayuda de la piruvato cinasa (Verlinde C., *et al.*, 2001). En condiciones de anaerobiosis, el glicerol-3-fosfato se convierte en glicerol con la concomitante producción de ATP mediante la reacción inversa de la glicerol cinasa glicosomal. El balance ATP/NAD también se mantiene en equilibrio durante la anaerobiosis; la diferencia estriba en que sólo una molécula de piruvato y de glicerol son producidos por molécula de glucosa, reduciendo la cantidad de ATP a una molécula (Tielens A y Van Hellemond J., 1998).

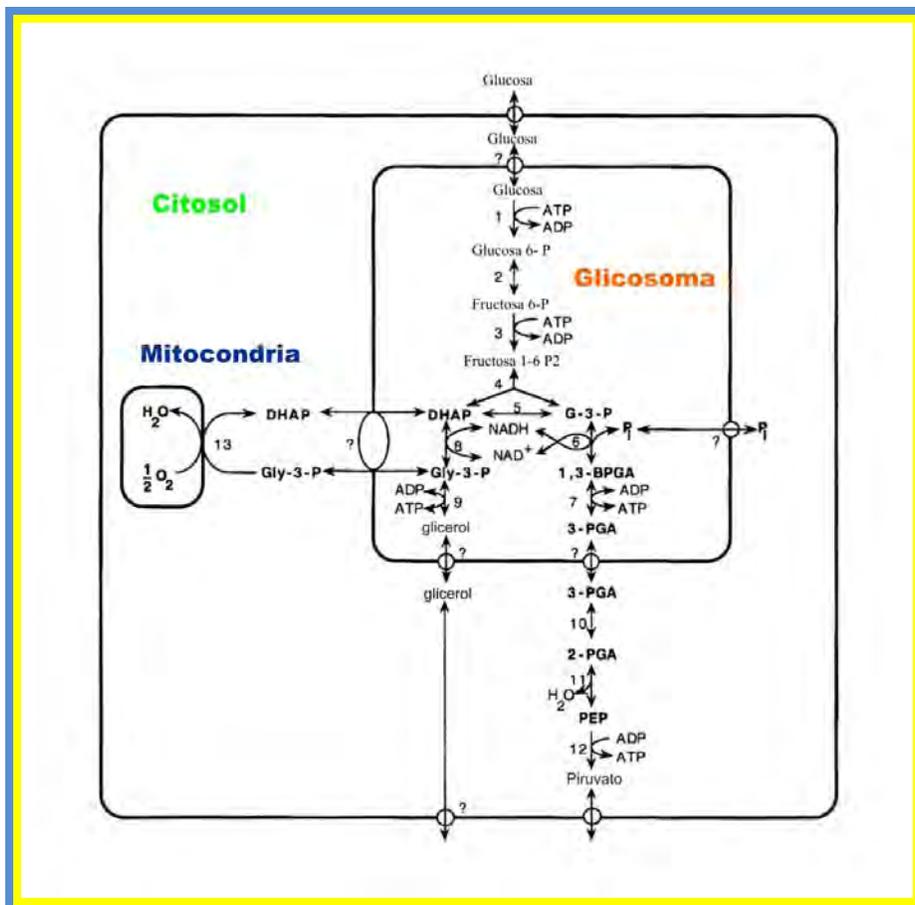


Figura 8. Ruta glucolítica en la forma sanguínea de *Trypanosoma*. Los transportadores de metabolitos o sustratos se encuentran marcados con un círculo y con el signo de interrogación se denotan las posibles moléculas translocadoras de metabolitos a través de la membrana glicosomal. Abreviaturas: 1,3 PGA, 1,3 bifosfoglicerato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; G-3-P, gliceraldehído 3 fosfato; Gly-3p glicerol 3 fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; 2PGA, 2 fosfoglicerato; 3 PGA, 3 fosfoglicerato. Modificado Verlinde C., *et al.*, (2001).

El producto final de la glucólisis (el piruvato) es degradado en la única mitocondria del parásito. Según la etapa del ciclo en la que se encuentre el parásito (y el grado de madurez de su mitocondria) el piruvato es degradado completamente a CO_2 y H_2O u otros intermediarios como hexosa y algunos ácidos orgánicos como el acetato, malato, lactato, etc. (Cazzulo J., 1992). Durante la etapa de adaptación los tripanosomátidos son totalmente dependientes de la glucólisis para la obtención de energía (la forma alargada también lo es). El sustrato utilizado preferencialmente es la glucosa aunque, durante esta etapa, puede utilizar otras fuentes alternativas como fructosa, manosa y glicerol. Durante las etapas intermedias el parásito posee una mitocondria mucho más desarrollada por lo que no depende por completo de la glucólisis para obtener energía (García-Torres I., 2006).

Una particularidad encontrada en los tripanosomátidos es que muchos de los mecanismos regulatorios no funcionan normalmente (Tielens A y Van Hellemond J., 1998). Por lo general la ruta glucolítica se regula mediante intermediarios glucolíticos, o por efectores alostéricos, sin embargo, las enzimas glucolíticas en los tripanosomátidos no parecen ser sensibles a tal efecto. Otra característica interesante observada en este género es que aparentemente carecen del efecto Pasteur (decaimiento considerable del grado de la utilización de glucosa cuando las condiciones de aerobiosis se cambian por anaerobiosis). El efecto Pasteur se considera como un punto de regulación importante en la glucólisis, de hecho, parecen presentar el fenómeno inverso, pues la utilización de la glucosa, es mucho menor en condiciones de aerobiosis (ya que aporta una mayor cantidad de ATP por molécula de glucosa a diferencia de cuando se encuentra en anaerobiosis) (Cazzulo J., 1992). Se ha sugerido que en los tripanosomátidos el transporte de glucosa dentro de la célula es el paso limitante en la glucólisis, específicamente durante la etapa sanguínea (Bakker M., *et al.*, 1999).

1.11. Características estructurales de la Triosafosfato isomerasa.

La triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima glucolítica de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos (27000 Da) por monómero que cataliza la interconversión de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a gliceraldehído-3-fosfato (GAP; Figura 12). Las TIMs por lo general están compuestas por dos subunidades idénticas que forman dímeros con excepción de las de organismos termofílicos, las cuales se encuentran formando tetrameros (Hernández-Alcántara G., *et al.*, 2002).

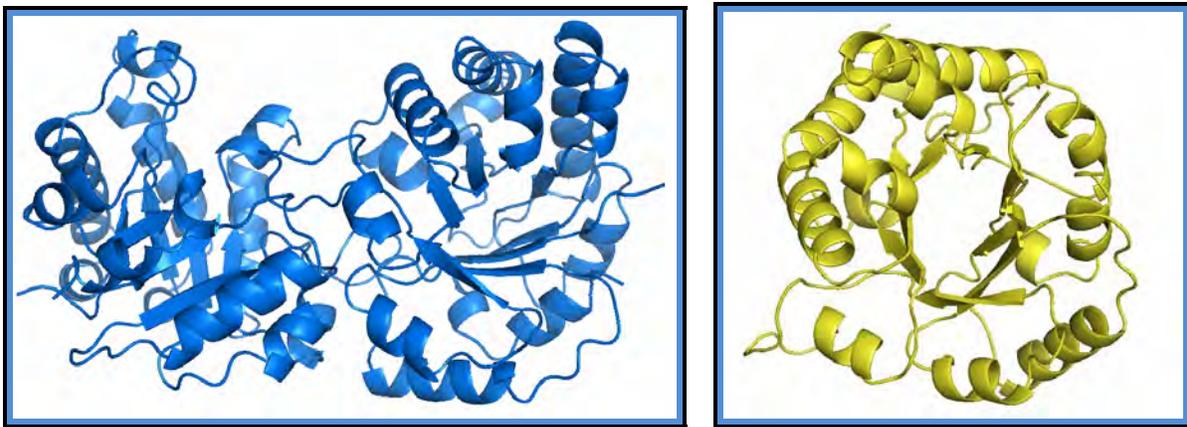


Figura 9. Estructura cristalográfica de TbTIM. En la figura en azul se muestra a la enzima en estado nativo y el amarillo uno de los monómeros rotados de tal modo que puede apreciarse el patrón barril α/β característico en la TIM. Modificado de *pdb5tim* Wierenga R., *et al.* (1991).

La TIM pertenece a la familia de proteínas denominada (barril α/β)₈, cada monómero se encuentra compuesto por 8 hojas β (dispuestas en el interior de la proteína) rodeadas por 8 α hélices unidas entre sí por sus respectivas asas (Figura 9). Cada monómero posee un sitio activo y todos los residuos de aminoácidos relacionados con la catálisis; sin embargo, la proteína solamente es catalíticamente activa cuando esta se encuentra como dímero (Hernández-Alcántara G., *et al.*, 2002). Los aminoácidos que componen al barril son predominantemente hidrofóbicos, solo algunos aminoácidos polares aparecen al final del barril (expuestos al solvente); en este lugar también se localiza el

sitio activo de la enzima (Farber G y Petsko G., 1990, Lolis E., *et al.*, 1990, Knowles J., 1991 y Hernández-Alcantara G., *et al.*, 2002). Para realizar la catálisis la TIM no requiere de algún cofactor ni de ningún ion metálico (Albert T., *et al.*, 1981 y Wierenga R., *et al.* 1991.). Tampoco tiene un mecanismo regulador de su actividad a lo largo de la ruta glucolítica (no existe evidencia de algún activador o inhibidor) (Albert T., *et al.*, 1981). Evolutivamente la TIM se considera como el catalizador perfecto, ya que la velocidad con la que opera solamente depende de la difusión del sustrato (Lolis E., *et al.*, 1990). La catálisis enzimática es mucho más eficiente sobre todo cuando se compara con la isomerización no enzimática (utilizando DHAP y GAP) en donde la extracción del protón en el C₁ genera un intermediario enediol, el cual fácilmente se desprotona para formar metilglioxal y fosfato inorgánico. Posteriormente, el metilglioxal vuelve a protonarse para terminar la isomerización. Cuando la reacción es catalizada por la TIM también se forma un intermediario enediol; la diferencia entre ambas reacciones estriba en la velocidad de reacción. En el caso de la catálisis enzimática la reacción es tan veloz ($K_{cat} 9 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$) que la formación de metilglioxal es despreciable (Knowles J., *et al.*, 1991, Lolis E., *et al.*, 1990, Wierenga R., *et al.*, 1991, Rozovsky S y McDermott A., 2001).

El paso termodinámicamente desfavorable durante la catálisis en dirección DHAP a GAP es el desprendimiento del producto final (GAP) ya que la enzima necesita realizar un cambio conformacional para que el producto sea liberado. Este cambio conformacional debe ser muy fino para que el medio ambiente del intermediario ni la unión con el sustrato se vean afectados por dicho movimiento (Rozovsky S y McDermott A., 2001).

La TIM posee un asa flexible la cual se abre y cierra conforme la catálisis se lleva a cabo (Figura 10). El asa se encuentra compuesta por los aminoácidos 166-176 (asa 6). Cuando la enzima no se encuentra en presencia del sustrato el asa permanece en una posición abierta, a diferencia de cuando el sustrato

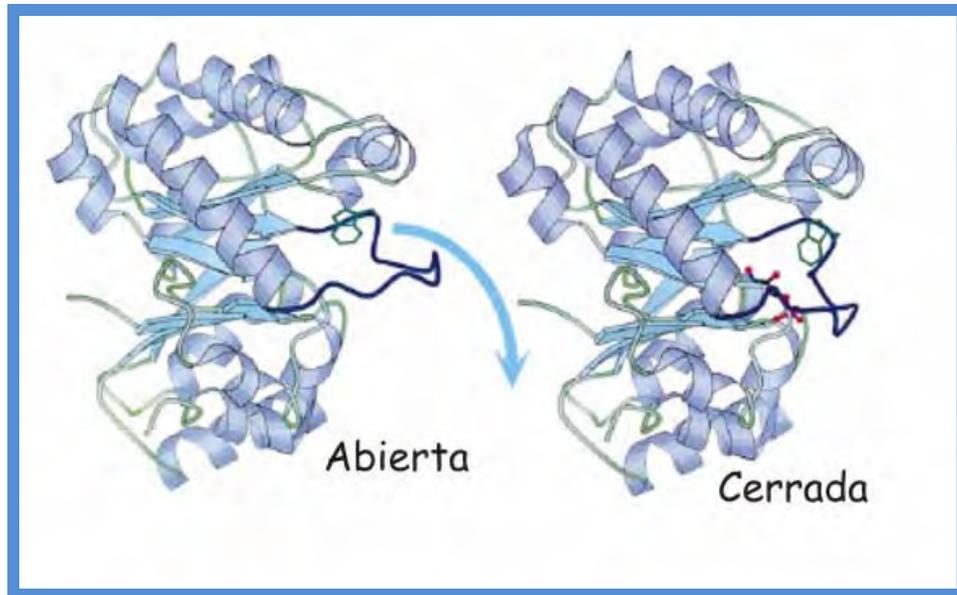


Figura 10. *Movimiento del asa 6 durante la catálisis mediada por la TIM. La posición se encuentra abierta en ausencia de sustrato y se cierra en presencia de sustrato; para la realización de esta imagen se utilizó un análogo de sustrato que se muestra en rojo (fosfoglicolohidroxamato). Modificado de Rozovsky S y Mc Dermott A., (2001).*

está presente en que el asa se mueve alrededor de 7 Å para obtener una conformación cerrada. Particularmente los residuos 168-173 se encargan de la formación de una porción rígida que parece fungir como tapa, en donde los residuos 170-173 se apoyan para la formación de un enlace tipo puente de hidrógeno con el grupo fosfato del sustrato. Los cambios estéricos realizados por la enzima parecen ser resultado de la estabilización del intermediario enediol (en ausencia de una tapa apropiada, el intermediario enediol-fosfato se despegaría fácilmente de la enzima y al entrar en contacto con el medio este se descompondría rápidamente en metilglicoxal y P_i). El asa flexible en la TIM parece tener dos funciones: asegurar un buen rendimiento en la reacción y estabilizar el intermediario durante la reacción. En el interior del asa cerrada se forma un ambiente especial de tal modo que muchos residuos ionizables se acomodan alrededor del sustrato para facilitar la reacción de transferencia del protón entre el carbono 1 y 2 (la baja constante dieléctrica proporciona un ambiente propicio para que la enzima aumente la estabilidad de los intermediarios). El

residuo catalítico clave es el glutamato 167 el cual se mueve en coordinación con el asa. En ausencia de sustrato, el glutamato 167 se une a la serina 96 mediante interacciones tipo puente de hidrógeno; cuando el sustrato entra, la unión se rompe, y ocurre un cambio en la posición del glutamato 167 (de aproximadamente 2Å) de tal modo que este entra en contacto con el sustrato (Knowles J., *et al.*, 1991, Rozovsky S y McDermott A., 2001).

Durante la catálisis no solamente el asa 6 se mueve sino que las asas 5, 7 y 8 también presentan un ligero cambio. El movimiento de las asas 5 y 7, se correlaciona con el movimiento del asa 6, y el movimiento del asa 8 permite una mejor interacción con el fosfato (Wierenga R., *et al.*, 1991).

Algunos residuos juegan un papel crítico en el correcto ensamblaje y funcionamiento del dímero. La mayoría de estos residuos se encuentran distribuidos en las 8 asas. En el asa 1 (residuos 12-17) se encuentran la lisina 13 (fundamental en el reconocimiento del sustrato) y la cisteína 14 (estabiliza al dímero), en el asa 2 y 3 se encuentran la valina 46 y treonina 75 (residuos de interfase), el asa 4 posee a la histidina 95 (forma parte del sitio catalítico) y en el asa 6 podemos encontrar al glutamato 167, responsable de la unión del sustrato (Wierenga R., *et al.*, 1991).

Algunos residuos juegan un papel crítico en el correcto ensamblaje y funcionamiento del dímero. La mayoría de estos residuos se encuentran distribuidos en las 8 asas. En el asa 1 (residuos 12-17) se encuentran la lisina 13 (fundamental en el reconocimiento del sustrato) y la cisteína 14 (estabiliza al dímero), en el asa 2 y 3 se encuentran la valina 46 y treonina 75 (residuos de interfase), el asa 4 posee a la histidina 95 (forma parte del sitio catalítico) y en el asa 6 podemos encontrar al glutamato 167, responsable de la unión del sustrato (Wierenga R., *et al.*, 1991).

La cisteína 14 se encuentra localizada al inicio del asa 1, la cual une a la α hélice 1 y la hoja β 1, formando parte de la interfase de la proteína. La cisteína 14 se encuentra rodeada por la serina 71, glicina 72, glutamato 77, valina 78 y la serina 79 del asa 3 del otro monómero. El contacto mayor entre ambas subunidades de la TIM se da en los residuos 71-77 (asa 3 ó interdigitante), la cual se extiende desde una de las subunidades hasta la otra, cerca de sitio activo en la otra subunidad.

Con excepción de los residuos del asa 3 sólo existe una pequeña secuencia muy conservada entre los residuos de la interfase. Un alineamiento de TIMs de diferentes organismos reveló que sólo 30 de los 250 aminoácidos que componen al monómero se encuentran estrictamente conservados, sin embargo, estos cambios evolutivos no parecen afectar sus propiedades catalíticas (Maldonado E., *et al.*, 1998).

1.12. Sitio activo

El sitio activo se encuentra compuesto por la lisina 14, histidina 96 y el glutamato 168 en TcTIM y en TbTIM por la lisina 13, la histidina 95 y el glutamato 167 (TcTIM posee una alanina en la posición 2, la cual se encuentra ausente en TbTIM, por lo que la secuencia de esta última, se encuentra desplazada por un residuo) (Figura 11) (Maldonado E., *et al.*, 1998).

La reacción catalítica de la TIM comienza con la transferencia de un protón del C_1 de la DHAP al C_2 de la D-GAP. La extracción de este protón conlleva a la formación de un intermediario *cis*-enediol (Albert T., *et al.*, 1981). La extracción del protón del C_1 la lleva a cabo el grupo carboxilo del glutamato 167, el cual se encuentra perfectamente bien posicionado para realizar, la escisión del H^+ , pues la distancia entre el C_1 y C_2 es muy pequeña (aproximadamente 3 Å); al ser bidentado el grupo carboxilato puede extraer el protón de cualquiera de los carbonos (1 y 2) sin realizar gran movimiento. La extracción del protón es

ortogonal con respecto al plano del enolato, lo cual aumenta la rapidez de enolización (Figuras 12 y 13). Se ha observado que cuando el glutamato 167 es sustituido por alanina o glicina la actividad catalítica sufre un decremento de hasta 100 veces.

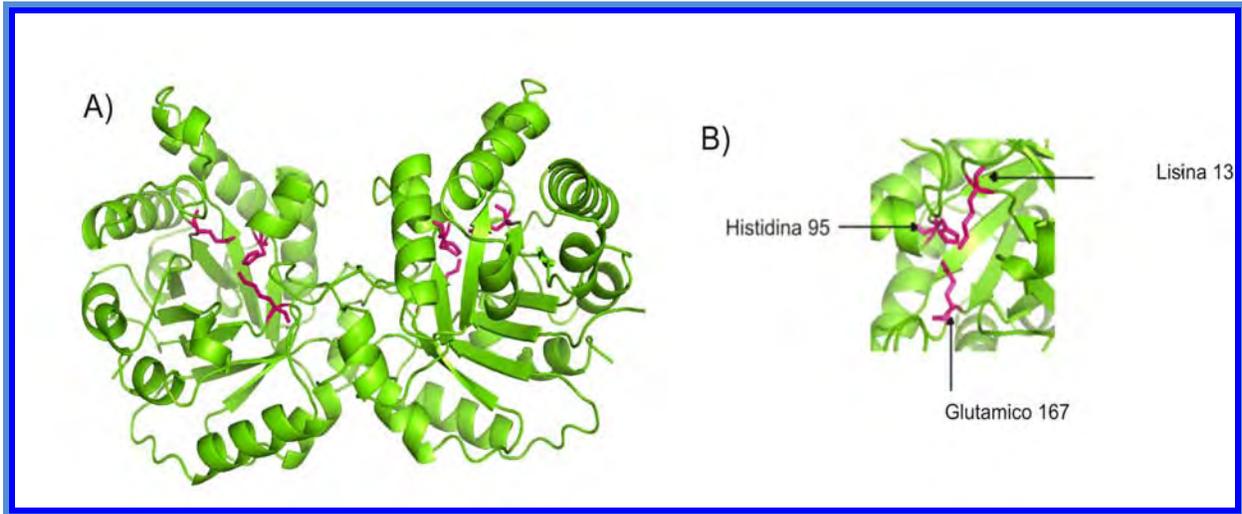


Figura 11. Sitio activo de TbTIM. A) La TIM posee dos sitios catalíticos (resaltados en color rosa) sin embargo, solamente es activa cuando se encuentra como dímero. B) Acercamiento de los tres residuos catalíticos los cuales se encuentran al final de cada barril β (Modificado del pdb5tim Wierenga R., et al., (1991).

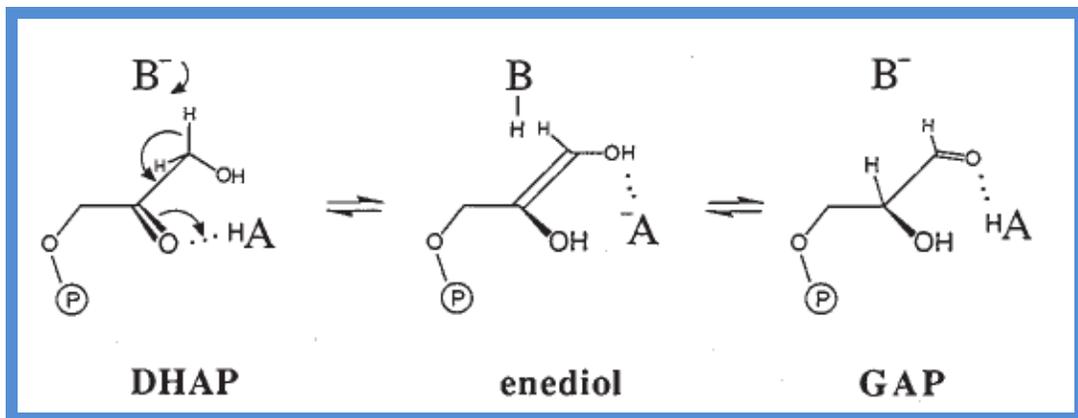


Figura 12. Reacción general catalizada por la Triosafosfato isomerasa. Un grupo básico (B) extrae el protón del carbono 1 de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) asistido por un grupo ácido (HA) para producir el intermediario enediol. Luego el intermediario colapsa y da lugar al producto gliceraldehido-3-fosfato (GAP) y se regenera la enzima. Modificado de Knowles J., (1991).

