



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ANÁLISIS CINÉTICO DEL SISTEMA DE
DESINTOXICACIÓN DE PERÓXIDOS DE

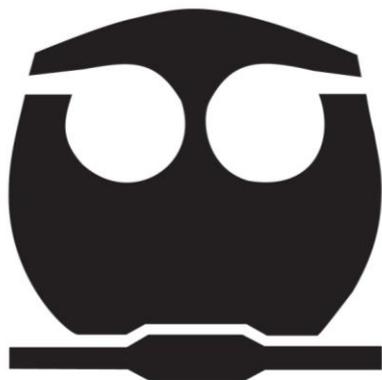
Trypanosoma cruzi

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

ZABDI ABRAHAM GONZÁLEZ CHÁVEZ



MÉXICO, D.F.

2011



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	Dr. Agustín López Munguía Canales
VOCAL	Dra. Marina Gavilanes Ruiz
SECRETARIO	Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira
1er SUPLENTE.	Q.F.B. Ruth Edith Martín Fuentes
2º SUPLENTE.	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

El trabajo se desarrolló en el departamento de bioquímica del
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

Asesora: Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira

Supervisor técnico: Q. A. Ma. Viridiana Olin Sandoval

Sustentante: Zabdi Abraham González Chávez

Agradecimientos

Gracias a ti mi Dios por darme la vida (momentánea y eterna), todo lo que he logrado es por tu gracia. Si hay alguna conclusión a la que puedo llegar a través del estudio de la ciencia es: “Todo lo hiciste PERFECTO”, me abruma conocer cada detalle de lo que formaste, verdaderamente todo es tuyo, todo te pertenece (Dt. 10:14) y todo anuncia que tú lo creaste (Sal. 19:1).

Gracias a mis padres por todo el amor que me dan, por el apoyo en todo momento, por la educación que de ustedes recibí y por el ejemplo. Todo lo que he logrado, humanamente se debe al esfuerzo de ustedes (en su mayoría), yo hice sólo una parte. Gracias a mis abuelos, por el apoyo espiritual y material, sin ustedes no estaría firme, ni habría terminado mis estudios. Gracias a mi familia por todo lo que me dieron para hacer más fácil el camino (la compu, las vacaciones, la lana, etc. jajaja)

Gracias a mis amigos, porque hicieron muy divertidos y “nutritivos” los días en la facultad y el instituto (Pulgueisha, Alhelí (nutritivos, jajaja), Candy, Cesó, Gina, Licha, Caro, Vic, Diana, Cecilia, Chema, Isaac, Oscar (por un semestre, jaja), Marco, Edgar), y gracias también a mis amigos que no estando en la facultad, lograron que me olvidara por varios momentos de todo lo que tenía que ver con estudiar (Salo, Abi, Felo, Rulo, Chama (donde quiera que estén los dos), Adrian, Kei, Damis, Karen, Luz, Javo, Liz, Lalo, Luis, unción forte y eclecticika), ustedes saben cuánto los aprecio brothers; y a sus familias también muchas gracias por el apoyo, la confianza, el cariño y las oraciones (Fam. Sán-Camp, Gamiño, Herr-Jim, Mart-Sal, García, Tellez-Vicke).

Gracias a la Dra. Emma y al Dr. Rafael, por las facilidades que me dieron para realizar este trabajo, por su apoyo, su conocimiento y la confianza. Gracias al Dr. José, al Doc Marín, al Dr. Quezada, y Dr. Jasso porque siempre estuvieron (y están) dispuestos a brindarme la ayuda para continuar con este trabajo. Gracias al equipo del laboratorio (incluyendo recursos humanos, jajaja, broma): Viri gracias por el tiempo, la amistad, la paciencia y el ánimo que me diste. Erika gracias por la amistad y por aguantarme. Rus también gracias por aguantarme, disipar todas mis dudas y también por el ánimo que me das, espero algún día retribuirlo. Ana, aunque llegaste al final de este trabajo muchas gracias por tu ayuda, échale ganas a esto. Gracias mi querida universidad UNAM por TODO y a Conacyt por el apoyo para la realización de esta tesis.

*Mi dignidad no está en lo que soy,
ni en mi sabiduría (si así se puede
llamar), ni en lo que tengo, mi
dignidad eres Tú Señor.*

Resumen

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas. Actualmente, los fármacos que se utilizan para su tratamiento son el nifurtimox y benznidazol, los cuales actúan generando estrés oxidante en el parásito. Sus efectos secundarios en los pacientes, alto costo, baja efectividad en la fase crónica de la enfermedad y la aparición de cepas resistentes han promovido la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos en el metabolismo antioxidante del parásito.