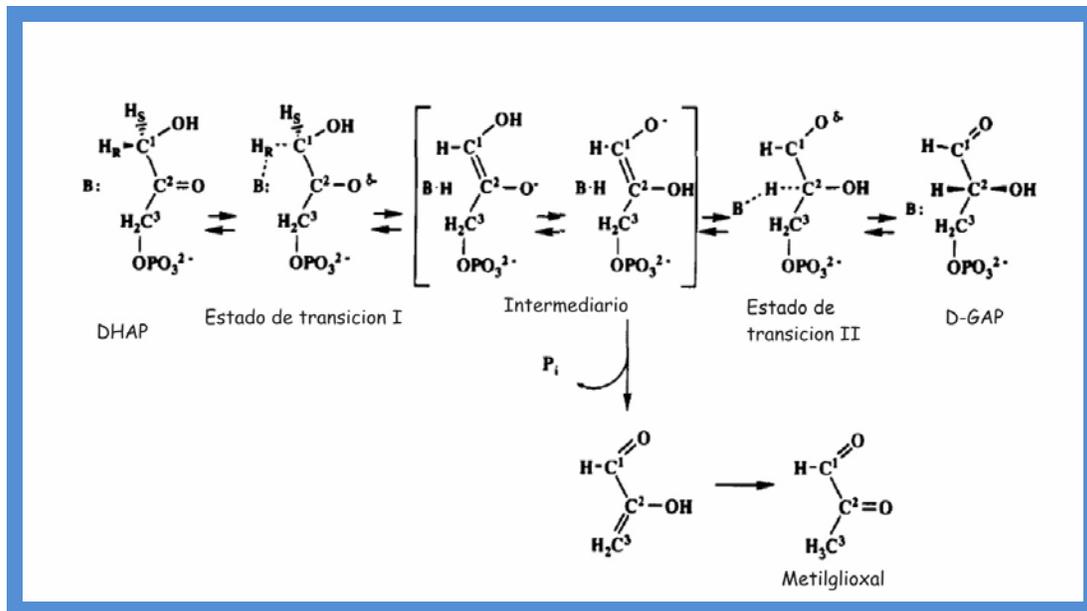


Figura 13. Reacción detallada de la catálisis de la TIM. Durante la catálisis el sustrato pasa por varios estados intermediarios antes de la formación de D-GAP. La formación de productos indeseables es inevitable, pero el grado de formación es bastante bajo durante la catálisis. Aproximadamente sólo en uno de cada 100000 ciclos catalíticos el intermediario cis-enediol se desprende del sitio activo y al entrar en contacto con el agua se descompone rápidamente en metilglioxal y fosfato inorgánico. Modificado de Davenport R., et al., (1991).

La histidina 95 (asa 4) funge como electrófilo y también se encuentra perfectamente posicionada (2.9 Å de los carbonos 1 y 2) y el anillo bidentado del imidazol, polariza al grupo carbonilo del sustrato, permitiendo su enolización (Knowles J., 1991, Lolis E., et al., 1990). La lisina 13 (asa 1) ayuda a estabilizar la carga negativa del carbonilo en el estado de transición, mejorando la acidez del hidrógeno, y también se encuentra muy relacionada con la especificidad de la enzima por su sustrato (Lolis E., et al 1990; Davenport R., et al. 1991) (Figura 14).

1.13. Interfase del dímero

Trypanosoma brucei (TbTIM) la interfase tiene un área de aproximadamente 1522 y 1533 Å², y para la TIM de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) de 1476 y 1491 Å². La

interfase se encuentra estabilizada por alrededor de 20 enlaces tipo puente de hidrógeno entre las moléculas de ambos dímeros y moléculas de agua. Hay 18

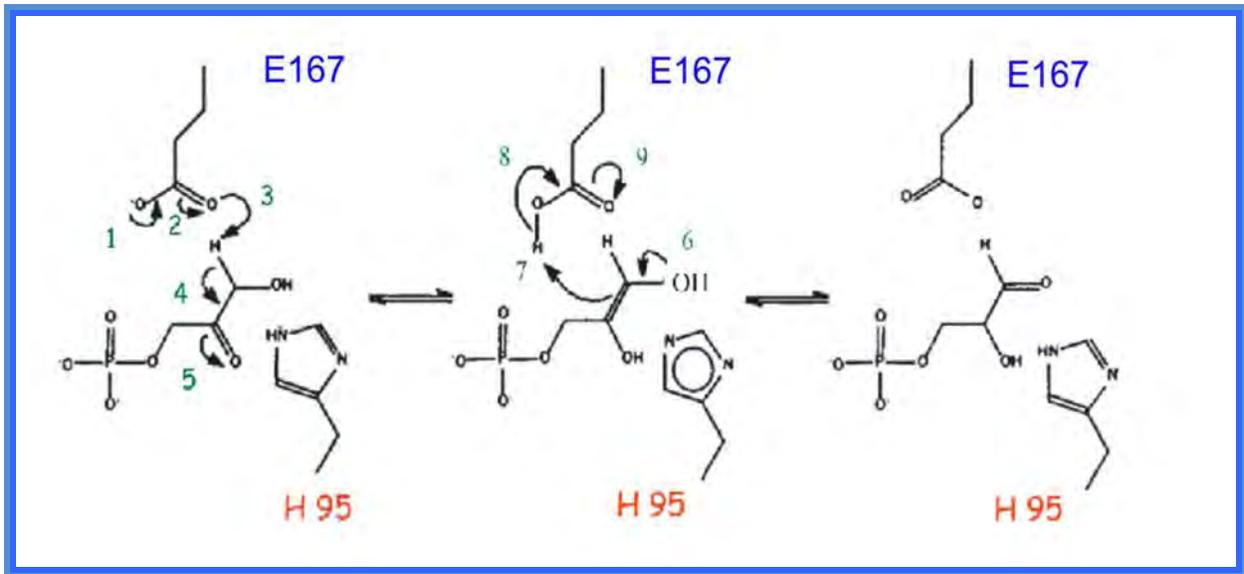


Figura 14. Mecanismo de reacción de los residuos catalíticos E167 y H95. La reacción sucede en el sentido DHAP a GAP. El imidazol, funciona como ácido para protonar al carbonilo para formar el intermediario enediol. Modificado de Ávila- Rios S., (2001).

moléculas de agua que juegan un papel importante en la estabilidad del dímero, la ausencia de estas explica la inestabilidad térmica de algunas TIMs como la mutante Glu104 (Wierenga R., *et al.*, 1991). En gran medida estas interacciones aumentan la especificidad entre ambos monómeros y controlan el contacto entre los residuos de las asas 1 y 2 (se piensa que estas moléculas de agua son remanentes de algún estado de plegamiento de la enzima en donde ambos monómeros se combinan para formar el dímero activo) (Lolis E., *et al.*, 1991). Cuando la enzima no tiene sustrato, existen moléculas de agua que ocupan el sitio activo, las cuales ayudan a estabilizar al sitio activo, ya que permiten la formación de puentes de hidrógeno entre la histidina 95 y la asparagina 10; cuando el sustrato se une al sitio activo esta molécula es desplazada (Lolis E., *et al.*, 1990).

Tabla 1.- Aminoácidos de la interfase del dímero de TbTIM y TcTIM. Los residuos no conservados entre TcTIM y TbTIM se encuentran resaltados con un asterisco. Tomado de García-Torres I., (2006).

TcTIM			TbTIM		
Asn12	Gly 73	Ile173	Asn11	Gly 72	Ile172
Lys14	Ala 74	Gly174	Lys13	Ala 73	Gly174
Cys15	Phe75		Cys14	Phe74	
Asn16	Thr76		Asn15	Thr75	
Gly17	Gly77		Gly16	Gly76	
Ser18	Glu78		Ser17	Glu77	
Glu19 *	Val79		Gln18 *	Val78	
Ser20 *	Ser80		Gln19 *	Ser79	
Thr45	Ile83		Thr44	Ile82	
Phe46	Leu84		Phe45	Leu83	
Leu47 *	Asp86		Val46 *	Asp85	
His48	Tyr87 *		His47	Phe86 *	
Ile49 *	Ile89 *		Leu48 *	Val88 *	
Pro50 *	Val93		Ala49 *	Val92	
Met51	His96		Met50	His95	
Gln66	Glu98		Gln65	Glu97	
Asn67	Arg99		Asn66	Arg98	
Ile69	Tyr102		Ile68	Tyr101	
Ser72	Tyr103		Ser71	Tyr102	

Existen 3 residuos completamente expuestos en el monómero y ocultos en la interfase: cisteína 14, valina 46 y treonina 75. La treonina 75 se encuentra al final del asa 3, posicionada cerca del sitio activo; su grupo hidroxilo parece ser importante para lograr un óptimo acercamiento de las cadenas laterales de los residuos catalíticos del sitio activo (Wierenga R., *et al.*, 1991).

1.14. Diferencias y similitudes entre TbTIM y TcTIM.

A pesar de que ambas enzimas provienen de dos parásitos altamente relacionados, cuando se realiza un alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de ambas TIMs éstas tienen un 73% de identidad en su secuencia global, un 82% en su secuencia de interfase y un total de 65 diferencias. Ambas

enzimas poseen propiedades catalíticas muy similares y sus estructuras tridimensionales tampoco varían. Si se sobreponen ambas estructuras cristalográficas, la posición en el espacio de todos sus residuos varía con un promedio de sus raíces cuadradas (RMS: root-mean-square por sus siglas en inglés) de 0.96 Å. (Maldonado E., *et al.*, 1998, Zomosa-Signoret V., *et al.*, 2003, García-Torres I., 2006).

Una característica muy particular de las TIMs es que, a pesar de que todas poseen una estructura básica muy similar, presentan diferencias significativas en su comportamiento frente a agentes que afectan la catálisis enzimática. Por ejemplo, se ha observado que la reactivación de algunas TIMs a partir de monómeros desplegados con agentes caotrópicos como el clorhidrato de guanidina es muy diferente. Cuando se compara el comportamiento de TcTIM con el de TbTIM se sabe que la reactivación de TcTIM es mucho más rápida y eficiente: alcanza un 90% de reactivación en los primeros 15 minutos, mientras que en TbTIM solamente alcanza un 60% de reactivación hasta los 60 minutos (Zomosa-Signoret V., *et al.*, 2003). Cuando se examina la susceptibilidad proteolítica de la enzima por subtilisina se observa que TbTIM presenta mayor resistencia que TcTIM. Después de la exposición a subtilisina, TbTIM conserva el 50% de su actividad inicial, y en el estudio se determinó la presencia de dos poblaciones de enzima, una de ellas pertenece al dímero intacto (con las propiedades catalíticas normales de la proteína nativa) y la otra pertenece al dímero digerido. Cuando TcTIM se expone a la subtilisina, esta se hidroliza en un 100% (Reyes-Vivas H., *et al.*, 2002).

Cuando se realizan ensayos de termoestabilidad monitoreados por dicroísmo circular a 222nm la TcTIM es más estable a la desnaturalización por efecto de la temperatura que TbTIM (la temperatura aparente de desnaturalización de la TcTIM es de 57.6 °C mientras que para TbTIM es de 53.02 °C)(García-Torres I., 2006).

Un comportamiento similar se obtiene cuando ambas enzimas son tratadas con compuestos derivatizantes del grupo sulfhidrilo como el metilmetano tiosulfonato (MMTS) o el ácido ditionitrobenzónico (DTNB) (García-Torres., 2006).

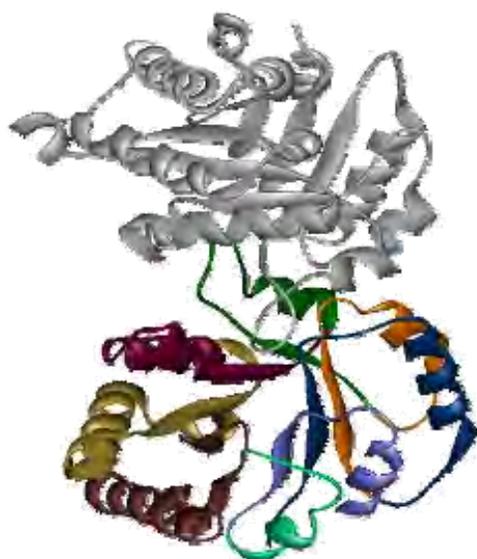
Cuando ambas enzimas son tratadas con MMTS o DTNB, la susceptibilidad de TcTIM es aproximadamente 100 veces mayor que la TbTIM (García-Torres I., 2006). Se piensa que la diferencia entre la sensibilidad ante reactivos de grupo sulfhidrilo podría explicarse por un cambio en la accesibilidad de los reactivos a la cisteína 14 o a la perturbación en la estructura de la enzima después de la derivatización de la cisteína 14 (Garza-Ramos G., *et al.*, 1998).

Las diferencias de comportamiento que presentan TbTIM y TcTIM son debidas a distintos factores aun desconocidos. Uno de esos factores podría ser un cambio estructural en ambas enzimas.

2. Antecedentes

El trabajo y los resultados resumidos en esta sección forman parte de la tesis doctoral de la M. en C. Itzhel García Torres.

El principal objetivo de nuestro grupo de trabajo es explorar y tratar de encontrar aquellos aminoácidos funcionalmente relevantes que puedan proporcionarnos una explicación precisa de las diferencias expuestas anteriormente, específicamente aquellos relacionados con el comportamiento de inactivación con el MMTS. Para comenzar la búsqueda de estos aminoácidos se han realizado mutantes de las TIMs de ambos parásitos. Para su estudio en el laboratorio la TIM se dividió en 8 regiones, cada región se encuentra compuesta por una hoja β plegada, una α hélice y el asa respectiva que las une (Figura 15).



Región	Residuos de aminoácidos
1	1-35
2	36-60
3	61-91
4	92-119
5	120-161
6	162-206
7	207-227
8	228-250

Figura 15. División esquemática de la Triosafosfato Isomerasa. Se muestran las regiones en las que la TIM fue dividida para su estudio. Cada color representa una de las regiones y en la tabla anexa se muestran los aminoácidos que componen a cada región.

Tabla 2.- Diferencias entre las secuencias de las Triosasfosfato isomerasas de *T.brucei* y *T.cruzi*

Región	aa	# de diferencias	Sustituciones conservativas	Sustituciones semiconservativas	Sustituciones sin homología
1	1-35	13	8	1	4
2	36-60	7	4	2	1
3	61-91	8	5	1	2
4	92-119	5	2	-	3
5	120-161	15	8	3	4
6	162-206	10	5	2	3
7	207-227	3	-	2	1
8	228-250	4	4	-	-
Total		65	36	11	18

Como se mencionó anteriormente, existen 65 diferencias en total entre ambas secuencias de aminoácidos. Básicamente el mayor número de diferencias entre ambas secuencias se encuentran en las regiones 1, 5 y 6 (Tabla 2), por lo que se decidió realizar la construcción de 6 quimeras (mutantes de la TIM combinando diferentes regiones de ambas enzimas). La primera de las quimeras se construyó utilizando las primeras 6 regiones de TcTIM y las regiones 7 y 8 de TbTIM, el resto de las mutantes se construyeron en base a esta, de tal modo, que paulatinamente, se le fueron quitando regiones de TcTIM y sustituyendo con las regiones de TbTIM (Tabla 3).

Tabla 3.- Mutantes construidas de la Triosafosfato isomerasa de TbTIM y TcTIM.

Quimera	Regiones de TcTIM	Regiones de TbTIM
TcTIM1-6 ; TbTIM7-8.	1-6	7-8
TcTIM1-5;TbTIM 6-8	1-5	6-8
TcTIM1-4;TbTIM 5-8	1-4	5-8
TcTIM1-3;TbTIM4-8	1-3	4-8
TcTIM1-2;TbTIM3-8	1-2	3-8
TcTIM1;TbTIM2-8	1	2-8

Todas las mutantes fueron caracterizadas cinéticamente y, en general, no se observó gran variación en su actividad catalítica, sólo la quimera TcTIM1-6;TbTIM 7-8 parece ser un poco menos eficiente (Tabla 4). Se han obtenido cristales de algunas de las mutantes y en la resolución de su estructura no se han encontrado diferencias significativas entre estas y las enzimas silvestres (Torres-Larios A., datos no publicados).

Tabla 4.- Parámetros cinéticos de las 6 mutantes de la TIM

Enzima	K_m (G3P mM)	$k_{cat} \times 10^5$ (min ⁻¹)	$K_{cat}/K_m \times 10^7$ (M ⁻¹ s ⁻¹).
TbTIM	0.45	3.1	1.15
TcTIM	0.43	2.7	1.05
TcTIM1-6;TbTIM7-8	0.13	0.956	1.23
TcTIM1-5;TbTIM6-8	0.38	1.55	0.68
TcTIM1-4;TbTIM 5-8	0.63	3.32	0.87
TcTIM1-3;TbTIM4-8	0.58	3.31	0.95
TcTIM1-2;TbTIM3-8	0.57	3.28	0.92
TcTIM1;TbTIM2-8	0.48	3.17	1.10

Una vez que se conocieron los parámetros cinéticos de las 6 quimeras, se realizaron los ensayos con reactivos de grupo sulfhidrilo, específicamente con el MMTS. En la Figura 16 se muestra el comportamiento de las enzimas silvestres cuando se realiza el ensayo con MMTS y enseguida en la Figura 17 se observa el comportamiento de las primeras 4 quimeras en este mismo ensayo.

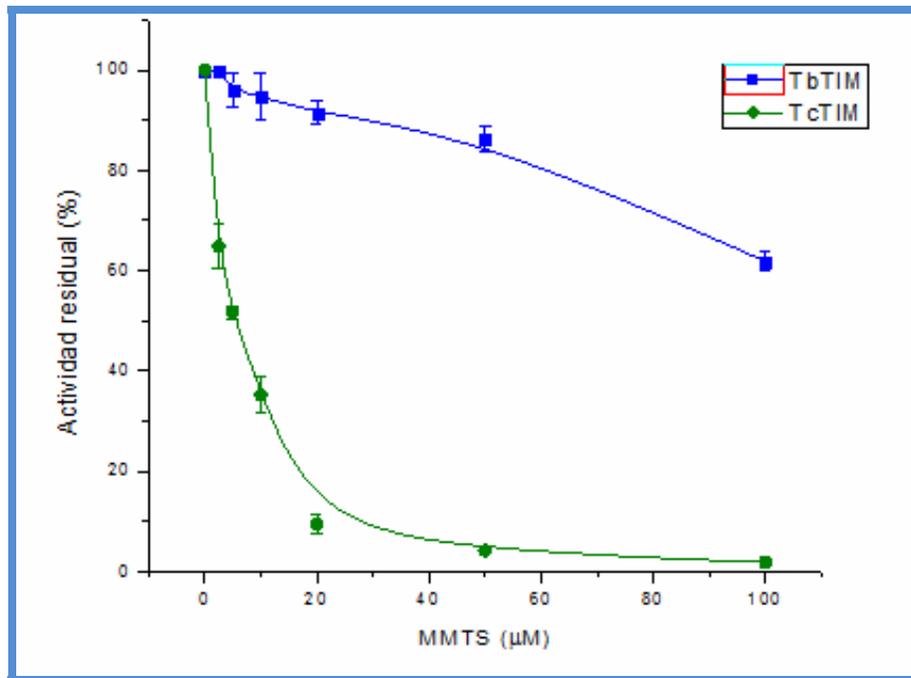


Figura 16. Efecto diferencial del MMTS sobre TcTIM y TbTIM. TcTIM presenta una mayor sensibilidad a la acción de MMTS, dicho efecto puede apreciarse desde un inicio en donde las concentraciones de MMTS son muy bajas y se observa una pérdida súbita de la actividad. En cambio con TbTIM se observa que, desde un principio, esta resulta ser mucho más resistente tanto a bajas y altas concentraciones de MMTS.

Al observar la figura 17 se observa que la quimera que posee la región 4 de TbTIM presenta un cambio importante en la susceptibilidad ante el MMTS por lo que se realizó otra mutante para poder asegurar que la resistencia obtenida por la quimera TcTIM 1-3;TbTIM4-8 sólo se debe a las diferencias presentes en la región 4. Esta mutante se realizó sobre TbTIM y se le introdujo la región 4 de TcTIM (TcTIM 4; TbTIM1-3,5-8) (Figura 18).

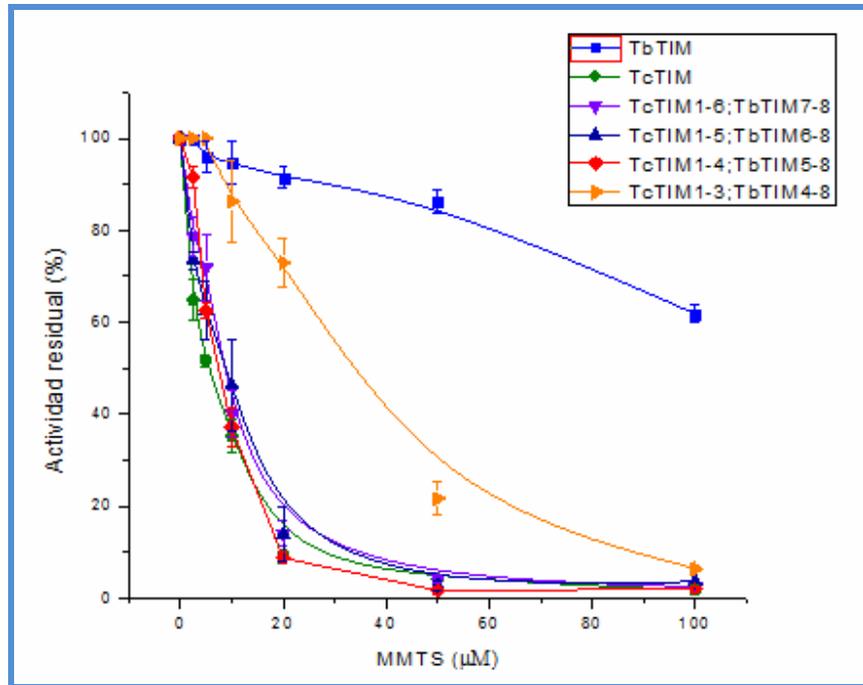


Figura 17. Efecto del MMTS sobre las quimeras de TIM.- Al probar las primeras 3 quimeras todas mostraron un comportamiento similar ya que todas son muy sensibles a la acción del MMTS, igual que TcTIM. Sin embargo, en la quimera que contiene la región 4 de TbTIM se observa un cambio importante en la susceptibilidad de la enzima frente al MMTS ya que esta se vuelve más resistente que TcTIM pero menos resistente que la TbTIM (curva naranja).

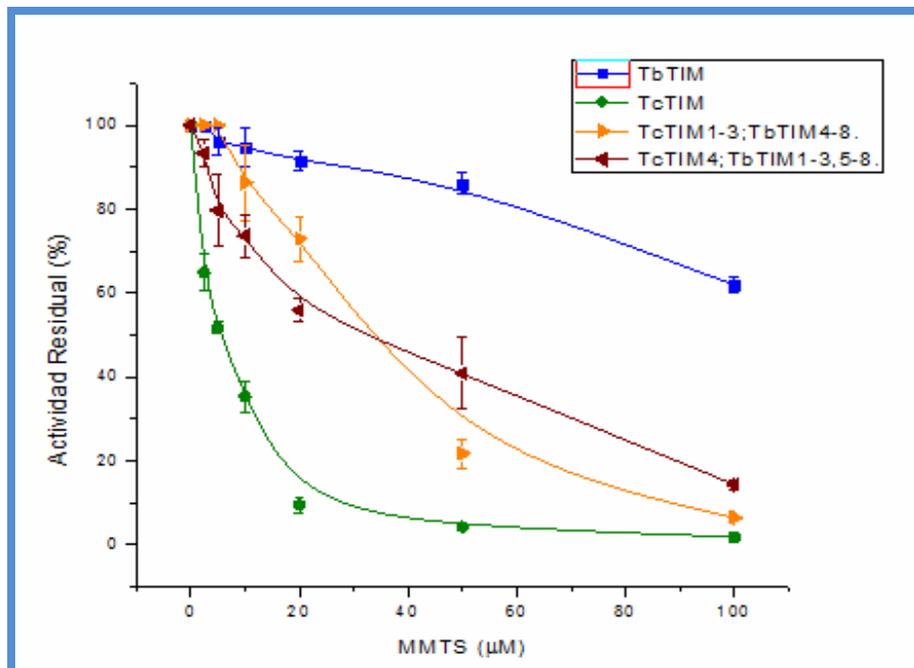


Figura 18. Efecto del MMTS en las quimeras TcTIM 1-3;TbTIM 4-8 y TcTIM 4; TbTIM 1-3,5-8. La región cuatro parece volver más sensible a bajas concentraciones de MMTS, mientras que a altas, esta es más resistente que las TcTIM1-3;TbTIM4-8.

Al igual que en la quimera TcTIM1-3;TbTIM4-8, la quimera TcTIM4; TbTIM1-3,5-8 es más resistente al MMTS comparada con TcTIM. Al observar detalladamente el comportamiento de las quimeras TcTIM1-3;TbTIM4-8 y la TcTIM 4; TbTIM 1-3,5-8 se observa que a bajas concentraciones de MMTS la quimera TcTIM1-3;TbTIM4-8 es más resistente que la TcTIM 4; TbTIM 1-3,5-8, mientras que a altas concentraciones se comportan de manera opuesta.

El efecto de la región 4 en la TcTIM1-3;TbTIM4-8 brinda resistencia a la enzima frente al MMTS, sin embargo, el efecto no es tan drástico como para alcanzar un comportamiento como el de TbTIM, lo cual indica que existen otras regiones u aminoácidos involucrados en el cambio de susceptibilidad.

Para continuar la búsqueda en las regiones involucradas en el cambio de susceptibilidad al MMTS entre ambas enzimas, se realizaron estudios sobre las demás mutantes. En la Figura 19 se observa el efecto de las otras quimeras ante el MMTS.

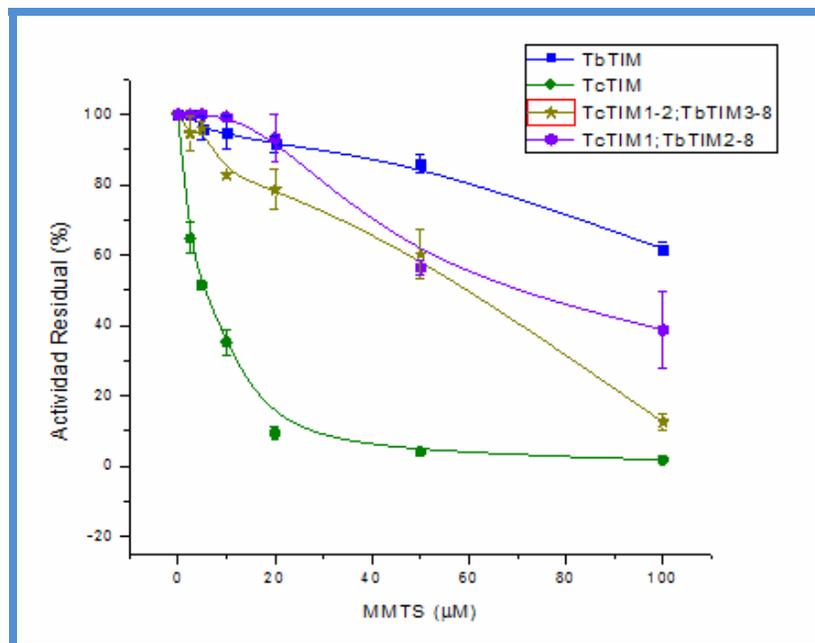


Figura 19.- Efecto del MMTS en las quimeras TcTIM1-2;TbTIM3-8 y TcTIM1;TbTIM2-8. Ambas enzimas presentan cierta resistencia a concentraciones bajas de MMTS, mientras que a altas, son sensibles.

Las quimeras TcTIM1-2;TbTIM3-8 y TcTIM1;TbTIM2-8 también se comportan en forma similar a la quimera TcTim1-4;TbTIM4-8, ya que ambas son un poco más resistentes al efecto del MMTS. Lo interesante de estas mutantes es que a bajas concentraciones de MMTS se comportan ya como TbTIM, lo cual nos indica, que las diferencias en la región 1 también se encuentran involucradas en el cambio de comportamiento.

Al saber que las regiones 1 y 4 son importantes en el cambio de susceptibilidad al MMTS se realizó una mutante más: la quimera TcTIM 2,3,5-8;TbTIM 1,4 (Figura 20). Al igual que las otras mutantes se caracterizó y tampoco hubo diferencia significativa en sus parámetros cinéticos, ni en su estructura. Al realizar los cambios de las regiones 1 y 4 la mutante tuvo una resistencia a la inactivación con MMTS igual que TbTIM (Figura 20), lo cual comprueba que las regiones 1 y 4 son dos regiones importantes en los cambios de susceptibilidad frente al MMTS.

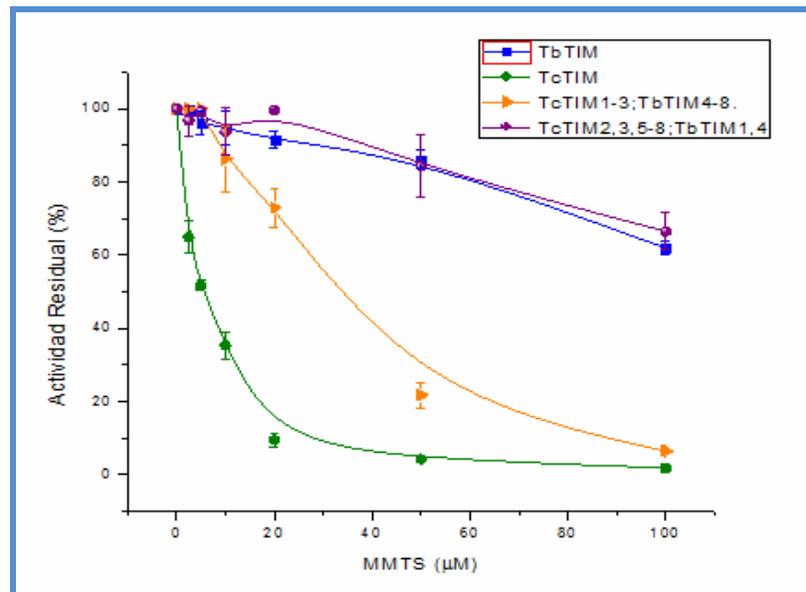


Figura 20.- Efecto del MMTS sobre la TcTIM2,3,5-8;TbTIM1,4. Al agregarle las regiones 1 y 4 de TbTIM una TcTIM esta adquiere un comportamiento muy similar al observado en TbTIM.

En este trabajo de tesis se exploró la pregunta de si la quimera inversa a la TcTIM2,3,5-8;TbTIM1,4: la TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8 también presentaría un comportamiento inverso frente al MMTS (igual o muy similar al de la TcTIM).

3. HIPÓTESIS

Se espera que la mutante TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8, al tener las regiones 1 y 4 de TcTIM y el resto de TbTIM, tenga una mayor sensibilidad a la inactivación por el agente derivatizante de grupos sulfhidrilo MMTS.

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Confirmar que las regiones 1 y 4 de la Triosafosfato isomerasa se encuentran altamente relacionadas con las diferencias de comportamiento de ambas enzimas cuando se les enfrenta a los reactivos de grupo sulfhidrilo.

Objetivos particulares:

- ✓ Realizar la construcción de la mutante de interés TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8 (regiones 1 y 4 de la TIM de *T. cruzi* con las regiones 2,3,5,6,7,y 8 de la TIM de *T.brucei*)
- ✓ Clonar el gen de la TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8 en el vector pET- 3a (vector de sobreexpresión en procariontes).
- ✓ Introducir el vector con la TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8 en células de expresión *E.coli*/BL21DE3pLys S.
- ✓ Sobreexpresar la TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8 y purificar la enzima recombinante.
- ✓ Caracterizar a la TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8 y comparar sus principales parámetros cinéticos con los de las enzimas silvestres.
- ✓ Realizar ensayos de inhibición de la actividad enzimática con el reactivo derivatizante de grupos sulfhidrilo MMTS, observar el efecto que produce este compuesto sobre la quimera TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8 y comparar estos efectos con los de las enzimas silvestres (TbTIM y TcTIM).

5. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

Se realizó el diseño de una mutante de la TIM de *T. cruzi* y *T. brucei* (TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8) la cual posee las regiones 1 y 4 de la TIM *Trypanosoma cruzi* y las regiones 2, 3, 5, 6, 7 y 8 de la TIM de *Trypanosoma brucei*.

La construcción del gen se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Una vez obtenido el gen se clonó en vectores de replicación (pGEM-T-Easy de Promega y pET-3a de Novagen) y se introdujo en células competentes de *Escherichia coli* BL21DE3PlysS para lograr la sobreexpresión de la proteína mediante la inducción con IPTG. La proteína recombinante se purificó utilizando cromatografía líquida de desarrollo rápido (FPLC, por sus siglas en inglés). Posteriormente se efectuó la caracterización cinética de la enzima recombinante y se hicieron los ensayos de inactivación en presencia del MMTS (Figura 21).

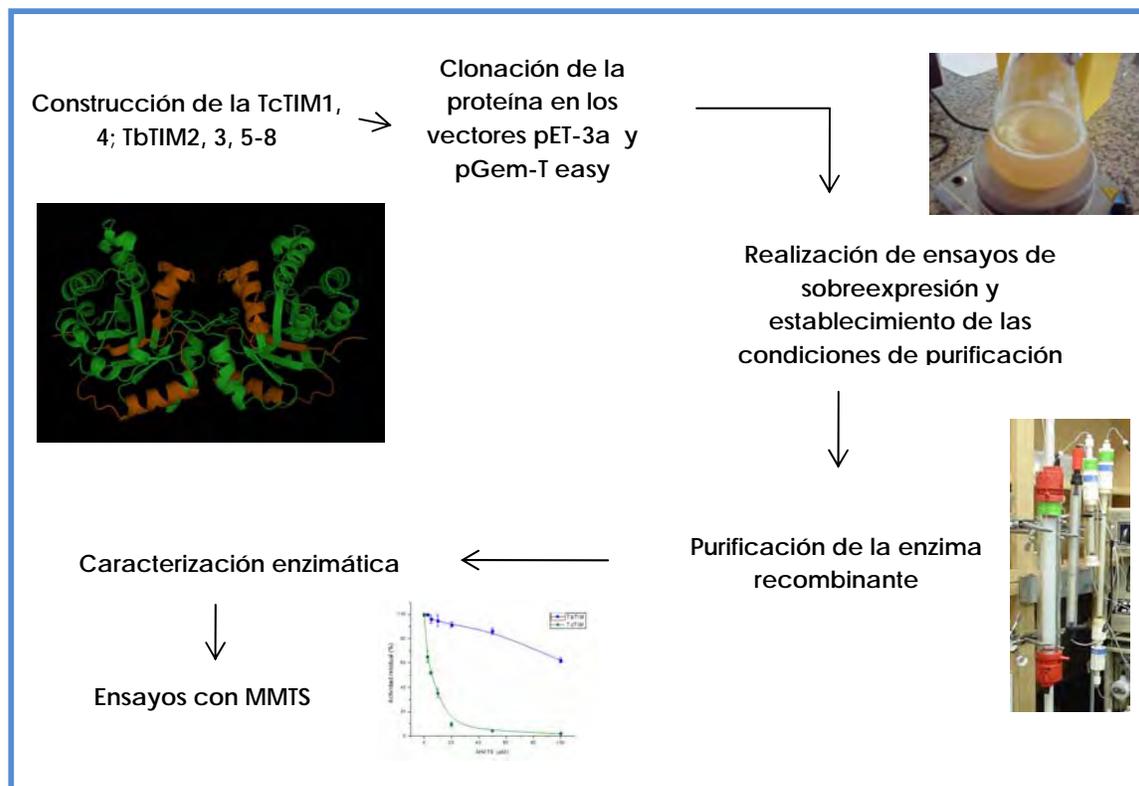


Figura 21. Estrategia experimental. Diseño experimental de la clonación, sobreexpresión, purificación y caracterización de la mutante TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

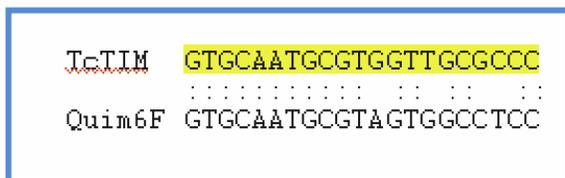
6.1. Amplificación del gen de la TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8 .

La construcción del gen de la TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8 se realizó por la técnica de PCR (Apéndice A) realizando tres reacciones. En la primera reacción se amplificó la región uno de TcTIM para lo cual se utilizó el DNA de TcTIM como templado, los cebadores utilizados fueron el Quim6 RV (iniciador interno) y el T7 promoter (iniciador externo) (Figura 22), la mezcla de reacción utilizada se muestra en la tabla 5. Las condiciones utilizadas se mencionan en la Figura 25.

Tabla 5.- Mezcla de reacción para la reacción del PCR1

Reactivo	Volumen (µL)
DNA TcTIM (162 ng/mL)	1
Oligo Quim 6 RV (200 ng/mL)	0.5
Oligo T7 promoter (200 ng/mL)	1
Agua	39.5
Solución de nucleótidos NEBiolabs (10 mM)	1
BIOLINE 10X Accubuffer	5
Accuzyme DNA polimerasa (2.5 U/µL)	2
Volumen total	50

A)



B)

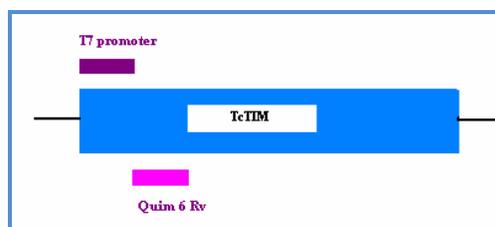


Figura 22.- Reacción de PCR 1.- A) Alineamiento de la secuencia del DNA templado con el iniciador utilizado. B) Analogía de la reacción de PCR 1.

La segunda reacción (PCR₂) amplificó las regiones 2,3,5,6,7,y 8 de TbTIM y la región cuatro de TcTIM, esta se llevo a cabo usando el ADN de la TcTIM4;TbTIM1-3,5-8 (la región 4 de TcTIM y las regiones 1,2,3,5,6,7,y 8 de TbTIM) como templado, los cebadores usados fueron el Quim 6 Fw y el T7 terminator (Figura 23). La mezcla de reacción utilizada se muestra en la tabla 6. Las condiciones del PCR₂ se muestran en la Figura 25.

Tabla 6.- Mezcla de reacción para el PCR2

Reactivo	Volumen (μL)
DNA Quim TcTIM4;TbTIM1-3,5-8 (200 ng/μL)	1
Oligo Quim 6 Fw (200 ng/mL)	0.5
T7 terminator (200 ng/mL)	1
Solución de nucleótidos trifosfatados NEB (10 mM)	1
BIOLINE 10X Accubuffer	5
Accuzyme DNA polimerasa (2.5 U/μL)	2
Agua	39.5
Volumen total	50

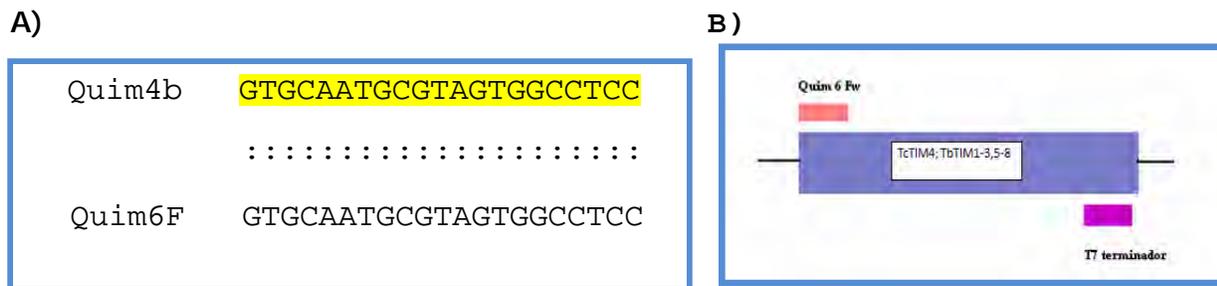


Figura 23.- Reacción de PCR 2.- A) Alineamiento de la secuencia del DNA templado con el iniciador utilizado. B) Diagrama de la reacción de PCR 2.

Finalmente en el tercer PCR se combinan los productos de las primeras reacciones de PCR los cuales se hibridan en su parte complementaria para lograr la amplificación del gen utilizando al T7 promoter y T7 terminator como oligonucleótidos externos con los que se llevó a cabo la amplificación total del gen (Tabla 7; Figuras 24 y 25).

Tabla 7.- Mezcla de reacción para el PCR3

Reactivo	Volumen (μ L)
Producto de PCR1 (8.8 ng/mL)	5
Producto de PCR2 (9.0 ng/mL)	5
T7 terminator (200 ng/mL)	1
Agua	30
T7 promoter (200 ng/mL)	1
BIOLINE 10 X Accubuffer	5
Accuzyme DNA polimerasa (2.5 U/ μ L)	2
Solución de nucleótidos trifosfatados NEB (10 mM)	1
Volumen Total	50

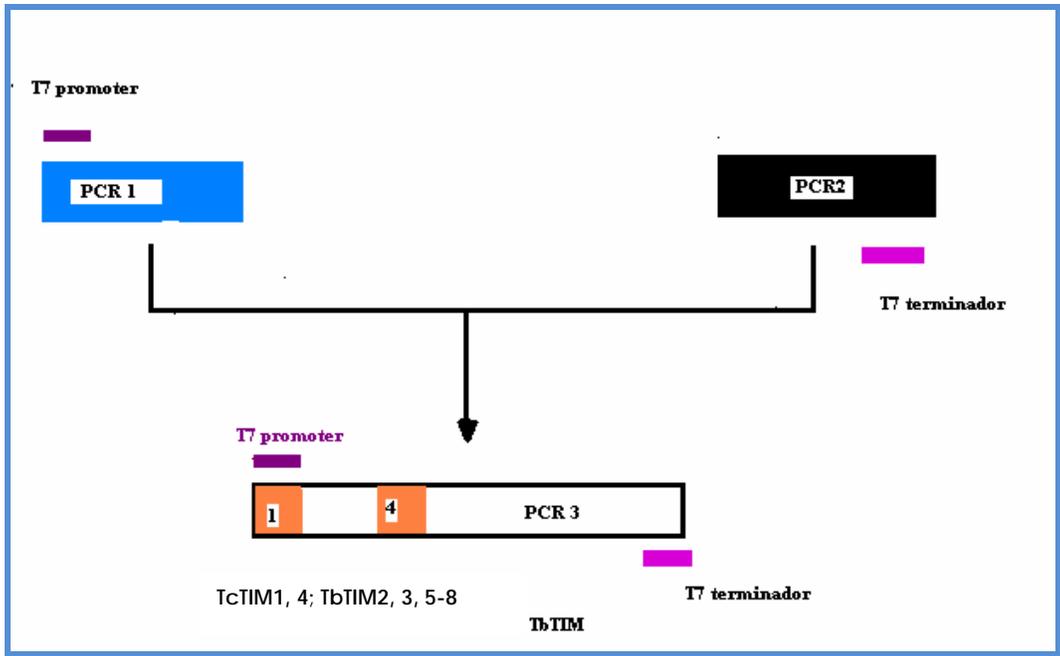


Figura 24. Esquema de la reacción global del PCR 3.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en el equipo de Gene Amp PCR system 2700 de Applied Biosystems.

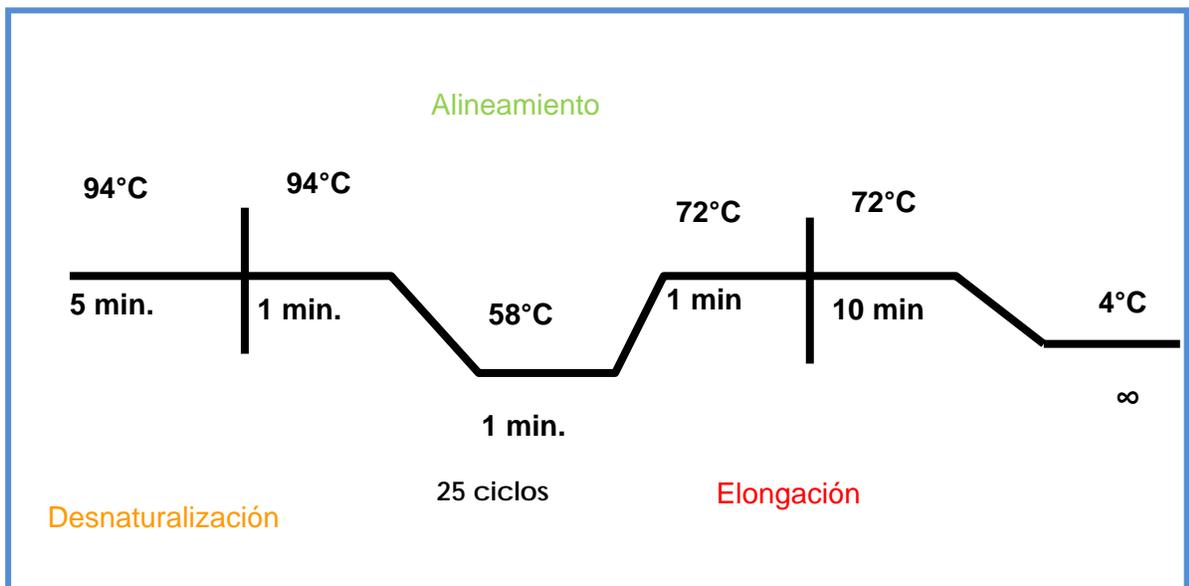


Figura 25.- Condiciones de amplificación utilizadas para los PCR 1, 2 y 3.

6.2. Clonación en los vectores pGEM- T Easy y pET3a

Una vez obtenido el producto de PCR3 se purificó, mediante un gel de agarosa al 1%, con el amortiguador Tris- borato (TBE) y se observó una banda de aproximadamente 760 pb, que fue cortada y purificada con el juego de reactivos comerciales QIAquick Gel Extraction de Qiagen (Apendice B).

El vector de clonación utilizado fue el vector pGEM T-Easy (Promega) (Figura 26) el cual es un vector diseñado específicamente para realizar ligaciones de productos de PCR. Para realizar la clonación del producto de PCR3 en el vector se le adicionaron extremos de adenina mediante un PCR (Tabla 8).