En los tripanosomátidos, el tripanotión $[T(SH)_2]$ junto con la tripanotión reductasa (TryR), reemplazan al sistema glutatión/glutatión reductasa (GSH/GR) de mamíferos. El $T(SH)_2$ es el metabolito central de la vía de reducción de hidroperóxidos ya que cede sus equivalentes reductores a metabolitos y proteínas antioxidantes; dentro de las últimas se encuentran la triparedoxina (TXN) que es una proteína exclusiva de tripanosomátidos similar a la tioredoxina (Trx) de mamíferos, la cual en su forma reducida, es sustrato de la glutatión peroxidasa A (GPxA) y de la triparedoxina peroxidasa (TXNPx), que son las enzimas del parásito responsables de reducir a los hidroperóxidos.

Una caracterización cinética previa de este sistema reductor de hidroperóxidos sugirió que la transferencia de electrones del $T(SH)_2$ hacia la TXN era el paso limitante en la vía debido a que tenía el menor potencial catalítico ($kcat/Km$) y, por lo tanto, se propuso esta reacción como un blanco de intervención terapéutica. Sin embargo, las condiciones experimentales que utilizaron los autores subestimaron los valores de $kcat$. Además, debido a que en dicho trabajo la caracterización cinética no se realizó bajo condiciones fisiológicas de pH y temperatura, sus datos no permiten identificar los pasos menos eficientes del sistema y por lo tanto aquellos con mayor potencial terapéutico.

El objetivo de este trabajo es determinar los valores de $kcat/Km$ de las enzimas recombinantes TXN, GPxA y TXNPx de *T. cruzi* bajo condiciones pseudo-fisiológicas de pH y temperatura (7.4/37°C, respectivamente) para identificar el paso menos eficiente del sistema reductor de hidroperóxidos en el parásito.

Los genes que codifican para la TXN, GPxA y TXNPx se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de *T. cruzi* de la cepa Ninoa, y se clonaron y secuenciaron

para confirmar su identidad. Posteriormente, las proteínas se sobre-expresaron en bacterias y se purificaron con alto grado de pureza. La caracterización cinética de las enzimas se llevó a cabo mediante la reconstitución *in vitro* de la vía y monitoreando la oxidación de NADPH a 340 nm en un espectrofotómetro.

A partir de los valores de velocidad máxima (V_{max}) y K_m obtenidos para cada una de las enzimas por sus respectivos sustratos, se pudieron determinar sus k_{cat}/K_m . Se determinó que el paso menos eficiente de esta vía es la reducción del hidroperóxido (CumOOH) catalizado por la TcGPxA, ya que tiene el menor potencial catalítico ($10^5 M^{-1} s^{-1}$); sin embargo, debido a los altos potenciales catalíticos del sistema reductor de peróxidos comparado con los menores potenciales encontrados para las enzimas que sintetizan el T(SH)₂ ($\sim 10^3$ Olin-Sandoval, tesis de doctorado en curso), ninguna de las enzimas del sistema de desintoxicación de peróxidos puede considerarse como un blanco potencial de intervención terapéutica.

Índice

Resumen.....	5
Lista de abreviaturas.....	9
1. Introducción.....	12
1.1. Biología de <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
1.2. Ciclo de vida del parásito.....	13
1.3. Descubrimiento de la enfermedad de Chagas.....	15
1.4. Mecanismos de transmisión de la enfermedad.....	15
1.5. Características de la enfermedad.....	16
1.6. Estadísticas de la enfermedad de Chagas.....	17
1.7. Tratamiento contra la enfermedad de Chagas.....	19
1.8. Sistema antioxidante de <i>T. cruzi</i>	21
1.9. Metabolismo del tripanotión.....	23
1.10. Breve repaso de cinética enzimática.....	26
1.11. Propiedades bioquímicas de la TXN.....	28
1.12. Propiedades bioquímicas de la GPx.....	30
1.13. Propiedades bioquímicas de la TXNPx.....	35
1.14. Antecedentes directos del proyecto.....	37
2. Justificación.....	38
3. Hipótesis.....	39
4. Objetivos.....	39
4.1. Objetivo general.....	39
4.2. Objetivos particulares.....	39
5. Metodología.....	40
5.1. Obtención de las secuencias de los genes de interés en el GenBank [®] y diseño de los cebadores.....	40
5.2. Amplificación de los genes.....	42
5.3. Separación por electroforesis de los productos amplificados.....	43
5.4. Ligación al vector de clonación.....	44
5.5. Preparación de células competentes.....	44