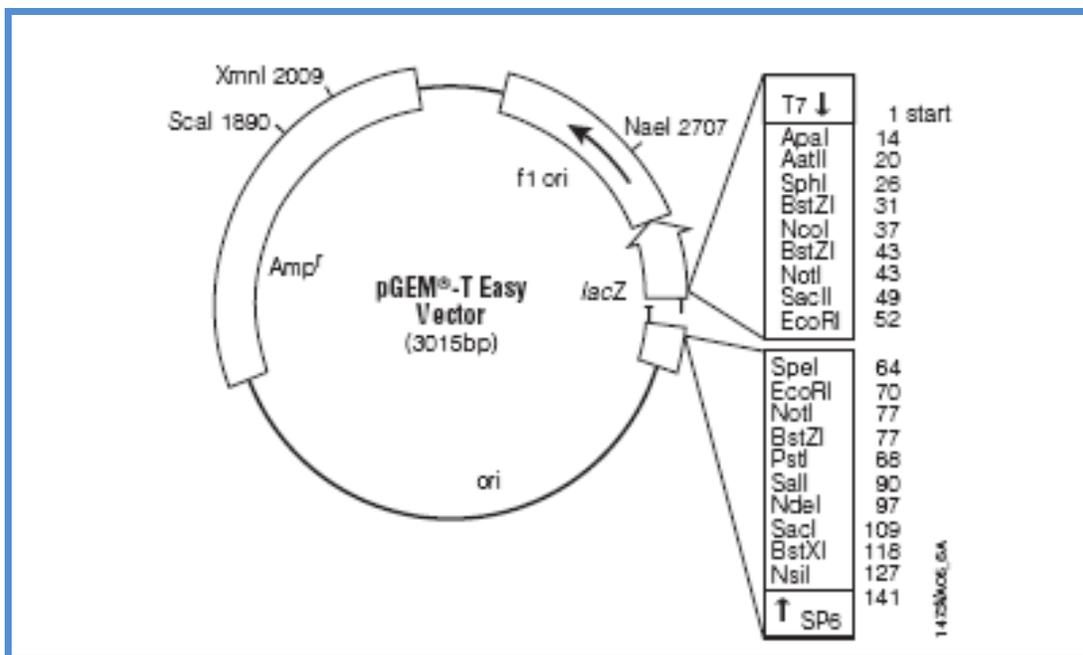


Figura 26.- Mapa del vector pGEM- T Easy. El vector posee el gen de resistencia para ampicilina así como el promotor Lac Z.

Tabla 8.- Mezcla de reacción para la adición de extremos de adenina al producto de PCR3

Reactivos	Volumen (μL)
Amortiguador de reacción estándar polimerasa Taq (10 x)	5
Solución de nucleótidos trifosfatados 10 mM (dNTPs)	1
Taq polimerasa 5 U/mL	1
Agua	8
Producto del PCR3 (11.9 ng/ μL)	35

El producto obtenido de la adición de colas de adenina se purificó utilizando el sistema comercial MinElute para la purificación de productos de PCR de Qiagen. La ligación en el pGEM se realizó usando el inserto con extremos de poli A y el plásmido. De igual modo las reacciones de ligación se hicieron utilizando diferentes relaciones vector: inserto (Tabla 9).

Tabla 9.- Condiciones de ligación en el vector pGEM -T Easy:

Reactivo	Volumen (μL)	Volumen (μL)
Inserto (Con extremos de poli A) 9.2 ng/ μL	5	15
Vector pGEM-TEasy 5.3 ng/ μL	7	10
Amortiguador de la ligasa (2X)	4	3
Agua	3	1
T4 DNA ligasa (2000 U/ μL)	1	1
Volumen total	20	30

Una vez listas las ligaciones se procedió a la transformación en células ultracompetentes *E.coli* XL-gold las cuales se sembraron en cajas con medio LB con ampicilina (100 µg/mL) adicionadas con isopropil-β-D-galactopiranosido (IPTG) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-gal). La adición de estos reactivos permiten la selección de las clonas que contienen el inserto; las colonias con coloración blanca son aquellas que poseen el vector con el inserto, ya que el gen Lac Z presente en el pGEM, permite la expresión de la enzima β-galactosidasa. Al agregar el inductor en el medio (IPTG), la β-galactosidasa producida rompe a la molécula del X-gal generando un compuesto halogenado color azul. La introducción del inserto en el plásmido, interrumpe la secuencia del promotor Lac, evitando la producción de la β-galactosidasa, impidiendo así que se forme el compuesto colorido.

Al tener las colonias seleccionadas se aseguró la presencia del inserto mediante la digestión del plásmido con la enzima EcoRI durante dos horas a 37°C, el producto se cargó en un gel de agarosa al 1%. El inserto obtenido se cortó y purificó con el juego de reactivos comerciales QIAquick Gel Extraction de Qiagen. El inserto purificado se digirió con las enzimas NdeI y BamHI durante 2 horas a 37°C y se cargó en un gel de agarosa al 1% para observar la presencia del inserto y verificar su integridad.

Una vez más se realizó un nuevo cultivo en medio LB adicionado con ampicilina con la construcción en pGEM de la cual se extrajo el ADN con el kit QIAprep®Spin Miniprep de Qiagen y secuenció para asegurar que el inserto se hubiera introducido de forma correcta. Los oligonucleótidos utilizados fueron el T7 promoter y el SP6 promoter.

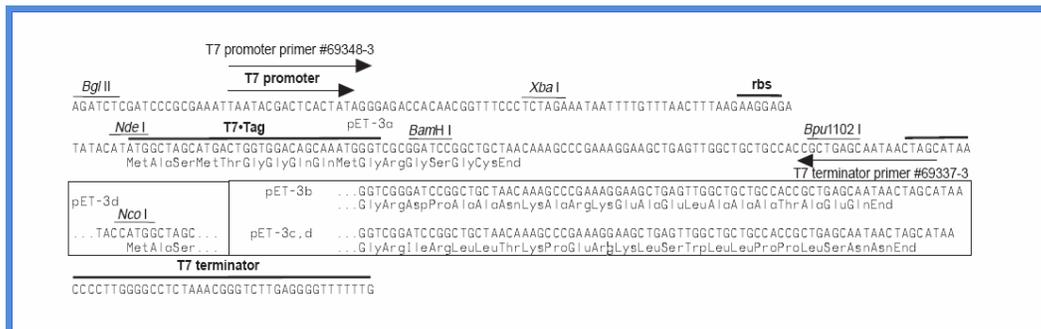
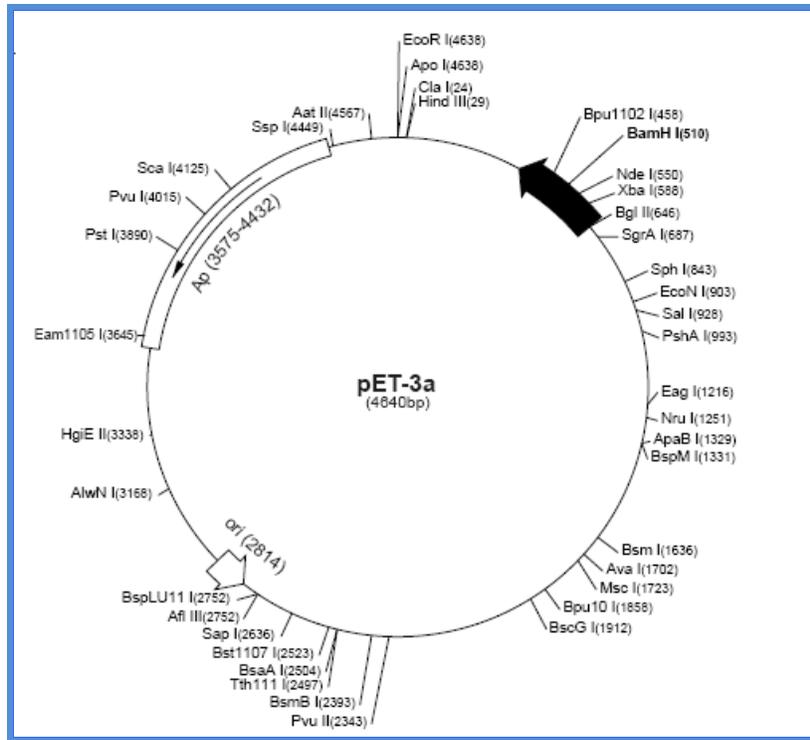


Figura 27.- Mapa del vector pET-3a de Novagen®. El recuadro y la flecha negra indican el sitio de multiclonación, en este caso el inserto se encuentra clonado con los sitios NdeI y BamHI.

Una vez que se confirmó que la secuencia del inserto fue correcta, se realizó la subclonación de este en el vector pET-3a (figura 27). Se utilizaron las mismas relaciones de ligación mostradas en la tabla 9. Finalmente de algunas de las colonias transformantes se extrajo DNA y se buscó el inserto digiriéndolo con las enzimas NdeI y BamHI, utilizando para ello el horno de microondas (Sharp

carousel 1100W) durante tres ciclos de 15 segundos, con intervalos de descanso de 3 minutos. El producto de la digestión se visualizó en un gel de agarosa al 1%. De las colonias portadoras del inserto, se seleccionó una y se realizó un subcultivo en medio LB adicionado con ampicilina, se extrajo DNA y se secuenció, para verificar que el inserto se había incorporado de manera satisfactoria. Los oligonucleótidos utilizados fueron el T7 promoter y T7 terminator.

6.3. Transformación en células de expresión

Una vez que se verificó que la secuencia de la construcción en pET-3a era correcta, se transformó en células competentes de *E.coli* BL21DE3pLysS compatibles con el sistema de expresión de pET-3a. Después de la transformación, se sembraron las bacterias en cajas con medio LB (100 µg/mL de ampicilina) y se incubaron a 37°C durante 16 horas. Se seleccionaron ocho colonias, las cuales se parcharon en otra caja con medio LB (100 µg/mL de ampicilina). Tras 16 horas de incubación se extrajo el DNA con el sistema QIAprep®Spin Miniprep de Qiagen. Ya purificado el DNA se efectuó una doble digestión con las enzimas NdeI y BamHI en el horno de microondas como se describió anteriormente. El producto de la doble digestión se analizó en un gel de agarosa al 1%, las colonias que poseían el inserto, presentaron dos bandas: una de aproximadamente 756 pb y otra de 4640 pb (una correspondiente al inserto y otra al plásmido).

6.4. Ensayos de sobreexpresión

Una vez verificada la presencia de la construcción en nuestras las células de sobreexpresión (BL21DE3pLysS) se realizaron ensayos de sobreexpresión (Figura 28) para establecer las condiciones óptimas de producción de la proteína recombinante. Para ello se realizó un precultivo en medio LB líquido (10 mL) con ampicilina (100 µg/mL) el cual se incubó durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, el cultivo se centrifugó y el botón resultante se resuspendió en 1 mL

de medio LB nuevo con el cual se inició otro cultivo de 100 mL en medio LB líquido con ampicilina [100 µg/mL] al cual se le agregó un volumen de inoculo suficiente de tal modo que se obtuviera una densidad óptica de $A_{600nm} = 0.1$ y se incubó a 37° C hasta que el cultivo tuvo una densidad óptica de 0.8 a una longitud de onda de 600 nm. Una vez alcanzada esta densidad óptica, se tomó una muestra de aproximadamente 100 µL y se guardó a 4°C. Enseguida el cultivo se indujo con IPTG a una concentración 0.4 mM y se dividió en tres partes, cada parte se incubó a una temperatura distinta; la primer parte del cultivo se incubó a 21°C, la segunda a 30°C y la tercera a 37°C. Se monitoreó la producción de la proteína tomando muestras a las 3 y 16 horas de incubación. Las muestras se etiquetaron y conservaron a 4°C. La producción de la proteína se analizó en geles de poliacrilamida al 16 % en condiciones desnaturalizantes siguiendo la metodología SDS-PAGE tipo Von Jagow.

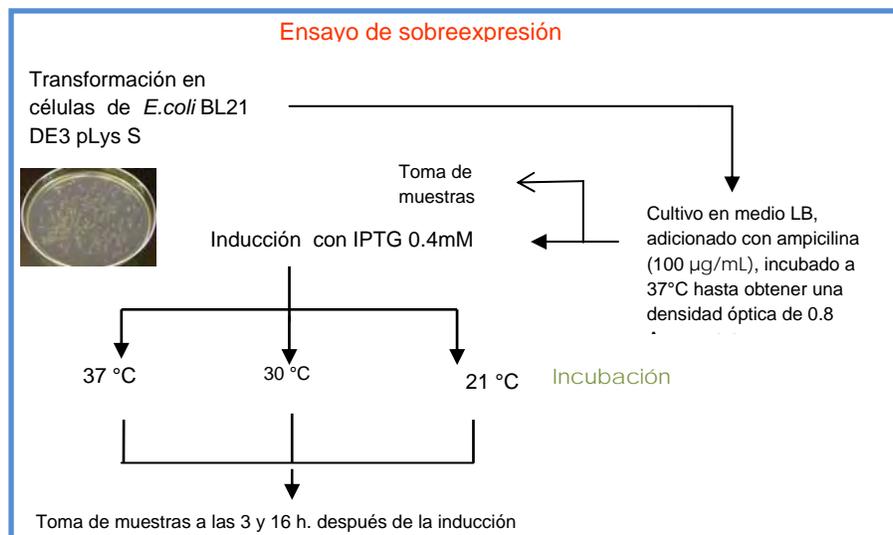


Figura 28.- *Ensayos de sobreexpresión para la producción de enzima recombinante.*

6.5. Purificación de la TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8

Antes de llevar a cabo la purificación de la enzima, se efectuó un ensayo para encontrar las condiciones más apropiadas de purificación de la enzima. Se probaron dos condiciones distintas como se describe a continuación

Para comenzar el ensayo se realizaron dos cultivos de *E.coli BL21(DE3)pLysS* con el inserto en medio LB adicionado con 100 µg/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C hasta una densidad óptica de $A_{600nm} = 0.8$. Se realizó la inducción con IPTG a una concentración 0.4 mM y uno de los cultivos se incubó a 21°C y el otro a 37°C durante 16 horas. Las células se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 minutos utilizando el rotor JA-10 de Beckman Coulter. Posteriormente cada uno de los botones se dividió en dos partes, una parte se resuspendió en el amortiguador de lisis adicionado con NaCl (300 mM) y la otra parte se resuspendió en el amortiguador de lisis sin NaCl. Entonces se procedió a realizar la ruptura celular por sonicación (sonicador Sonifier 450 Branson) en 5 ciclos de 1 minuto con intervalos de descanso de un minuto a una potencia de 5W. Se tomaron muestras a los lisados celulares, sobrenadantes, pastillas y se analizaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

Al conocer las condiciones óptimas para el tratamiento de la TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8, se realizó la purificación de esta usando cromatografía líquida de desarrollo rápido. El protocolo utilizado se describe en la Figura 29.

6.6. Determinación de la actividad catalítica de TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8

La actividad catalítica de la enzima se midió monitoreando la oxidación del NADH a NAD⁺ en un ensayo acoplado a la enzima α -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. La actividad de la TIM se mide siguiendo la dirección de GAP a DHAP (Figura 30). La cuantificación de la actividad se realizó utilizando con 5 ng/mL de la TcTIM1, 4; TbTIM2, 3,5-8 en la celda.

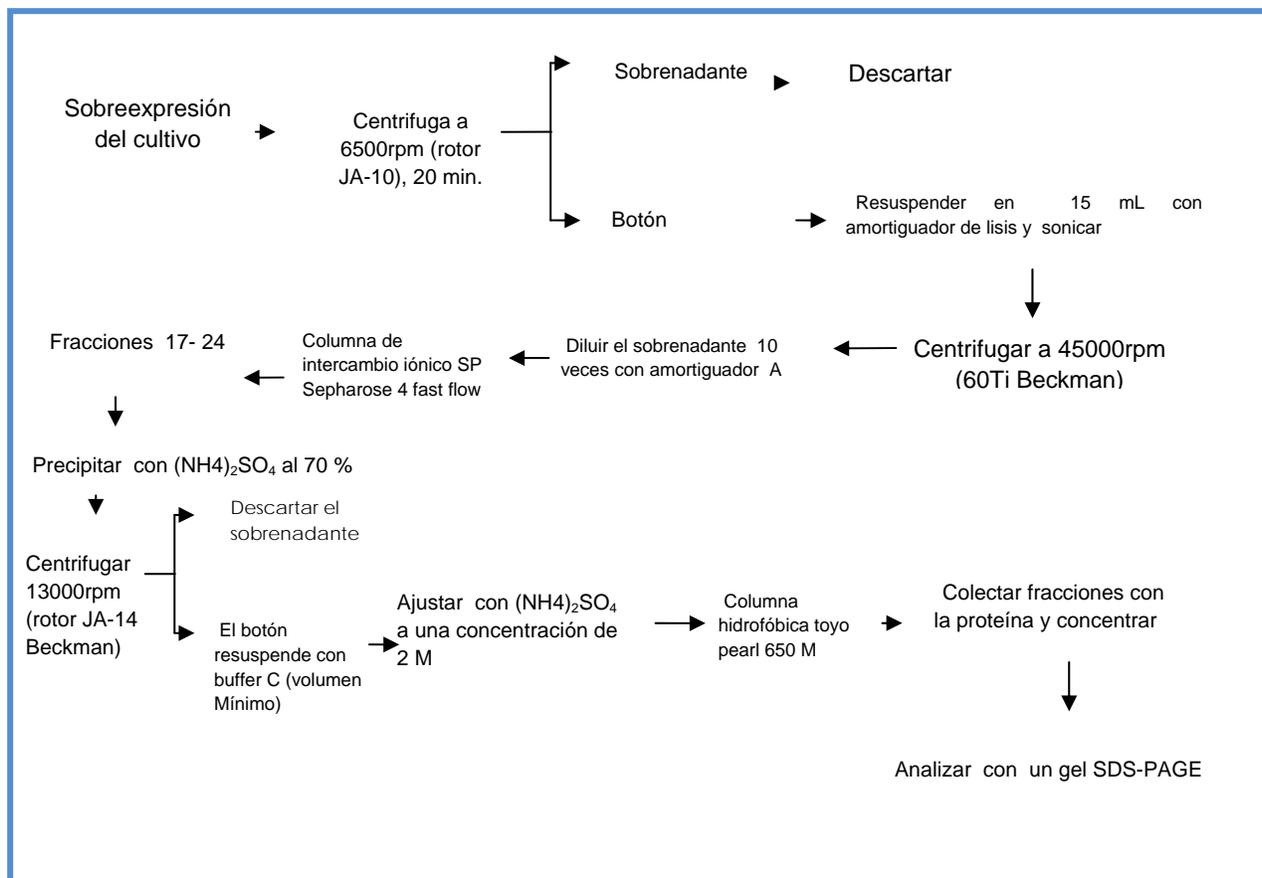


Figura 29. Esquema de Purificación de la TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8. La composición de los amortiguadores utilizados, se muestra en el apéndice C.

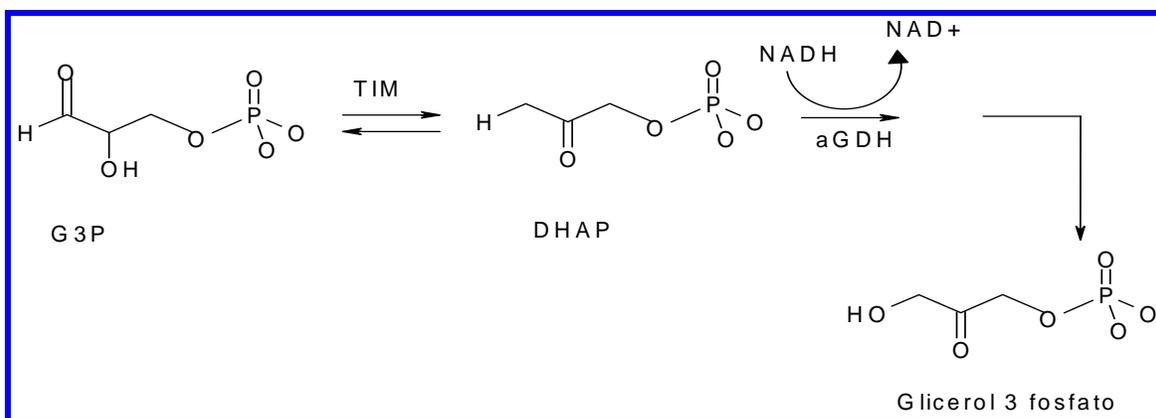


Figura 30. Ensayo acoplado de la TIM con la αGDH para determinar la actividad catalítica de la TIM.

La cuantificación de la actividad específica fue realizada a lo largo del proceso de purificación. La cantidad de proteína en cada muestra fue cuantificada

con la ayuda del juego de reactivos comercial de ácido bicinconínico (BCA protein assay PIERCE) (Apéndice A).

A partir de la secuencia de la mutante, se obtuvieron algunos parámetros fisicoquímicos con ayuda del programa **protparam** disponible en el servidor Expasy proteomic server (<http://www.expasy.ch/tools/>).

6.7. Estabilidad de la TcTIM1,4;TbTIM 2,3,5-8

Se realizaron algunos experimentos para probar la estabilidad de la enzima incubándola a diferentes concentraciones y temperaturas durante 2 horas, tomando muestras cada 10 min y cuantificando su actividad específica. Las concentraciones de proteína utilizadas estuvieron en un rango de 300 a 500 µg/mL. Las temperaturas utilizadas fueron 36 y 25°C respectivamente. Para la realización del experimento, se introdujo a la proteína (a la concentración deseada) en un baño de agua a la temperatura a la cual se decidió trabajar y se tomaron las muestras para la medición de la actividad específica. Con los datos de actividad obtenidos, se calculó la actividad residual de la enzima, utilizando la lectura del tiempo cero como el 100% de la actividad.

6.8. Caracterización cinética de la TcTIM1, 4; TbTIM2, 3,5-8

La determinación de los parámetros cinéticos ($V_{m\acute{a}x}$ y K_m) se efectuó mediante la cuantificación de la actividad (utilizando a la enzima a una concentración de 5 ng/mL) realizando varios ensayos a diferentes concentraciones de sustrato (Tabla 10). Las curvas obtenidas se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten, obteniendo los parámetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ y K_m aplicando una regresión no lineal de los datos obtenidos con el programa **Origin Professional 8.0** en el modelo hipérbola.

Tabla 10.- Mezcla de reacción para la obtención de los parámetros cinéticos.

[G3P] (mM)	Vol G3P(μL)	H ₂ O(μL)	Amortiguador TE (EDTA,TEA pH 7.4) (μL)	TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8 (ng)
0.063	2.5	197.5	797.5	5
0.0759	3	197	797.5	5
0.1051	5	195	797.5	5
0.1261	6	194	797.5	5
0.25	12.5	187.5	797.5	5
0.5257	16.5	183.5	797.5	5
0.6325	25	175	797.5	5
1.265	50	150	797.5	5
1.385	65.86	134.14	797.5	5
2.103	100	100	797.5	5
3	152	48	797.5	5

6.9. Efecto de los compuestos derivatizantes del grupo sulfhídrico (inactivación por MMTS)

El metil metano tiosulfonato, es un compuesto que reacciona con el grupo sulfhídrico de las cisteínas produciendo el derivado conocido como el metildisulfuro.

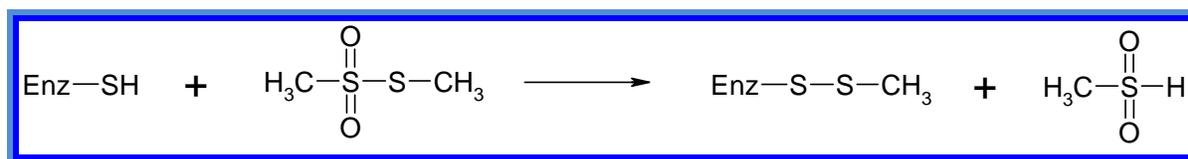


Figura 31.- *Reacción del MMTS con el grupo sulfhidrico.* Tomado de Smith D., *et al.*, (1975).

El efecto del MMTS sobre la mutante TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8 se evaluó incubándola con diferentes concentraciones del compuesto y midiendo el efecto que el MMTS genera sobre la actividad de la proteína. La enzima fue incubada a 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con amortiguador TEA (Apéndice C) y se le agregó el MMTS a diferentes concentraciones (de 0 hasta 100 μM). La actividad fue medida al tiempo cero (la proteína sin MMTS) y el resto de las muestras se incubaron durante 2 horas a 25°C. Transcurrido ese tiempo, se tomó una alícuota de cada tubo y se realizaron las diluciones pertinentes para llegar a una concentración de 5 ng/mL y medir su actividad.

Con los datos de actividad obtenidos se calculó la actividad residual de la enzima, utilizando la lectura del tiempo cero (proteína incubada sin MMTS) como el 100%.

6.10. Determinación de las propiedades espectroscópicas

6.10.1. Dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo circular (DC) fue obtenido en el espectropolarímetro AVIV 62 HDS (Lakewood, NJ). La celda utilizada fue de cuarzo y las dimensiones de esta fueron: 0.1 cm x 1.0 cm (paso de luz) el ancho de banda fue de 1.0 nm para el UV lejano y cercano. Las enzimas fueron dializadas en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.4. La cantidad de proteína utilizada fue de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La muestra fue preparada en el amortiguador de fosfatos y fue filtrada en una membrana con un poro de 0.45 μm (Millex-Hv, membrana de polivinilfluoruro de polivinilideno). Se realizaron tres repeticiones de la medición en un intervalo de 195-240 nm. Para calcular los valores de elipticidad molar se determinó la concentración de cada una de las proteínas a una longitud de onda de 280 nm utilizando un coeficiente de extinción molar específico para cada una de las proteínas (tabla 11).

Tabla 11. Coeficientes de extinción molar de diferentes TIMs a 280 nm

Enzima	E_{280} ($\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
TbTIM	34850
TcTIM	36130
TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8.	26720

La elipticidad molar fue obtenida con la ecuación 1:

$$\Theta = (\theta \text{ obs (grados)} \times \text{MRW} \times 100) / C \times l$$

Ecuación 1. Ecuación para obtener la elipticidad molar. Donde Θ es la elipticidad molar en grados, θ obs es la medida de elipticidad observada en grados, MRW es la media del peso molecular de los residuos (por sus siglas en inglés mean residue weight), 100 es el factor de conversión necesario para la conversión de la concentración molar a dmol/cm^2 , C es la concentración de la proteína en mg/mL y l es el paso de luz de la celda en cm.

6.10.2. Desnaturalización térmica

El patrón de desnaturalización térmica fue determinado monitoreando los cambios de elipticidad de la enzima a 222 nm en un intervalo de temperatura de 25-75°C. El incremento de la temperatura fue de 1°C cada 2 minutos. Una vez más el amortiguador utilizado fue el de fosfatos 10 mM y pH 7.4. La concentración utilizada de proteína fue de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La fracción desplegada (F_D) se calculó con la ecuación 2.

$$F_D = (Y_N - Y) / (Y_N - Y_D)$$

Ecuación 2. Cálculo de la fracción desnaturalizada. Y_N y Y_D corresponden a los valores de elipticidad de la especie nativa y la especie desnaturalizada. Los dos parámetros se determinan a partir de la extrapolación lineal de la porción inicial y final de la curva de elipticidad (Y) contra la temperatura.

7. Resultados

7.1. Amplificación del gen de la TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8.

Todos los alineamientos realizados durante el diseño de la mutante fueron realizados en el servidor ClustalW

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Como se mencionó con anterioridad la construcción del gen de la quimera TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8 se realizó a base de reacciones de PCR. La primera reacción se hizo utilizando el DNA de TcTIM como templado. Su secuencia se muestra a continuación: la región sombreada en azul, destaca la región uno de TcTIM y la región resaltada en amarillo indica la el sitio de alineamiento con el cebador (Quim 6 Rw).

```
Atggcatcgaagcctcaaccatcgccgcccgaactggaagtgcaacggctccgagagttgct
tgtaccactcatcgagaagctcaatgcagcgacttttgatcacgatgtgcaatgcggtggttgcgc
ccacctttctccacatcccaatgacgaaggcgaggctcaccaaccccaagtccagattgccgca
cagaacgcgatcacaaggtcgggcgctttcacgggggaagtctctctgcagatcctcaaggacta
tggaatcagctgggttggttggggccattcggaacggcgcttgactacggcgaaacgaacgaaa
tcggttgcggaaaaggtggcgagggcctgcgctgccggcttccatgtcatcgtctgtgttggcgaa
accaacgaggagcgggaagctggccgcacggcagccgctcgtggtgacgcagctcgccgctgctgc
gcagaagcttagtaaggaggcggtggtctcgcgctcgttatgcctacgagcccgtgtgggcaatcg
gcaccggtaaagtggcaaccccgagcaggcgcaggaggtccatgaattgctgcgcccgttgggtg
cggagcaaattgggactgacatcgccgcgcaactgcgcatcttgatggcgggtccggtgaccgc
caaaaatgcacgcagcgtatatcagatgcgcgacatcaacggcttccttgtgggcggtgcctcgc
tcaagccggagtttgttgaaatcattgaggccacgaagtag
```

Para la amplificación del resto del gen se utilizó el DNA de la quimera TcTIM4; TbTIM1-3,5-8, su secuencia se muestra a continuación. La región sombreada en gris, indica la región cuatro de TcTIM, la región resaltada en amarillo indica la el sitio de alineamiento con el cebador (Quim 6Fw).

Atgtccaagccacaacccatcgcagcagccaactggaagtgcaacggctcccaacagtctttgtc
 ggagcttattgatctgtttaactccacaagcatcaaccacgac**gtgcaatgcgtagtggcctcc**a
 cctttgttcaccttgccatgacgaaggagcgtctttcacaccccaaatttgtgattgcggcgag
 aacgccattgcaaagagcgggtgccttcaccggcgaagtctccctgcccatcctcaaagatttcgg
 tgtcaactggattgtt**ctgggtcactccgagcgcgcgcttgtactacggcgaaacgaaacgaaatcg**
ttgcggaaggtggcgcaggcctgcgctgccggcttcatggttattgcttgcatcggcgaaacg
 ctgcaggagcgtgaatcaggtcgcaccgctgttgttgtgctcacacagatcgctgctattgctaa
 gaaactgaagaaggctgactgggccaagttgtcatcgcctacgaaccgcttggggccattggta
 cggcaaggtggcgcacaccacagcaagcgcaggaagcccacgcactcatccgcagctgggtgagc
 agcaagattggagcagatgtcgcgggagagctccgcattctttacggcggttctgttaatggaaa
 gaatgcgcgcactctttaccaacagcagagacgtcaacggcttccttgttgggtggcctcactta
 agccagaatttgtggacatcatcaaagccactcagtga

Finalmente se obtiene el gen de la TIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8. Las regiones resaltadas en violeta y lila indican a las regiones uno y cuatro de TcTIM, la región sombreada con amarillo muestra el sitio de alineamiento del PCR1 y PCR2.

Atggcatcgaagcctcaacccatcgccgcccgaactggaagtgcaacggctccgagagtttgct
tgtaccactcatcgagacgctcaatgcagcgaacttttgatcacgat**gtgcaatgcgtagtggcctcc**
ccacctttgttcaccttgccatgacgaaggagcgtctttcacaccccaaatttgtgattgcggcg
 cagaacgccattgcaaagagcgggtgccttcaccggcgaagtctccctgcccatcctcaaagattt
 cgggtgtcaactggatt**gttctgggtcactccgagcgcgcgcttgtactacggcgaaacgaaacgaaa**
tcggtgcggaaggtggcgcaggcctgcgctgccggcttcatggttattgcttgcatcggcgaa
 acgctgcaggagcgtgaatcaggtcgcaccgctgttgttgtgctcacacagatcgctgctattgc
 taagaaactgaagaaggctgactgggccaagttgtcatcgcctacgaaccgcttggggccattg
 gtaccggcaaggtggcgcacaccacagcaagcgcaggaagcccacgcactcatccgcagctgggtg
 agcagcaagattggagcagatgtcgcgggagagctccgcattctttacggcggttctgttaatgg
 aaagaatgcgcgcactctttaccaacagcagagacgtcaacggcttccttgttgggtggcctcac
 ttaagccagaatttgtggacatcatcaaagccactcagtga

7.2. Clonación en los vectores pGEM- T Easy y pET3a

En la figura 32 se muestran los productos de PCR obtenidos durante la construcción del gen.

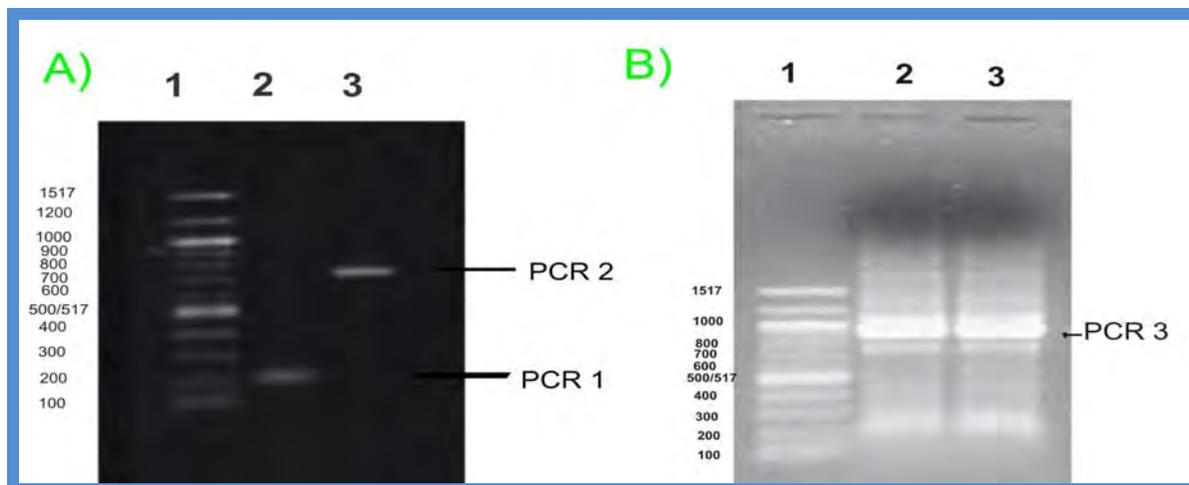


Figura 32. Productos de PCR 1, 2 y 3 (Geles de agarosa al 1%). **Gel A)** Carril 1.- Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder de New England Biolabs. Carril 2.- Producto de PCR 1(132 pb) Carril 3.- Producto de PCR 2 (645 pb) **Gel B)** Carril 1.- Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder de New England Biolabs. Carriles 2 y 3.- Producto de PCR 3 (peso molecular (756 pb).

La figura 33 muestra la clonación del inserto en el vector pGEM-T Easy. Una vez obtenida la construcción en él se realizaron las digestiones pertinentes para buscar las clonas portadoras del inserto.

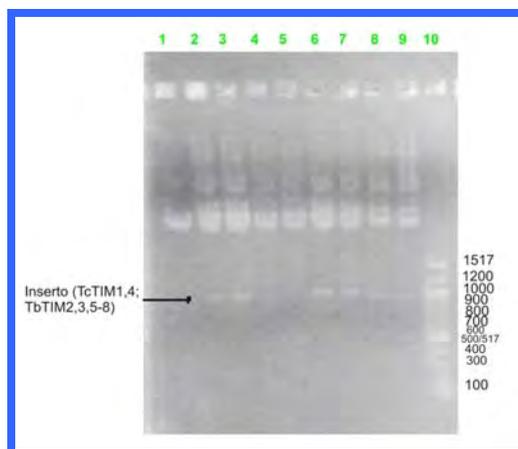


Figura 33. Transformantes de la construcción en pGEM-T Easy. Gel de agarosa al 1%. Digestión de DNA de colonias tranformantes con EcoR1, BamHI y NdeI. Solo las colonias correspondientes a los carriles 2, 3,6-9 resultaron ser portadoras del inserto. Carril 10.- Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder de New England Biolabs.

Una vez obtenido el inserto se purificó y preparó para ser subclonado en el vector pET-3a (Figura 34 y 35)

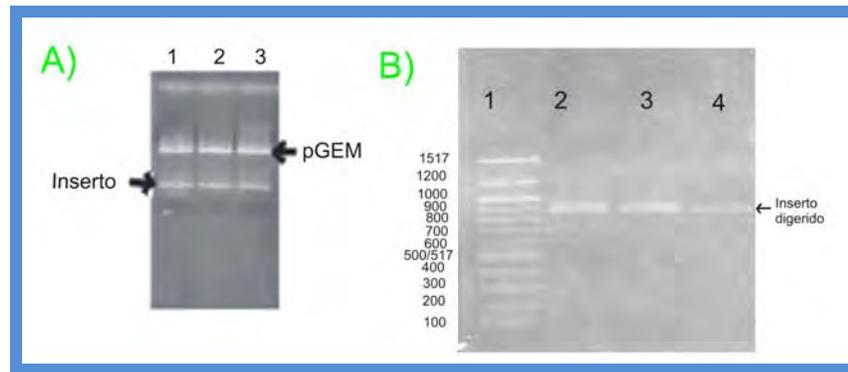


Figura 34. Construcción de TcTIM1,4;TbTIM 2,3,5-8 en el vector pGEM-T Easy (Geles de agarosa al 1%) Gel A) Carril 1,2 y 3.- Digestión del pGEM-T Easy con la enzima EcoRI. Gel B) Carril 1.- Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder de New England Biolabs. Carriles 2,3 y 4.- Inserto digerido con las enzimas NdeI y BamHI.

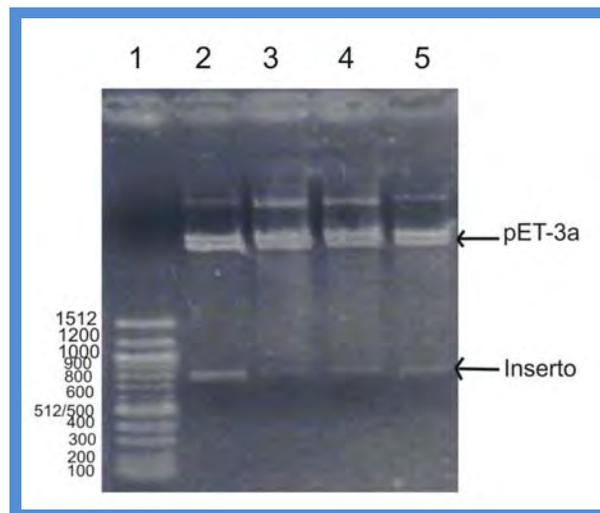


Figura 35. Clonación de la TcTIM1,4;TbTIM 2,3,5-8 en el vector pET-3a (Gel de agarosa al 1%). Carril 1. Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder de New England Biolabs. Carriles 2-5.- Digestión del vector pET-3a con las enzimas NdeI y BamHI.

Una vez que se logró obtener la construcción en el vector pET-3a se extrajo DNA de las clonas portadoras del inserto y se secuenció para verificar la incorporación correcta del inserto (Figuras 36 y 37).

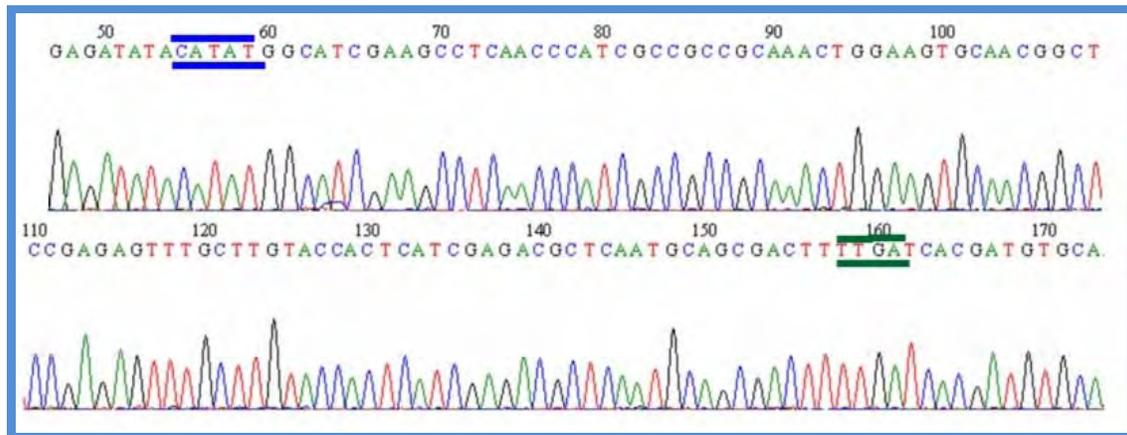


Figura 36. Electroferograma de secuenciación de la TcTIM1, 4; TbTIM 2, 3,5-8 secuenciado con el oligómero interno T7 promoter. La imagen muestra el análisis de la región uno, la cual fue correctamente incorporada. En el recuadro azul se muestra en codón de inicio y en el recuadro verde se muestra la parte final de la región 1.

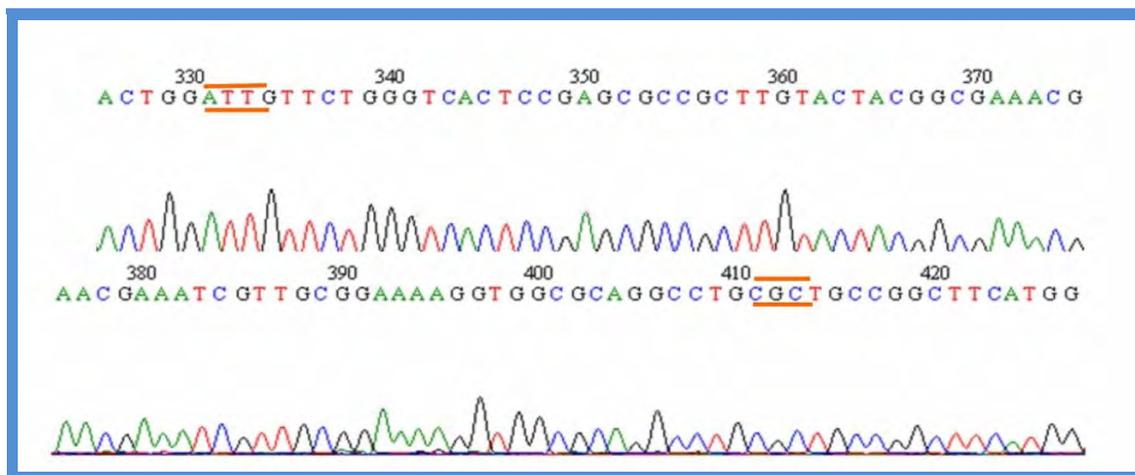


Figura 37. Electroferograma de secuenciación de la TcTIM1, 4; TbTIM 2, 3,5-8 secuenciado con el oligómero interno T7 promoter. La imagen muestra la secuencia de la región cuatro, la cual fue correctamente incorporada. Los recuadros rojos muestran los codones inicial y final de la región 4 respectivamente.

7.3. Transformación en células de sobreexpresión

Una vez asegurada la correcta incorporación de inserto, se realizó la transformación del plásmido con el inserto en las células de sobreexpresión BL21DE3pLys S obteniendo resultados satisfactorios.

7.4. Ensayos de sobreexpresión de la TcTIM 1,4; TbTIM 2, 3,5-8

En la Figura 38 se muestra la inducción de la TcTIM 1,4 ; TbTIM 2, 3,5-8 con una concentración de IPTG (0.4 mM) incubada a diferentes temperaturas. En el gel se observa que existen tres condiciones en donde se obtuvo una mayor producción de proteína: cuando la muestra fue incubada a 37°C durante 3 horas y cuando la muestra fue incubada a 21°C durante 16 horas y cuando la muestra fue incubada a 37° C durante 16 horas.

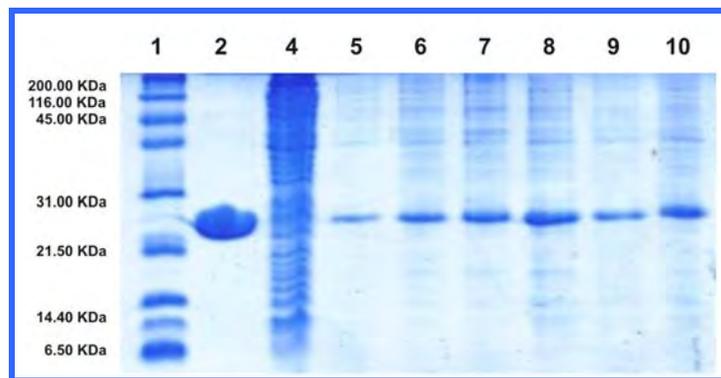


Figura 38. Ensayos de sobreexpresión de la TcTIM 1,4; TbTIM 2, 3, 5-8 (Gel SDS-PAGE 16% utilizando el sistema tipo Von-Jagow) Carril 1.- Marcador SDS-PAGE Broad Range Bio-Rad. Carril 2: TIM silvestre pura (TbTIM). Carril 3.- Muestra sin inducir. Carril 4.-Inducción a 21 °C durante 3 h. Carril 5.- Inducción a 30 °C durante 3 h. Carril 6.- Inducción a 37 °C durante 3 h. Carril 7.- Inducción a 21 °C durante 16 h. Carril 8.- Inducción a 30 °C durante 16 h. carril 9.- Inducción a 37 °C durante 16 h.

En un principio, no se observó una diferencia significativa en la obtención de la enzima con respecto al tratamiento con o sin NaCl (Figuras 39 y 40). Por lo que se decidió purificar la enzima como si se purificara a TbTIM silvestre debido a que la mutante, en su mayor parte, es muy similar a TbTIM.