5.6. Transformación de células competentes.....	45
5.7. Extracción de plásmido.....	46
5.8. Identificación del gen. Análisis de restricción y secuenciación.....	46
5.9. Ligación de los genes al vector de sobre-expresión.....	47
5.10. Sobre-expresión de proteínas.....	49
5.11. Purificación de proteínas.....	50
5.12. Cuantificación de proteínas.....	51
5.13. Ensayos enzimáticos.....	51
5.13.1. Curva de saturación de TXN por T(SH) ₂	52
5.13.2. Curva de saturación de GPx por TXN.....	52
5.13.3. Curva de saturación de GPx por CumOOH.....	52
5.13.4. Curva de saturación de TXNPx por TXN.....	52
5.13.5. Curva de saturación de TXNPx por hidroperóxido.....	53
6. Resultados y Discusión.....	54
6.1. Amplificación de los genes que codifican para la TXN, GPx y TXNPx de <i>T. cruzi</i>	54
6.2. Clonación de los fragmentos y transformación en bacterias.....	55
6.3. Análisis de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos.....	56
6.4. Sobre-expresión de las proteínas.....	59
6.5. Purificación de las proteínas.....	61
6.6. Caracterización cinética.....	62
6.6.1. Propiedades cinéticas de la TXN.....	62
6.6.2. Propiedades cinéticas de la GPx.....	67
6.6.3. Propiedades cinéticas de la TXNPx.....	68
7. Discusión general.....	72
8. Conclusiones.....	75
9. Perspectivas.....	75
10. Bibliografía.....	76

Abreviaturas

A:	adenina
ADN:	ácido desoxirribonucleico
APx:	ascorbato peroxidasa
ATP:	trifosfato de adenosina
BSA:	albúmina bovina sérica
BZ:	benznidazol
C:	citosina
Cat:	catalasa
Cf21:	Peroxiredoxina 21 de <i>Crithidia fasciculata</i>
CumOOH:	hidroperóxido de cumeno
Cys:	cisteína
dNTPs:	desoxynucleótidos trifosfatados
DO:	densidad óptica
DTT:	ditiotreitól
EDTA:	ácido etilen diamina tetraacético
E° :	potencial redox
ERN:	especies reactivas de nitrógeno
ERO:	especies reactivas de oxígeno
Fe-XO	complejo de hierro(III) con naranja de xilenol
Fw:	forward (hacia adelante)
γ -EC:	gamma glutamil cisteína
γ -ECS:	gamma glutamil cisteína sintetasa
G:	guanina
Glu:	glutamato
Gly:	glicina
GPx, GPxA:	glutación peroxidasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
GR:	glutación reductasa
GSH:	glutación (forma reducida)

GSSG:	disulfuro de glutatión
h:	horas
IPTG:	isopropyl- β -D-tiogalactopiranosido
<i>k_{cat}</i> :	constante catalítica
kDa:	kilo daltones
<i>K_i</i> :	constante de inhibición
<i>K_m</i> :	constante de Michaelis-Menten
LB:	Luria-Bertani
LinOOH:	hidroperóxido de ácido linoléico
M:	molar
min:	minuto(s)
mM:	milimolar
μ M:	micromolar
mV:	milivoltios
NAD ⁺ :	dinucleótido de nicotinamida (forma oxidada)
NADH:	dinucleótido de nicotinamida (forma reducida)
NADP ⁺ :	fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada)
NADPH:	fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
NFX:	nifurtimox
nm:	nanometros
°C:	grados celsius
pb:	pares de bases
PCOOH:	hidroperóxido de fosfatidilcolina
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
Prx:	peroxiredoxina
Put:	putrescina
Rw:	reverse (reverso)
s:	segundos
[S]:	concentración de sustrato

SDS-PAGE:	electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
SeGPx:	glutación peroxidasa dependiente de selenio
SOD:	superóxido dismutasa
Spd:	espermidina
T:	timina
t-butOOH:	ter-butil hidroperóxido
TCA:	ácido tricloroacético
TDPx:	triparedoxina peroxidasa tipo II de <i>Leishmania major</i>
TEA:	trietanolamina
Trx:	tio-redoxina
TrxR:	tio-redoxina reductasa
TryP:	triparedoxina peroxidasa de <i>Leishmania major</i>
TryR:	tripanotión reductasa
TryS:	tripanotión sintetasa
TS ₂ :	disulfuro de tripanotión
T(SH) ₂ :	tripanotión (forma reducida)
TXN:	triparedoxina de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TXNPx:	triparedoxina peroxidasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
U:	unidades de actividad enzimática (μmol/min)
UV:	ultra-violeta
v ₀ :	velocidad inicial
V _{max} :	velocidad máxima
X-GAL:	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido
XO:	naranja de xilenol

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Biología de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protista flagelado del Orden Kinetoplastida, de la familia de los Tripanosomatidae, caracterizados por tener dentro de su única mitocondria el llamado cinetoplasto que corresponde al DNA mitocondrial. De acuerdo a la localización del cinetoplasto con respecto al núcleo y a su único flagelo, el parásito se clasifica en 3 estadios morfológicos durante su ciclo de vida (Fig.1) (Tay-Zavala *et al.* 1995.); Cevallos y Hernández, 2001; Maya *et al.* 2007).