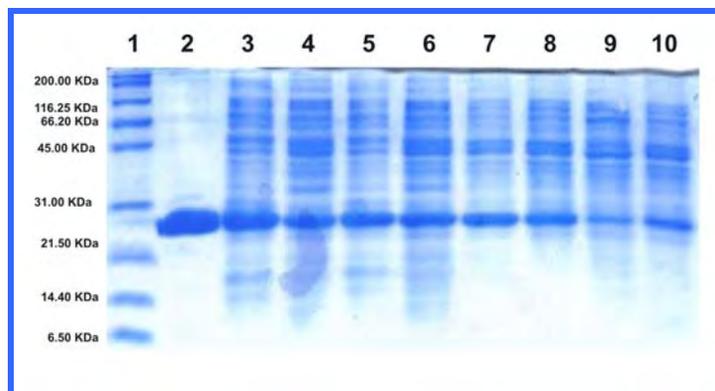


Figura 39. - Ensayo para encontrar las condiciones apropiadas para la purificación de *la TctIM* 1,4:*TbTIM* 2,3,5-8 (Gel SDS-PAGE 16% utilizando el sistema tipo Von-Jagow). Carril 1.- Marcador SDS-PAGE Broad Range Bio-Rad. Carril 2: *TIM* silvestre pura. Carril 3.- Lisado celular (LC) tratado con NaCl crecido a 21 °C. Carril 4.- LC tratado sin NaCl crecido a 21 °C. Carril 5.- LC tratado con NaCl crecido a 37 °C. Carril 6.- LC tratado con NaCl crecido a 37 °C. Carril 7.- Sobrenadante después de centrifugar los lisados celulares a 6500rpm tratados con NaCl crecido a 21 °C. Carril 8.- Sobrenadante después de centrifugar a 6500 rpm el LC sin tratamiento con NaCl crecido a 21 °C. Carril 9.- Sobrenadante después de centrifugar a 6500 rpm el LC tratado con NaCl crecido a 37 °C. Carril 10.- Sobrenadante después de centrifugar a 6500 rpm sin tratamiento con NaCl crecido a 37 °C .

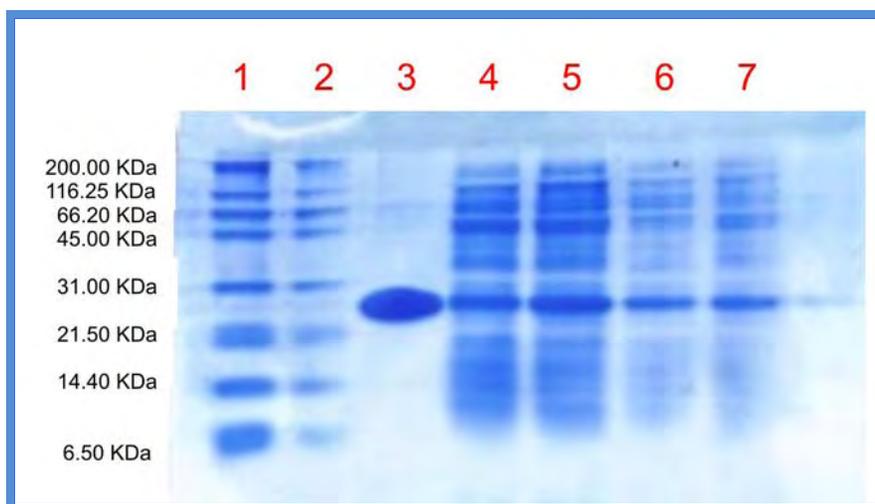


Figura 40.- Ensayo para encontrar las condiciones apropiadas para la purificación de *la TctIM* 1,4:*TbTIM* 2,3,5-8 (Gel SDS-PAGE 16% utilizando el sistema tipo Von-Jagow). Carril 1 y 2.- Marcador SDS-PAGE Broad Range Bio-Rad. 3.-: *TIM* silvestre pura (*TbTIM*). Carril 4.- Pastilla después de centrifugar a 45000 rpm tratada con NaCl crecido a 21 °C. Carril 5.- Pastilla después de centrifugar a 45000 rpm tratada con NaCl incubado a 21 °C. Carril 6.- Pastilla después de centrifugar a 45000 rpm tratada con NaCl crecida a 37 °C. Carril 7.- Pastilla después de centrifugar a 45000 rpm tratada sin NaCl crecida a 37 °C.

7.5. Purificación de la TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8

Después de seguir la metodología mostrada en la Figura 31, cuando la proteína eluye de la columna de intercambio iónico, prácticamente se encuentra pura (Figura 41). La fracción que no se adhirió parece encontrarse libre de TIM. Finalmente, la proteína sale pura de la columna hidrofóbica (butyl Toyopearl) (Figura 42).

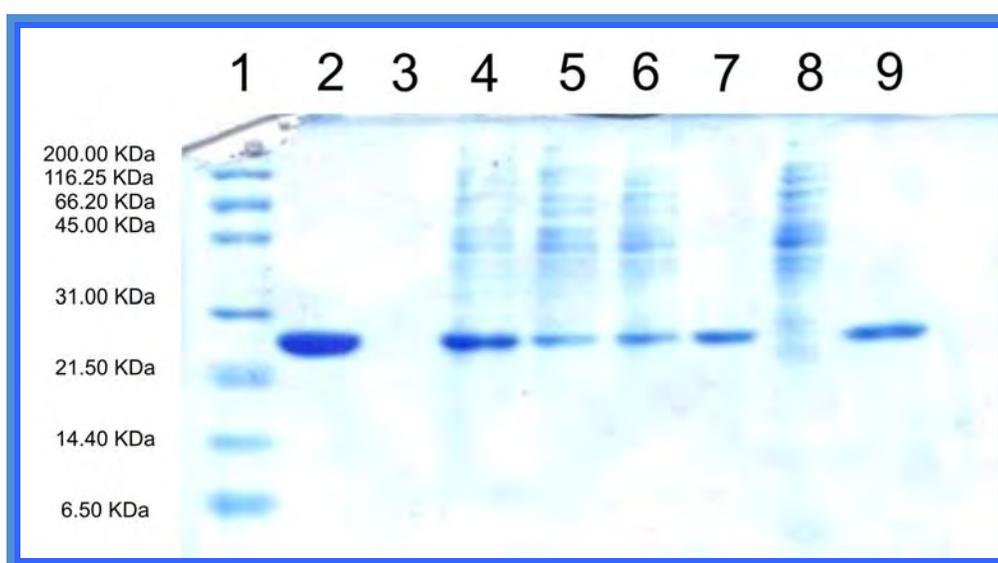


Figura 41. Purificación de la TcTIM 1,4;TbTIM 2,3,5-8 (Gel SDS-PAGE 16% sistema tipo Von.Jagow). Carril 1.- Marcador SDS-PAGE Broad Range Bio-Rad. Carril 2.- TIM silvestre pura. Carril 3.- Vacío. Carril 4.- Extracto total (al romper las células). Carril 5.- Sobrenadante del extracto total. Carril 6.- Sobrenadante diluido. Carril 7.- Fracciones columna 1 (fracciones 20 a 26 columna de intercambio ionico SP Sepharose). Carril 8.- Fracciones no unidas a la columna 1. Carril 9.- LaTcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8 precipitada con sulfato de amonio.

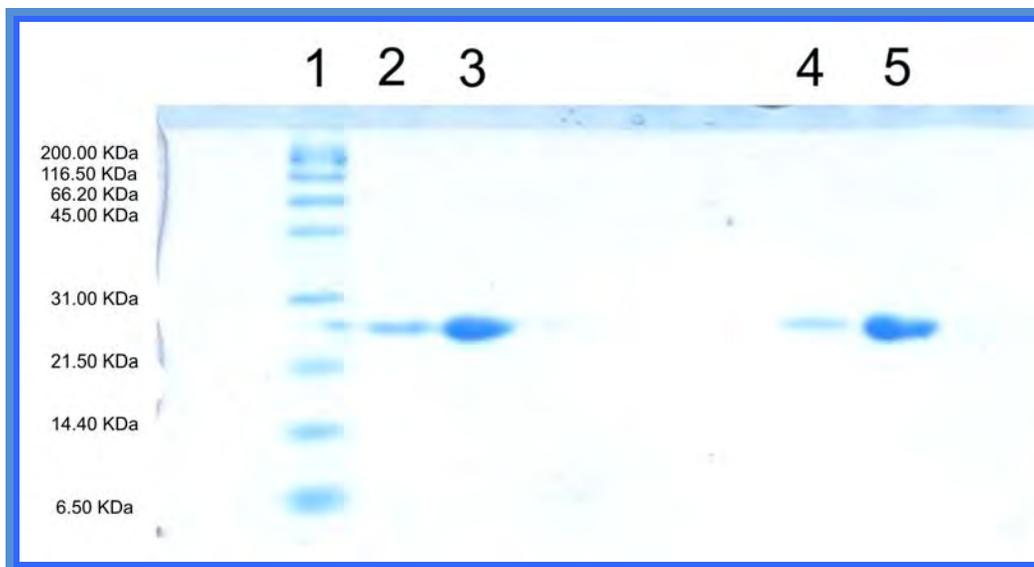


Figura 42.- Purificación de la TcTIM 1,4; TbTIM 2,3,5-8 (Gel SDS-PAGE 16% sistema tipo Von-Jagow). Carril 1.- Marcador SDS-PAGE Broad Range Bio-Rad. Carriles 2 y 3.- TIM silvestre pura (TbTIM). Carril 4.- Fracciones colectadas de la columna hidrofóbica butyl toyopearl. Carril 5.- TcTIM 1,4; TbTIM 2,3,5-8 concentrada.

7.6. Determinación de la actividad catalítica de TcTIM1, 4; TbTIM2, 3, 5-8

Se determinó la actividad específica en cada una de las muestras tomadas durante el proceso de purificación. La tabla 12 muestra el cuadro de purificación de la enzima.

Durante la realización de otros ensayos se cuantificó la actividad específica de la proteína y, en promedio para este lote, la actividad obtenida fue de aproximadamente 4500 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$.

Tabla 12.- Cuadro de purificación de la TcTIM1,4;tbTIM2,3,5-8.

Muestra	Proteína total (mg)	Actividad específica $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	Actividad Total $\mu\text{mol}/\text{min}$	Rendimiento (%)
Lisado celular	1000.8	245.8	1930070	100
Sobrenadante (NaCl)	308.9	624.77	818693	30.86
Pastilla (NaCl)	8.6	9545.55	26604	0.8
Lo que no se pegó (1er columna)	3.6	7.39	16580	0.36
1er columna	81.015	1994.45	161580	8.0
2da columna	74.66	7762.23	57952809	7.4

A partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína se realizó el cálculo de algunos parámetros físicos con ayuda del programa “**prot param**” disponible en el servidor Expsy. En la tabla 12 se muestran dichos datos.

Tabla 13.- Parámetros físico-químicos de la TcTIM1,4;TbTIM 2,3,5-8 obtenidos en el servidor Expasy.

	<i>Parámetros Q14Tb</i>	<i>Parámetros de TbTIM</i>
<i>P.Isoeléctrico teórico</i>	<i>8.34</i>	<i>9.9</i>
<i>Coefficiente de extinción ($M^{-1}cm^{-1}$)</i>	<i>1.340</i>	<i>1.30</i>

Aparentemente el coeficiente de extinción molar de la proteína se conserva, es decir, no varía mucho con los obtenidos para las enzimas silvestres. Sin embargo, el punto isoeléctrico, varía un poco con respecto al observado para TbTIM.

7.7. Estabilidad de TcTIM1, 4; TbTIM 2, 3,5-8

La estabilidad de la enzima se probó incubándola a diferentes concentraciones y a dos diferentes temperaturas. Cuando la enzima fue incubada a 25 °C se observó que, conforme aumenta la concentración de la proteína, ésta es más estable. A concentraciones mayores de 350 µg/mL la proteína conserva el 80% de su actividad inicial (Figura 43). Esto difiere de cuando se incubaba a 36 °C en donde, desde un principio (primeros 20 min), la proteína pierde casi un 40% de su actividad inicial. Otra particularidad observada es que al aumentar la concentración de la enzima (a concentraciones mayores a 350 µg/mL), esta comienza a precipitar por la acción del calor por lo que los resultados obtenidos a esas concentraciones son poco reproducibles (Figura 44). Para la cuantificación de la actividad específica se realizaron dos diluciones: la primera que se hizo fue para obtener una concentración del orden de 2×10^{-3} mg/mL y la segunda para obtener 5×10^{-6} mg/mL en la celda de reacción.

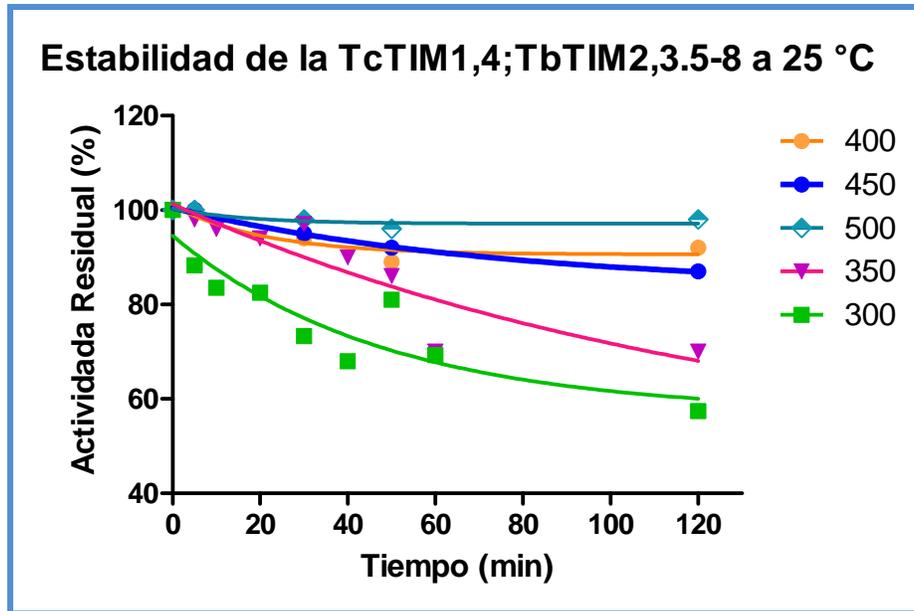


Figura 43. Estabilidad de la enzima incubada a 25°C. En cian se observa a la muestra incubada a 500 µg/mL, naranja 400 µg/mL, en azul oscuro la muestra incubada a 450 µg/mL, en morado a la muestra incubada a 350 µg/mL y en verde a la muestra incubada a 300 µg/mL.

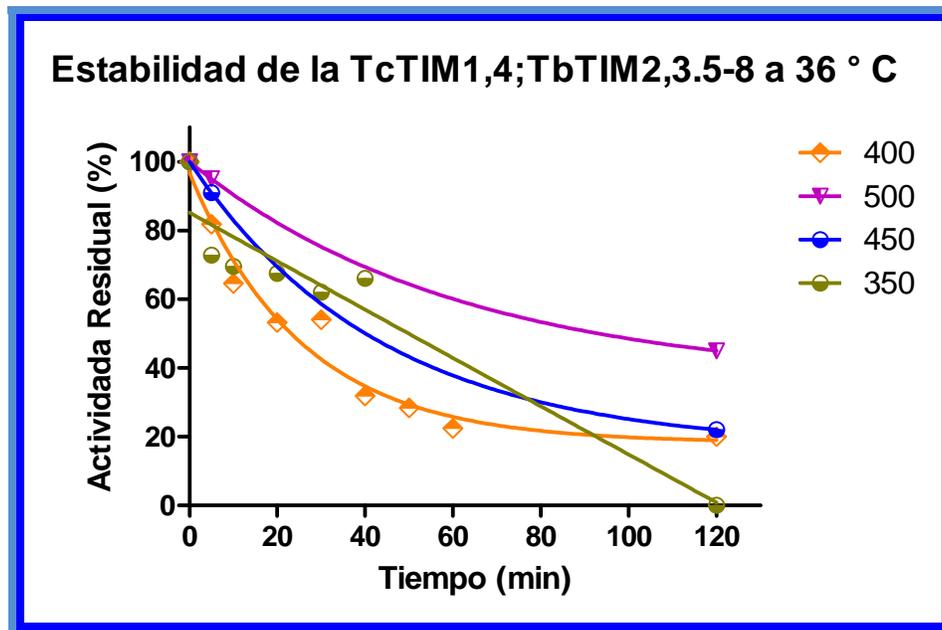


Figura 44. Estabilidad de la enzima incubada a 36°C. Al incubar la proteína a 36 °C la enzima comienza a precipitar, por lo que los datos no resultan ser muy confiables ya que la pérdida de la actividad puede deberse a la disminución de la concentración de la enzima. En morado se observa a la muestra incubada a 500 µg/mL, naranja 400 µg/mL, en azul la muestra incubada a 450 µg/mL y en verde olivo a 350 µg/mL.

7.8. Caracterización cinética de la TcTIM1, 4; TbTIM2, 3,5-8

Para determinar las características cinéticas de la quimera TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8 se hicieron tres ensayos independientes, ajustados al modelo Michaelis – Menten (Figura 45). Mediante una regresión no lineal se obtuvieron los valores de V_{\max} y K_m (Tabla 13).

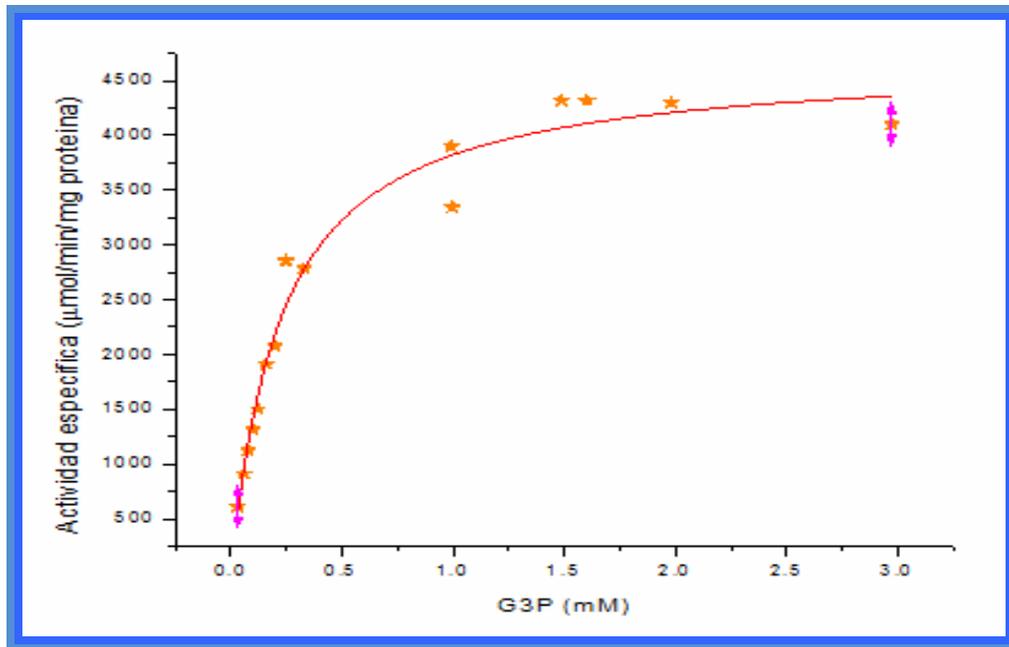


Figura 45.- Determinación de los parámetros cinéticos de la proteína quimérica. Al graficar la actividad específica de la enzima con respecto a las diferentes concentraciones de G3P se observa que la enzima posee un comportamiento que se ajusta al modelo Michaelis-Menten.

Tabla 14.- Parámetros cinéticos de la TcTIM1,4;TbTIm2,3,5-8.

Ecuación $y=Pi*x/(P2+x)$		
Ajuste (r^2) = 0.9806		
Parámetro	Valor	Error estándar.
K_m	0.2603	0.0233
V_{\max}	4732.5769	131.5828

7.9. Efecto de los compuestos derivatizantes de los grupos sulfhidrilo (inactivación por MMTS).

En la Figura 46 puede observarse que la TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8 resultó ser más sensible al efecto del MMTS que TbTIM, desde los primeros minutos de incubación se observa una pérdida de cerca del 30% de su actividad a concentraciones de MMTS 20 μM mientras que a concentraciones de 40 μM se observa la pérdida del 50%. Si bien la TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8 adquirió cierto grado de sensibilidad hacia el MMTS este no fue igual al que presenta TcTIM.

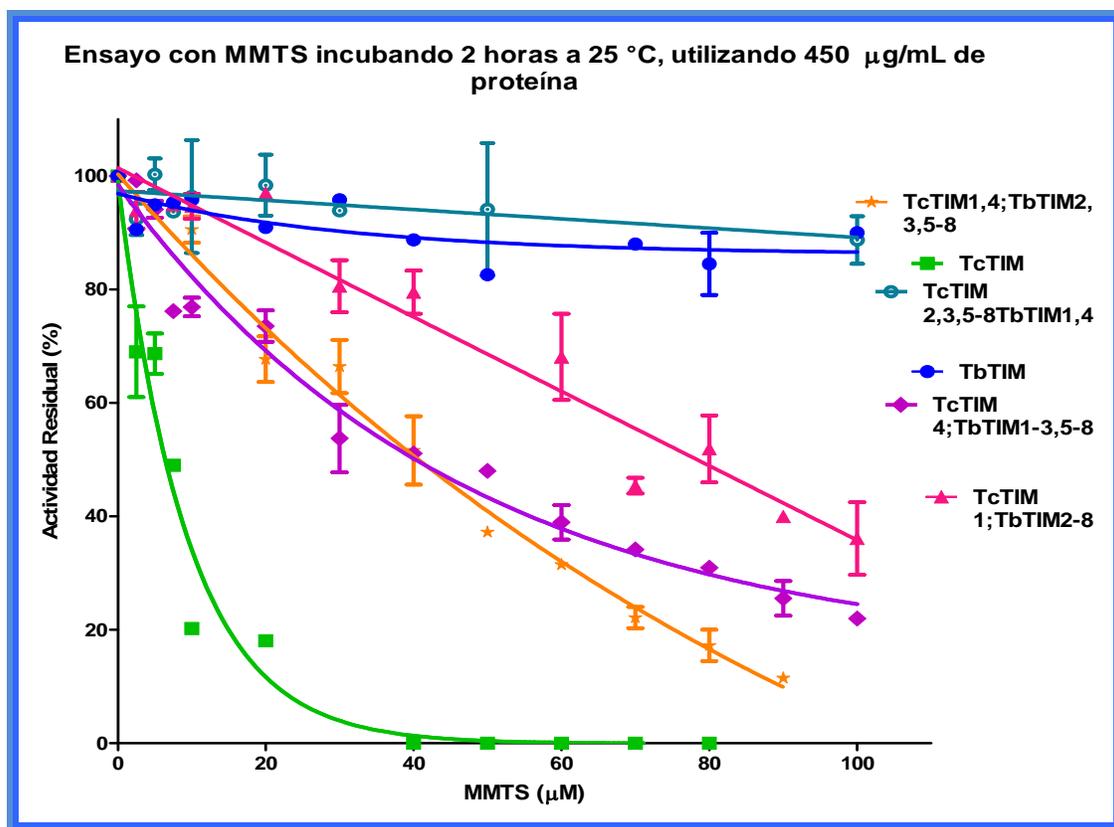


Figura 46.- Curvas de inactivación por efecto del MMTS de algunas quimeras y enzimas silvestres. Las enzimas fueron incubadas a una concentración 450 $\mu\text{g/mL}$ durante dos horas a 25 °C en amortiguador TE con diferentes concentraciones de MMTS.

En el trazo obtenido para la quimera TcTIM4,TbTIM1,3,5-8 (color fucsia Figura 46) puede observarse el efecto producido por el cambio de la región 4, está es más sensible al MMTS que TbTIM, sin embargo, su efecto es más drástico en bajas concentraciones del desnaturalizante. Por otro lado el efecto producido por el cambio de la región 1 se observa en concentraciones altas de MMTS (en concentraciones bajas la quimera es más resistente al efecto del desnaturalizante). La quimera TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8 parece comportarse como una combinación del efecto producido durante el cambio de ambas regiones, ya que a bajas concentraciones de MMTS esta se comporta como la TcTIM4;TbTIM1-3,5-8, mientras que a altas concentraciones es mucho más sensible. El aumento de sensibilidad a altas concentraciones probablemente es resultado directo de la influencia de la región 1.

7.10 . Determinación de las propiedades espectroscópicas

7.10.1. Dicroísmo circular

EL dicroísmo circular es una técnica espectroscópica la cual nos permite monitorear la estructura secundaria de las proteínas. En este caso fue utilizada con el fin de saber si la mutante presentó alguna variación en su estructura, es decir, para averiguar la integridad de la estructura secundaria. En la Figura 47 se muestra el espectro obtenido para las quimeras TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8, TcTIM2,3,5-8;TbTIM1,4 y las enzimas silvestres. Las señales que presenta el espectro de dicroísmo circular reflejan las señales de la estructura secundaria correspondiente a un motivo estructural barril α/β . Por lo tanto, se observan tres señales diferenciadas: una señal negativa en 222 nm, otra entre 208 y 210 nm y una señal positiva entre 190 y 195 nm. En general no se observaron diferencias significativas entre las estructuras secundarias de las proteínas.

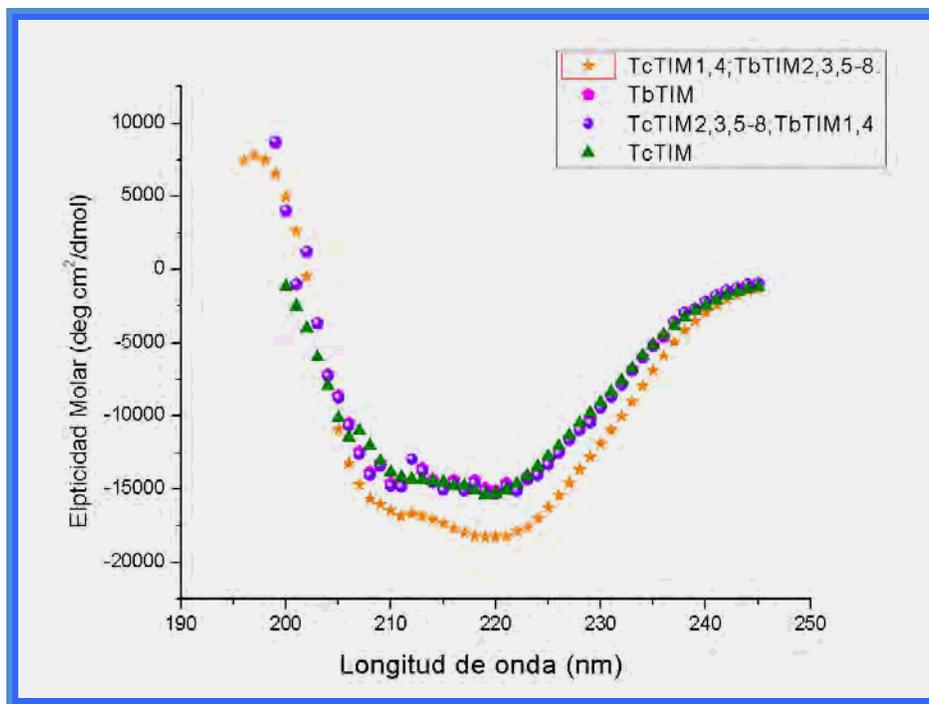


Figura 47. Espectro de dicroísmo circular de TbTIM, TcTIM, TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8 y TcTIM2,3,5-8;TcTIM1,4. Los ensayos se realizaron a 25°C en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.4. La concentración utilizada de la enzima durante cada ensayo fue de 200 $\mu\text{g/mL}$

7.10.2. Desnaturalización térmica

El patrón de desplegamiento térmico de las mutantes TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8, TcTIM2,3,5-8;TbTIM1,4 y de las enzimas silvestres se monitoreó mediante dicroísmo circular (222 nm) (Figura 48). A partir de estos datos los valores de ΔT_m aparente fueron calculados mediante una regresión sigmoïdal (utilizando la función de Boltzman) en el programa Origin 8.0 (Figura 49). En la tabla 15 se muestran los valores calculados de la ΔT_m aparente. En donde puede observarse el efecto drástico que se produce al realizar la mutación de las regiones 1 y 4 en TcTIM y TbTIM. Cuando a TcTIM se le colocan las regiones 1 y 4 de TbTIM, su ΔT_m aumenta de forma importante, incluso resultó ser mucho más resistente que las enzimas silvestres. A diferencia de la mutante de TbTIM cuando se le adicionan las regiones 1 y 4 de TcTIM en donde se observa un nivel de afectación importante.

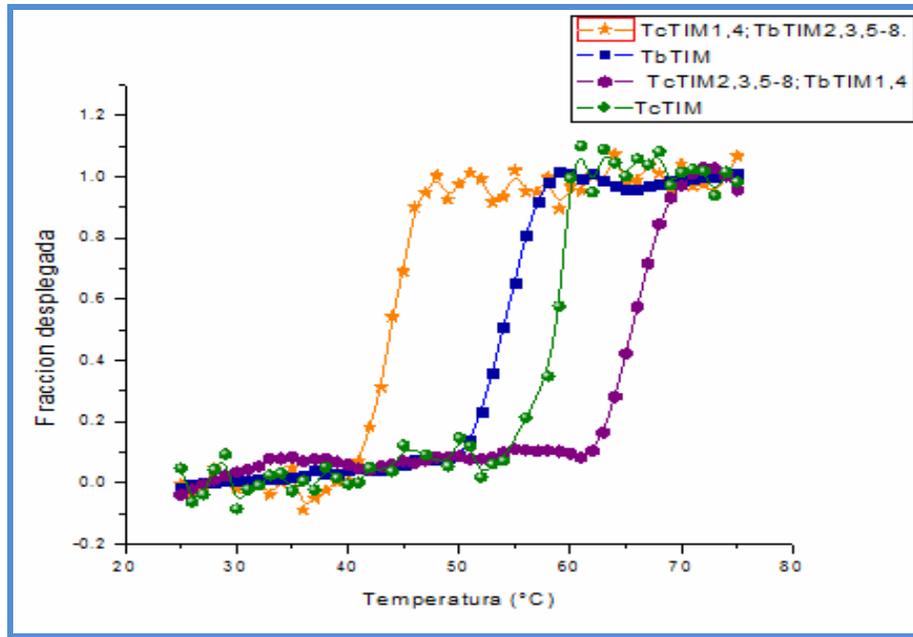


Figura 48. Curvas de desnaturalización térmica seguidas por dicroísmo circular (222nm). La temperatura fue monitoreada en el rango de 25 a 75°C, el amortiguador utilizado fue de fosfatos 10 mM a pH 7.4. La concentración de enzima utilizada fue de 200 µg/mL.

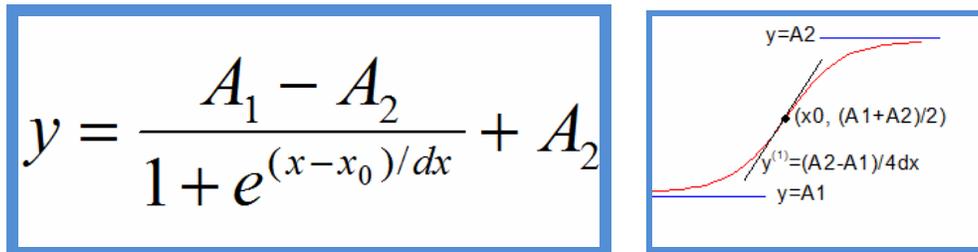


Figura 49.- Ecuación de Boltzman. El valor de x_0 representa el valor de la T_m aparente.

Tabla 15. ΔT_m calculadas para cada enzima .

Enzima	ΔT_m Aparente (°C)	Error estándar (°C)
TbTIM	53.93	0.0772
TcTIM	58.64	0.1422
TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8.	43.76	0.1098
TcTIM2,3,5-8;TbTIM1,4	65.78	0.1198

8. DISCUSIÓN

TcTIM y TbTIM poseen un elevado grado de similitud. Ambas enzimas presentan semejanzas importantes pero tienen una gran diferencia de comportamiento ante diversos agentes que afectan la catálisis enzimática. En nuestro grupo de investigación se han explorado varias regiones de TbTIM y TcTIM a fin de encontrar los aminoácidos responsables de estas diferencias. En trabajos realizados anteriormente, se demuestra la existencia de dos regiones implicadas en el cambio de susceptibilidad ante compuestos derivatizantes de grupo sulfhídrico, específicamente ante el MMTS (García-Torres I., en preparación) estas regiones se han llamado uno y cuatro. Cuando se realiza el cambio de estas dos regiones en TcTIM por sus equivalentes en TbTIM, sus parámetros cinéticos cambian drásticamente de tal modo que TcTIM se comporta como una TbTIM cuando es enfrentada al MMTS (es decir, una TcTIM pasa de ser sensible al MMTS a ser resistente como TbTIM) (García-Torres I., en preparación). El propósito del presente trabajo fue continuar con la investigación de estas dos regiones.

La quimera TcTIM_{1,4};TbTIM_{2,3,5-8} fue construida en base a reacciones de PCR. La clonación de la secuencia de nucleótidos fue exitosa (Figura 36 y 37). La enzima no presentó ningún problema de sobreexpresión e incluso mostró un comportamiento tipo enzima silvestre. Al ser inducida a 37°C presentó una buena producción de proteína; sin embargo, cuando las células se indujeron a 30°C la producción de la enzima se vio favorecida (Figura 38). Al realizar la ruptura celular utilizando amortiguadores con diferente contenido de NaCl, no se observó diferencia significativa en la cantidad de proteína soluble, lo cual implica que, en este aspecto, la mutante presenta un comportamiento similar al de TcTIM (pues TcTIM mayoritariamente produce a la enzima soluble, mientras que TbTIM, tiende formar agregados de proteína en la membrana).

Al realizar la purificación de la proteína, ésta prácticamente se encuentra pura al salir de la columna de intercambio iónico (Figura 41), sin embargo, se decidió

continuar con el cuadro de purificación tradicional (estandarizado para la purificación de las enzimas silvestres) para evitar la posible presencia de contaminantes no detectados con facilidad en una tinción tradicional con azul de Coomassie. La segunda columna utilizada fue de tipo hidrofóbica. Al pasar la proteína a través de esta columna se observó una mayor interacción con la resina, ya que requirió un volumen extra de amortiguador libre de sales para lograr su elución. En esto difirió de las enzimas silvestres, las cuales eluyen a bajas concentraciones de sulfato de amonio. Como se menciona en el apéndice A la cromatografía hidrofóbica se basa en la interacción de los grupos hidrófobos de la muestra con las cadenas alifáticas de la resina. En presencia de elevadas concentraciones de sulfato de amonio el agua prácticamente es eliminada de las cercanías en el ambiente de la enzima lo cual permite la exposición de los aminoácidos hidrofóbicos de la proteína para su interacción con la resina; al disminuir la cantidad de sales, la proteína vuelve a ocultar estos aminoácidos provocando su desprendimiento o elución. Tomando en cuenta lo anterior la quimera parece tener algunos problemas para reagrupar a estos residuos tras la disminución de la concentración de sales, o simplemente parece necesitar una mayor cantidad de tiempo para poder llevarlo a cabo. Se ha observado que TbTIM posee una estructura mucho más rígida que la de TcTIM, por lo que este proceso es más lento e ineficiente (por ejemplo en la reactivación a partir de monómeros desplegados por agentes caotrópicos como el clorhidrato de guanidina) y, debido al grado de identidad que la mutante posee con TbTIM, parece que este comportamiento puede ser resultado de esta semejanza (Zomosa-Signoret V., *et al.*, 2003).

Al realizar la cuantificación de la actividad enzimática, la proteína mostró un comportamiento de inestabilidad hacia la dilución por lo que requirió ser incubada a una concentración 90 veces mayor que una enzima silvestre para conservar su actividad. También mostró un decaimiento de su actividad de aproximadamente un 10% cuando la muestra se incubaba a 25°C durante dos

horas. El valor de K_m obtenido fue un 50% menor al reportado para las enzimas silvestres, mientras que su capacidad catalítica (k_{cat}) es muy parecida al valor reportado para TcTIM. Además, el valor de la V_{max} no varió con respecto al obtenido para las enzimas silvestres. Ciertamente, este comportamiento no se ha observado con otras quimeras.

Como se mencionó anteriormente, el MMTS actúa sobre los grupos sulfhídrico formando el derivado metil disulfuro. Los grupos sulfhídrico en un polipéptido se encuentran en residuos de aminoácidos como las cisteínas y las metioninas. Las TIMs de algunos parásitos poseen una cisteína en la posición 14, la cual se encuentra altamente conservada y se encuentra muy involucrada en la estabilización del dímero ya que protege a uno de los residuos encargados de la catálisis (lisina 13). Las TIMs que no poseen una cisteína en esta posición (14) son completamente insensibles a la acción del MMTS como la TIM de humano la cual tiene una metionina en la misma posición (Garza-Ramos G., *et al.*, 1998). Al realizar una mutante de la TIM de humano, sustituyendo la metionina por glutamina en la posición 14 se observó la importancia que posee este residuo para la estabilidad de la enzima (Manfroid V., *et al.*, 1996, Garza-Ramos G., *et al.*, 1998, Ávila-Ríos S., 2001). Si bien la mutante TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8 resultó ser más sensible al MMTS que TbTIM, esta no presentó el mismo grado de susceptibilidad que TcTIM.

La TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8 se encuentra compuesta por la mayoría de las regiones de TbTIM, las únicas diferencias que posee con respecto a la enzima silvestre son las regiones 1 y 4, las cuales son equivalentes a las de TcTIM. Existen en total 13 diferencias en la región 1 de ambas enzimas y 5 diferencias en la región 4. Una de las diferencias notables en la región 1 es la existencia de una glutamina en la posición 18 en TbTIM y un ácido glutámico en la misma posición en TcTIM. Esta variación en los residuos de ambas produce un cambio importante en el ambiente de la enzima. La posición 18 se sitúa al inicio de la alfa-hélice uno; la

presencia de una glutamina en vez de un ácido glutámico genera un decremento importante en los contactos de la hélice 1 y la hélice 3 de la otra subunidad (Maldonado E., *et al.*, 1998). Otra de las diferencias relacionadas a la región 1 es la existencia de una prolina en la posición 24 en TcTIM la cual provoca un arreglo poco común en la hélice produciendo un cambio en la altura de la vuelta de la hélice haciéndola 1.2 Å más larga que la equivalente en TbTIM (Maldonado E., *et al.*, 1998) generando una posición más abierta, lo cual podría explicar el por que TcTIM es mucho más sensible a la acción del MMTS, pues la apertura en la hélice y el cambio de interacciones permiten un mejor acceso del MMTS en TcTIM.

A pesar que la TcTIM_{1,4};TbTIM_{2,3,5-8} se encuentra compuesta mayoritariamente por TbTIM, ésta pasó de ser resistente a la acción del MMTS (comportamiento típico de TbTIM) a sensible al MMTS, sin embargo, los cambios no fueron tan críticos como para adquirir el comportamiento tipo TcTIM. De algún modo la región 1 se encuentra muy involucrada con este cambio de comportamiento tal como lo mencionó Maldonado E., *et al.* 1998. Sin embargo, también se cuenta con la contribución de la región 4. En esta región existen solo 5 diferencias, de las cuales tres de ellas no presentan homología entre sí. La naturaleza de estos cambios, en dos de los tres residuos implicados, es de tipo aminoácido alifático por aminoácido neutro con sustituyentes polares, lo cual podría implicar una diferencia importante en la disposición de estos residuos en la proteína. Generalmente los residuos con sustituyentes alifáticos o no polares se disponen en el interior de la enzima alejándose de la toda interacción con grupos polares, grupos cargados o agua. Cuando se cambian éstos residuos por aquellos con cadenas polares esta repulsión al medio podría verse disminuida, de tal modo que sus cadenas quizás puedan disponerse al exterior. Así pues la exposición de estos grupos polares al medio podría permitir la formación de nuevos contactos que estabilicen a la proteína mediante la formación de interacciones débiles como interacciones de Van

der Waals, puentes de hidrógeno o puentes salinos. Si bien, este tipo de interacciones son de tipo débil, la presencia de muchas de ellas da como resultado una estructura altamente estable. Es por ello que existe la posibilidad que la mutación de las regiones 1 y 4 genere nuevas interacciones o simplemente desaparezcan algunas. Con base en los estudios realizados por Maldonado E., *et al*, 1998 y García-Torres I., en preparación se sabe que la región 1 se encuentra implicada en el cambio de susceptibilidad, al igual que la región cuatro. Es importante considerar que cada uno de los cambios producidos generan variaciones en la estructura global de la proteína de tal modo que no conocemos el grado de afectación de la proteína debido a estos cambios. Por lo que, quizás, el cambio en las interacciones de estas regiones (1 y 4) con las otras podrían ser las responsables del por que la mutante no fue tan sensible al MMTS como TcTIM.

La estructura de la enzima seguida por dicroísmo circular (Figura 47) presenta un espectro característico de una proteína con motivo α/β . Aparentemente, no se observa diferencia significativa entre los datos obtenidos para la quimera y los obtenidos para las enzimas silvestres por lo que puede considerarse que el estado nativo de proteína se conserva.

Al observar los datos obtenidos del ensayo de estabilidad térmica seguida por dicroísmo circular vemos que existe una diferencia importante entre los datos de T_m obtenidos para la TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8, la TcTIM2,3,5-8;TbTIM1,4 y las enzimas silvestres. Existe una diferencia de 10.17 °C en la T_m de la TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8 con respecto a TbTIM, 14.88 °C con respecto al valor obtenido para TcTIM y 22.02°C con respecto al valor obtenido para la TcTIM2,3,5-8;TbTIM1,4. Lo anterior está en concordancia con los resultados del ensayo de estabilidad a la temperatura (Figura 48). Mientras, la TcTIM2,3,5-8;TbTIM1,4 presentó un comportamiento totalmente contrario ya que su T_m se encuentra por arriba de los valores reportados para las enzimas silvestres. Se

sabe que las interacciones de tipo electrostático favorecen la estabilidad de las proteínas de organismos termofílicos y son muy importantes en las enzimas de parásitos humanos (Cooper A., 2000; Gromiha M., 2001; Bosshard H., *et al.*, 2004). Generalmente, la energía asociada a este tipo de interacciones no depende directamente del número de residuos ionizables y pares iónicos disponibles en la proteína, más bien esta depende de la localización de este tipo de grupos dentro de la estructura. Así pues, aquellos grupos cargados que se encuentran dispuestos al interior de la proteína desestabilizan la estructura y aquellos dispuestos al exterior de la enzima pueden generar interacciones favorables con otros grupos cargados (Gromiha M., 2001). Por esto podemos suponer que el cambio de los residuos en las regiones 1 y 4 pudo de alguna manera generar cambios importantes en las interacciones de tipo electrostático. Se sabe que existe una correlación directa entre la termoestabilidad de la enzima y el número de interacciones tipo puente de hidrógeno presentes en su estructura; así pues, entre mayor sea la superficie polar, mayor estabilidad presenta (Gromiha M., 2001). Si bien la mutante no posee una gran cantidad de cambios en su secuencia de aminoácidos, algunos de los residuos pueden encontrarse muy involucrados en el establecimiento de este tipo de interacciones, un ejemplo importante es aquel que se mencionó en el trabajo de Maldonado E., *et al.*, 1998 en donde el cambio de solo un par de aminoácidos conduce a la variación de los contactos con algunas otras partes de la enzima como las hélices 1 y 3, modificando así la naturaleza de la enzima.

Finalmente, ante la duda, es necesario considerar la posibilidad de realizar estudios estructurales más profundos a fin de identificar con exactitud aquellos residuos o regiones implicados en el cambio de comportamiento de la TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8 frente al MMTS.

9. Conclusión.

Si bien el cambio de las regiones 1 y 4 de TbTIM por sus equivalentes en TcTIM no generó los resultados esperados, si mostró una buena aproximación de tal modo que la quimera TcTIM1,4;TbTIM2,3,5-8 adquirió una sensibilidad importante, aunque no total, al MMTS. Por lo que podemos sospechar que existen otras regiones o residuos de aminoácidos relacionados con esta diferencia.

10. Perspectivas

Las diferencias de comportamiento ante el MMTS relacionadas con el cambio de las regiones 1 y 4 en la quimera no generaron la respuesta esperada pero, si mostraron una diferencia significativa en la estabilidad de la proteína, particularmente a la temperatura. A fin de explorar el cambio de estabilidad sería interesante generar un cristal de la quimera, para así explorar los cambios de interacciones generados por la mutación y así poder elucidar o descubrir otros aminoácidos potencialmente relacionados, no solo con la estabilidad de la proteína, sino también con otros parámetros.

Continuar con la búsqueda de regiones u aminoácidos relacionados con el cambio de susceptibilidad ante el MMTS mediante la generación de nuevas mutantes basados en cambios de interacciones.

Bibliografía

- Ávila-Ríos S., (2001) Purificación y caracterización de las triosafosfato isomerasas mutantes de humano y levadura con una cisteína en la posición 14. Tesis de licenciatura en Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México D.F.
- Albert T., Banner D., Bloomer A., Petsko G., Phillips D., River P., Wilson I. (1981) On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of triose phosphate isomerase. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* **293**: 159-171.
- Bakker M., Michels P., Opperdoes F., Weserhoff H. (1999) What Controls Glycolysis in Bloodstream Form *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 14551-14559.
- Bosshard H.R., Marti D.N., Jelesarov I. (2004) Protein stabilization by salt bridges: concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings. *Journal of Molecular Recognition* **1**:1-16.
- Cazzulo J. (1992) Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **6**:3153-3161.
- Cooper A. (2000) Heat capacity of hydrogen-bonded networks: an alternative view of protein folding thermodynamics. *Biophysical Chemistry* **85**: 25-39.
- Cox F.E.G., Kreier J.P., Wakelin D. (1998) Parasitology Vol. 5. en Topley y Wilson's microbiology and microbial infections. London Arnold.
- Davenport R., Bash P., Santon B., Karplus M., Petsko G., Ringe D. (1991) Structure of the Triosephosphate Isomerase-Phosphoglycolohydroxamate Complex: An Analogue of the Intermediate on the Reaction Pathway. *Biochemistry* **30**: 5821-5826.