- Epimastigote: Forma proliferativa, mide de 20 a 25 micras. Se caracteriza por tener el cinetoplasto antes del núcleo, en la parte media del organismo. Su flagelo se localiza en la parte media de la célula (Fig. 1A). Esta forma se encuentra dentro del intestino del insecto vector (triatómino).
- Tripomastigote: Estadio no proliferativo de 20 micras en el cual el cinetoplasto se encuentra en la parte posterior de la célula, separado del núcleo mientras que el flagelo emerge de la parte posterior y recorre toda la célula formando una membrana ondulante. Este estadio se desarrolla en el intestino posterior del triatómino (tripomastigote metacíclico) y en la sangre de los mamíferos (tripomastigote sanguíneo) (Fig. 1B).
- Amastigote: Forma proliferativa dentro de las células de mamíferos, prácticamente carente de flagelo (pues es muy pequeño), de forma ovalada, con un tamaño de 2 – 2.5 micras, en el que se puede observar el cinetoplasto y el núcleo (Fig. 1C).

Otra característica de los tripanosomátidos es que tienen un organelo especializado denominado glicosoma que contiene a 7 de las enzimas glicolíticas además de otras enzimas del metabolismo intermediario (Michels *et al.* 2006)

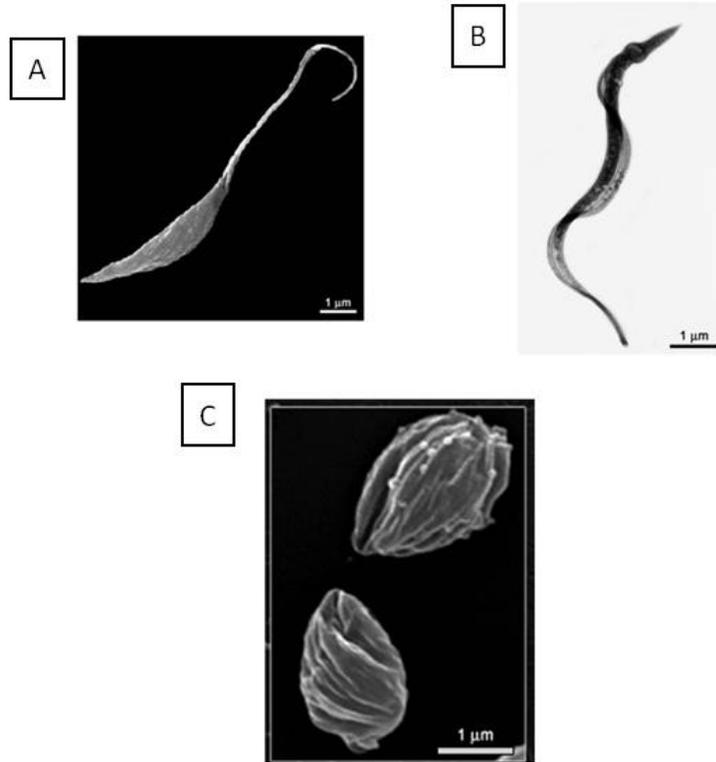


Figura 1. Estadios morfológicos de *T. cruzi*. (A) Microscopía electrónica de barrido de epimastigote. (B) Microscopía electrónica de alto voltaje de tripomastigote. (C) Microscopía electrónica de barrido de alta resolución de amastigote. Tomadas de <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=70>

1.2 Ciclo de vida del parásito.

Trypanosoma cruzi se ayuda tanto de los hematófagos como de algunos mamíferos para completar su ciclo biológico, el cual comienza cuando un triatómino infectado deposita, al momento de defecar, al parásito en su forma infectiva de tripomastigote metacíclico (Fig. 2a); el parásito puede ser introducido por el mismo vector al arrastrarlo con sus patas o por el mamífero al momento de rascarse (Fig. 2b). El tripomastigote penetra en las células epiteliales, musculares, nerviosas, fibroblastos o macrófagos del hospedero (Maya *et al.* 2007, Toma *et al.* 2000), donde pierde su flagelo transformándose en amastigote, de esta manera puede reproducirse por fisión binaria (Fig. 2c). Después de aproximadamente cinco días, el parásito se transforma nuevamente en tripomastigote, rompe la célula y se encuentra libre en el torrente sanguíneo (tripomastigote sanguíneo) (Fig. 2d). De esta manera, algunos

tripomastigotes pueden invadir otras células para multiplicarse, mientras que otros pueden ser ingeridos por triatóminos no infectados para continuar con el ciclo (Fig. 2e) (Tay-Zavala *et al.* 1995; WHO/TDR 2004).