- De Souza W. (2009) Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* **104** : 89-100.
- Eisenthal R., Cornish-Bowden A. (1998) Prospects for Antiparasitic Drugs The case of *Trypanosoma brucei*, the causative agent of African sleeping sickness. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 5550-5505.
- Farber G.K., Petsko G.A. (1990) The evolution of α/β barrel enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* **6**: 228-234.
- Fèvre E., Wissmann B., Welburn S., Lutumba P. (2008) The Burden of Human African Trypanosomiasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2**: 1-7.
- García Torres I. (2006) Producción y caracterización de una Triosafosfato Isomerasa de *Trypanosoma brucei* con la interfase de la Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México D.F.
- García Torres I. (en preparación) Quimeras de la triosafosfato isomerasa: transformación progresiva de la triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* en la triosafosfato isomerasa de *T. brucei*. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México D.F.
- Garza-Ramos G., Cabrera- González N., Saavedra-Lira E., Tuena de Gómez-Puyou M., Ostoa-Saloma P., Pérez-Montfort R., Gómez-Puyou A. (1998) Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *European Journal of Biochemistry* **253** : 684-691.
- Gómez-Puyou A., Saavedra-Lira E., Becker I., Zubillaga R.A., Rojo-Domínguez A, Pérez-Montfort R. (1995) Using evolutionary changes to

achieve species-specific inhibition of enzyme action-studies with triosephosphate isomerase. *Chemistry and Biology* **12**:847-55

- Gromiha M. (2001) Important inter-residue contacts for enhancing the thermal stability of thermophilic proteins. *Biophysical Chemistry* **91**:71-77.
- Helfert S., Estévez A.M., Bakker B., Michels P., Clayton C. (2001) Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biochemistry* **357**: 1317-1325.
- Hernández-Alcántara G., Garza-Ramos G., Mendoza-Hernández G., Gómez-Puyou A., Pérez- Montfort R. (2002) Catalysis and Stability of triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface Characterization. *Biochemistry* **41**: 4230-4238.
- Knowles J.R. (1991) Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* **6314**: 121-124.
- Legros D., Gaëlle O., Gastellu-Etchegorry M., Paquet C., Burri C., Jannin J., Büscher P., (2002) Treatment of human African trypanosomiasis present situation and needs for research and development sleeping sickness research agenda personal view. *THE LANCET infectious Disease* **2**: 437-440.
- Lolis E., Alber T., Davenport R.C., Rose D., Hartman F.C., Petsko G.A. (1990) Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry* **28**:6609-6618.
- Maldonado E., Soriano M., Moreno A., Cabrera N., Garza G., Tuena 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. *Journal of Molecular Biology* **283**:193-203.

- Mainfroid V., Terpstra P., Beaugard M., Frère J.M., Mande S.C., Hol W.G., Martial J.A., Goraj K. (1996) Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimer. *Journal of Molecular Biology* **2**:441-56.
- Matsuda M., Steven M., Paulo R. (2009) The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas diseases . *CLINICS* **64**: 1219-1224.
- Misset O., Bos O.J., Opperdoes F.R. (1986) Glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei* simultaneous purification, intragluosomal concentration and physical properties. *European Journal of Biochemistry* **157**:441-453.
- Olivares-Illana V., Pérez-Montfort R., López-Calahorra F., Costas-Basin M., Rodríguez-Romero A., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A. (2006) Structural differences in Triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitypanosomatid inhibitor. *Biochemistry* **45**:2556-2560.
- Pérez de Ayala-Balzola A., Pérez-Molina J., Navarro-Beltrá M., López-Velez R. (2009) Enfermedad de Chagas en personas procedentes de Latinoamérica residentes en España. *Ministerio de sanidad y política social Madrid, España* p.p. 1-84.
- Reyes-Vivas H., Martínez-Martínez E., Mendoza-Hernández G., López-Velázquez G., Pérez-Montfort R., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A. (2002) Susceptibility to proteolysis of Triosephosphate Isomerase from two pathogenic parasites: Characterization on an Enzyme with an interaction on a nicked monomer. Protein structure, function, and Genetics. *Proteins* **48**: 580-590.
- Rozovsky S., McDermott A. (2001) The Time Scale of the catalytic Loop motion in Triosephosphate isomerase. *Journal of Molecular Biology* **310**: 259-270.
- Servidor Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)
- Servidor Expasy prot param.

- Smith D.J., Maggio E.T., Kenyon G.L. (1975) Simple Alkanethiol groups for temporary blocking of sulfhydryl groups of enzymes. *Biochemistry* **14**:766-771.
- Soares M y De Souza W. (1998) Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a Cytochemical and stereological study. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* **2**:349-61.
- Teixeira A., Nitz N., Guimaro C., Gomes C., Santos-Buch C.A . (2006) Chagas disease. *Postgraduate Medical Journal* **82**: 788-798
- Tellez-Valencia A., Ávila-Ríos S., Pérez-Montfort R., Rodríguez-Romero A., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A. (2002) Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **295**:958-963.
- Tielens A., Van Hellemond J. (1998) Differences in energy metabolism between Trypanosomatidae. *Parasitology Today* **14**: 265-271.
- TosohBioscience fundamento de la cromatografía de interacción hidrofóbica
<http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/ServiceSupport/TechSupport/ResourceCenter/PrinciplesofChromatography/HydrophobicInteraction/>
- Van Hellemond., Hoek A., Wichgers P., Chupin V., Ozdirekcan S., Geysen D., Grinsven K., Koets A., Van den Bossche P., Geerts S y Tielens A. (2007) Energy Metabolism of Bloodstream Form *Trypanosoma theileri*. *American Society for Microbiology* **9**: 1693–1696.
- Verlinde C.L.M.J., Hannaert V., Blonski C., Wilson M., Périé J.J., Fothergill-Gilmore L.A., Opperdoes F.R., Gelb M.H., Hol W.G.J.,Michels P.A.M. (2001) Glycolysis as a target for design of new anti-trypanosome drugs. *Drug resistance updates* **4**: 1-14.
- Wierenga R.K., Noble M.E., Vriend G., Nauche S., Hol W.G. (1991) Refined 1.83 Å structure of Trypanosomal Triosephosphate isomerase

crystallized in presence of 2.4 M Ammonium sulphate. A comparison with the structure of Trypanosomal Triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *Journal of Molecular Biology* **220**: 995-1015.

- WHO. Chagas disease (2006)
<http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/chagas>
- WHO Control and surveillance of African trypanosomiasis. (2006)
<http://www.who.int/health-topics/afrtryps.htm>
- Zomosa-Signoret V., Hernández-Alcantara G., Reyes-Vivas H., Martínez-Martínez E., Garza-Ramos G., Pérez-Montfort R., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A. (2003) Control of the Reactivation Kinetics of Homodimeric Triosephosphate isomerase from Unfolded Monomers. *Biochemistry* **42**: 3311-3318.

Apéndice A

Técnicas utilizadas:

Reacción de PCR

La reacción de PCR es una técnica *in vitro* utilizada para la síntesis enzimática de DNA, utilizando un par de iniciadores (secuencias de oligonucleótidos con secuencia complementaria a la hebra molde) los cuales se hibridan al ADN templado, flanqueando una región específica. Para duplicarse las dos hebras de DNA se separan, obteniendo dos cadenas complementarias, cada una de ellas sirve como molde o plantilla (dando como resultado dos moléculas de DNA). La enzima que se encarga de este proceso es la DNA polimerasa (generalmente se utilizan polimerasas de organismos termófilos como *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus litoralis* (Vent) y *Thermus thermophilus* (Tth). El proceso, generalmente se lleva a cabo en tres etapas. En la primera etapa el DNA templado se incuba a 92-98 °C durante 30-90 segundos, para realizar la desnaturalización (se separan las hebras complementarias) y hacer accesible el apareamiento con las secuencias iniciadoras. La segunda etapa se denomina alineamiento, en donde la muestra se enfría para permitir que los oligonucleótidos presentes se hibriden a las secuencias complementarias del DNA templado. La tercera etapa se lleva a cabo a una temperatura intermedia en la cual la DNA polimerasa construye el DNA flanqueado por los iniciadores, a esta etapa se le denomina extensión. La repetición de ciclos conlleva a la acumulación de las secuencias amplificadas.

Transformación en células competentes.

La transformación consiste en la introducción de material genético externo a bacterias y células eucariontes (no animales) como de hongos o plantas mediante la introducción de plásmidos. La transferencia generalmente se lleva

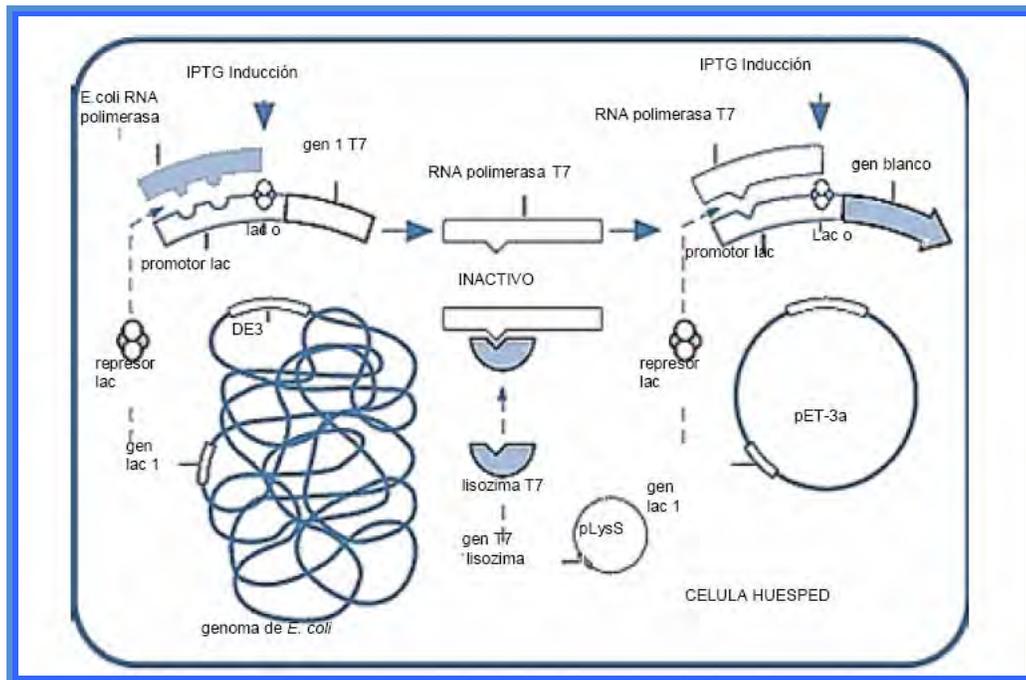
a cabo mediante la apertura de poros en la pared celular de las bacterias y un choque térmico.

Sistema de sobreexpresión empleado por las células de *E.coli*/BL21D3

Lys S.

La cepa de *E.coli*/BL21D3

Lys S posee una copia cromosómica del gen de a RNA polimerasa del fago T7. Específicamente este gen se encuentra bajo el control del promotor LacUV45 que es inducido por IPTG. La cepa, además contiene el plásmido pLys el cual codifica para la lisozima del fago T7 que inhibe a la T7 RNA polimerasa, de tal modo que se puede controlar la expresión del gen clonado en el pET-3a.



Cromatografía.

Para realizar la purificación de proteínas se utilizan diversas técnicas, una de ellas es la denominada cromatografía (en varias de sus modalidades) la cual tiene como objetivo la obtención de la proteína pura, aun cuando se parta del

extracto total (en donde existen miles de proteínas diferentes a la que nos interesa).

En general todos los tipos de cromatografías se basan en el grado de distribución de una sustancia entre dos fases. Para la separación de una mezcla de sustancias, se requiere que cada uno de los componentes posea diferente grado de distribución entre ambas fases. La mayoría de los sistemas de cromatografía consisten en una fase estacionaria (que generalmente es sólida) y una fase móvil (generalmente líquida aunque también existen de tipo gaseoso). La fase líquida fluye a través de la fase estacionaria. Existen varios tipos de cromatografías, en seguida se mencionan las comúnmente utilizadas en la purificación de proteínas:

- Equilibrio de absorción
- Intercambio iónico
- Filtración en gel
- Afinidad

En el caso de las de equilibrio de absorción la cromatografía hidrofóbica es la más comúnmente utilizada. En este tipo de cromatografía, las proteínas con un gran número de los aminoácidos de tipo hidrofóbico, o aminoácidos modificados con algún lípido o compuesto hidrófobo, se distribuyen en la fase móvil. En la filtración en gel la fase estacionaria es un líquido atrapado dentro de la matriz. La cromatografía de intercambio iónico es un proceso que permite la separación de moléculas polares basado en las propiedades de carga de las moléculas (interacciones tipo Coulomb). Las partículas de interés interaccionan con los grupos funcionales (iónicos y con carga opuesta a la muestra) de la fase estacionaria. En base al tipo de fase estacionaria, la cromatografía de intercambio iónico se divide en dos tipos: la de intercambio catiónico e intercambio aniónico. La cromatografía de intercambio catiónico

retiene aquellas partículas cargadas positivamente, por ende la fase estacionaria se encuentra cargada negativamente. La cromatografía de intercambio aniónico detiene a las partículas con carga negativa utilizando una fase estacionaria cargada positivamente.

Cromatografía líquida de desarrollo rápido (FPLC por sus siglas en inglés).

Es un término utilizado para referirse a un tipo de cromatografía líquida en donde la velocidad del solvente (fase móvil) se encuentra controlada por un sistema de bombas. Al igual que en otro tipo de cromatografías, su fase móvil es líquida y su fase estacionaria puede ser un sólido o líquido. El sistema de bombas mantiene un flujo constante de los solventes. El flujo, es controlado a través de una computadora que controla al sistema de bombas.

Apéndice B

Reactivos comerciales utilizados.

QIAprep® Spin Miniprep Kit.

La purificación de ADN plasmídico utilizando en este kit, se basa en la lisis alcalina de células bacterianas seguida de la absorción del ADN en silica, en presencia de una alta concentración de sales. Durante el proceso de purificación no se requiere de la utilización de fenol, cloroformo, cloruro de cesio o bromuro de etidio.

La purificación se lleva a cabo en tres pasos:

1.-Preparación y limpieza del lisado bacteriano: Las células bacterianas portadoras del plásmido, son tratadas con lisozima para debilitar su pared celular y la lisis se completa con duodecil sulfato de sodio (SDS) y NaOH. Finalmente el lisado celular se neutraliza y se ajusta la concentración de sales.

2.-Absorción del ADN en la membrana del QIAprep. Las membranas utilizadas en el kit, son selectivas para la absorción de ADN plasmídico en altas concentraciones de sal; así pues, para la elución del DNA se utiliza un amortiguador bajo en sales.

3.- Lavado y elución del ADN plasmídico. La eficiencia de la elución se alcanza en un rango de pH entre 7 y 8.5.

QIAquick® Gel extracción kit, QIAquick®PCR Purification Kit, QIAquick® Nucleotide Removal kit

El sistema QIAquick® es un método útil para la limpieza y purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa y reacciones enzimáticas. Los amortiguadores incluidos, optimizan la recuperación del ADN removiendo a los contaminantes presentes a través de los pasos de purificación. Al igual que en

el QIAprep® el ADN se absorbe en la membrana de silica cuando se encuentra en presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas dejando así que los contaminantes eluyan. En ADN puro se eluye con agua o amortiguador Tris.

MinElute® PCR purification Kit, MinElute® Reaction CleanupKit.

El sistema minElute® está diseñado para la rápida y fácil purificación de ADN, a partir de reacciones de PCR, reacciones enzimáticas (remueve a todas las enzimas, sin importar tamaño ni estructura secundaria) y a partir de geles de agarosa.

Los diferentes amortiguadores que contiene el sistema optimizan el proceso que se realiza.

El amortiguador PBI es utilizado en la purificación de productos de PCR, este permite una unión eficiente de productos de PCR pequeños (desde 70 pb) en la membrana removiendo así el resto de enzimas u oligonucleótidos remanentes. El amortiguador QG solubiliza a la agarosa y proporciona las condiciones necesarias para la unión del ADN a la membrana de silica.

BCA Protein Assay Kit

BCA es una formulación detergente-compatible basada en la formación de un producto colorimétrico para la cuantificación de proteínas. Este método combina la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} por la proteína, en medio alcalino (reacción de biuret). El método posee alta sensibilidad para la detección de ion cuproso Cu^{1+} proporcionado por la adición del ácido bicinónico (BCA). El compuesto colorido (púrpura) se forma por la quelación del ión cuproso con dos moléculas de BSA. El compuesto colorido absorbe a 562 nm y muestra un comportamiento lineal hasta un rango de 20-2000 $\mu\text{g/mL}$. Los aminoácidos responsables de la formación del compuesto colorido son cisteína, triptófano y

tirosina. La concentración de las muestras generalmente se determina a partir de la de una referencia como la albúmina sérica bovina (BSA).

Resinas utilizadas en la purificación:

Resina para cromatografía de interacción hidrofóbica **ButylToyopearl 650 M**. La resina ButylToyopearl posee una porosidad de aproximadamente 1000 Å. El tamaño promedio de las partículas es de 65 µm. Y la presión máxima que resiste es de 3 Bar. El rango de pH en donde se mantiene estable es de 1 a 13. Es compatible con el uso de solventes orgánicos y su tamaño no varía con las diferentes concentraciones de sales.

La cromatografía de interacción hidrofóbica se fundamenta en la interacción débil de las superficies hidrofóbicas de las proteínas con las superficies hidrofóbicas de la resina en presencia de altas concentraciones de sal. Al disminuir las concentraciones de las sales, las proteínas se van liberando, cuando la concentración de sal es de cero, todos los componentes se liberan.

Resina SP Sepharose 4 Fast Flow

La resina para cromatografía de intercambio iónico utilizada fue la **SP Sepharose 4 Fast Flow**, la cual es una resina catiónica con una capacidad de 0.18-0.25 mmol H⁺/mL. Su estructura se encuentra compuesta por 6% de agarosa entrecruzada y su tamaño se encuentra en un rango de 45-165µm, pero el promedio es de 90µm. La presión máxima de operación es de 0.3 MPa (3 bar, 42psi). Y permanece estable con el uso de cualquier amortiguador con base acuosa, 1 M NaOH, 8 M de urea, 8 M de hidrocloreuro de guanidina y 24% de etanol. Su volumen no varía con los cambios de pH.

La resina SP Sepharose, es un intercambiador de cationes excelente la cual posee muy buenas propiedades de flujo y una amplia capacidad para la unión de proteínas dentro de un amplio rango de puntos isoeléctricos. El grupo funcional de la resina es el sulfopropilo, el cual se mantiene perfectamente

cargado y estable dentro de un amplio rango de pH (pH= 4-13). La elución de la proteína se realiza incrementando la concentración de sales o variando el pH. La regeneración de la columna se lleva a cabo utilizando algún amortiguador con una alta fuerza iónica (1-2 M de NaCl).

Apéndice C

Soluciones utilizadas:

Medio LB Luria Bertani (medio líquido, para un litro)

Bacto triptona 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 10 g

Medio Luria-Bertani sólido

Adicionar con 2% de agar al medio líquido.

Una vez preparado debe esterilizarse en autoclave (121 °C y 15 pulgadas /cm²)

Antibióticos:

Ampicilina. Preparar una solución concentrada (25 mg/mL) a partir de la sal sódica, filtrar y almacenar a -20°C .

Amortiguador, electroforesis de ácidos nucleídos en gel de agarosa.

Amortiguador Tris-borato (TBE).		
Sustancia	Concentración (M)	Masa molecular (g/mol)
Ácido bórico	0.089	61.8
EDTA	0.002	380.2
Tris	0.089	121.14

Solución concentrada para preparación de TBE:

Para un litro

Tris base 54 g

Acido bórico 27.5 g

0.5 M de EDTA(pH=8.0) 20 mL

Amortiguadores utilizados en la purificación de la enzima:

Amortiguador C pH =7.4			
Sustancia	Concentración	Masa molecular	Para un litro
Trietanolamina-HCl	100 mM	185.65 g/mol	18.5650 g
EDTA	1 mM	380.2 g/mol	0.3802 g
Amortiguador A pH= 6.3			
MES	50 mM	195.2 g/mol	9.7600 g, 9.947 g si es MES sódico.
Amortiguador B pH=6.3			
NaCl	500 mM	58.44 g/mol	29.2200 g
MES	50 mM	195.2 g/mol	9.7600 g
Buffer D pH 7.4			
Trietanolamina HCl	100 mM	185.65 g/mol	18.5650 g
EDTA	1 mM	380.2 g/mol	0.3802 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.2 M	132.14 g/mol	290.708 g
Amortiguador de lisis pH 6.3 TcTIM			
MES	100 mM	195.2 g/mol	1.9520 g
DTT	1 mM	154.25 g/mol	0.0154 g

PMSF	0.2 mM	174.20 g/mol	34.84 g
EDTA	0.5 mM	380.2 g/mol	0.0190 g
Amortiguador de lisis adicionado con 300mM de NaCl pH 6.3			
MES	100 mM	195.2 g/mol	1.9520 g (1.9895 si se trata de MES sódico)
DTT	1 mM	154.25 g/mol	0.0154 g
NaCl	300 mM	58.44 g/mol	1.7532 g
EDTA	0.5 mM	380.2 g/mol	0.0190 g
Solución madre de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.6 M	132 g/mol	472 g
Buffer de lisis NaCl 300 mM pH=6.3			
mes	100 mM	195.2 g/mol	1.9520, 1.9895 si es sódico
DTT	1 mM	154.25 g/mol	0.0154 g
NaCl	300 mM	58.44 g/mol	1.7532 g
EDTA	0.5 mM	380.2 g/mol	0.0190 g
Buffer de lisis pH=6.3			
MES	100 mM	195.2 g/mol	1.9520, 1.9895 si es sódico
DTT	1m M	154.25 g/mol	0.0154 g
PMSF	0.2 M	174.20 g/mol	34.84 g
EDTA	0.5 mM	380.2 g/mol	0.0190 g

Los amortiguadores A,B, lisis se ajustan con HCl y los amortiguadores C y D con NaOH.

Gel de poliacrilamida SDS tipo von-Jagow

Gel concentrador (4%)

Reactivo	Volumen (μL)
H ₂ O	1500
Amortiguador Tris 3M, pH 8.4	600
Bisacrilamida (30%) -Acrilamida (1%)	320
Persulfato de amonio 10%	20
Temed	5
Volumen Total	2442

Gel separador (16%)

Reactivo	Volumen (μL)
H ₂ O	800
Amortiguador Tris 3M, pH 8.4	2000
Bisacrilamida (30%) -Acrilamida (1%)	3200
Persulfato de amonio 10%	20
Temed	5
Volumen total	6025

Amortiguador de electroforesis SDS

Reactivo
TRIS 3 M
Glicina 1 N
SDS 10%

Amortiguador TE (medición de actividad enzimática) pH 7.4.

Reactivo	Concentración
Trietanolamina	100 mM
EDTA	10 mM

Ajustar con NaOH hasta 7.4.