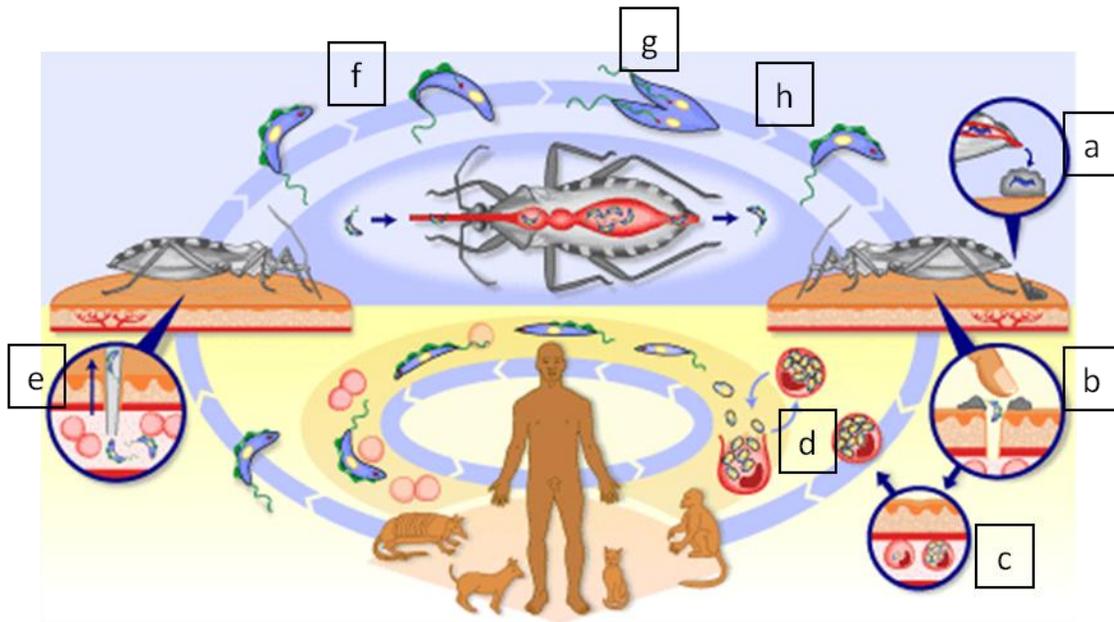


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Tomado de <http://www.who.int/tdroid/diseases/chagas/lifecycle.htm>. (a) Un triatómino deposita al parásito como tripomastigote metacíclico al momento de defecar. (b) El parásito es introducido por el hospedero o por el vector. (c) El parásito penetra las células del hospedero, donde se encuentra como amastigote. (d) Las células infectadas se rompen, liberando al torrente los tripomastigotes sanguíneos. (e) El parásito puede ser ingerido por un hematófago no infectado. (f) El tripomastigote se transforma en epimastigote en el intestino del triatómino. (g) El epimastigote se multiplica. (h) El epimastigote viaja al intestino posterior, donde se transforma en tripomastigote, llegando a formar parte de las heces.

Una vez dentro del triatómino, el tripomastigote viaja al intestino y se transforma en epimastigote (Fig. 2f). Algunos epimastigotes permanecen en la parte media del intestino, mientras otros pasan a la parte posterior y en ambos lugares el epimastigote puede multiplicarse por fisión binaria (Fig. 2g). Posteriormente, los epimastigotes que pasaron al intestino posterior del insecto continúan hacia el recto, donde se adhieren a la pared celular usando su flagelo y se transforman en tripomastigotes metacíclicos; permaneciendo ahí hasta que el triatómino ingiere más sangre (Fig. 2h). Por último, mientras el insecto se alimenta, los tripomastigotes son depositados junto con las heces en otro mamífero (Fig. 2a) (Tay-Zavala *et al.* 1995; WHO/TDR 2004).

1.3 Descubrimiento de la enfermedad de Chagas

En 1909, el médico Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas (1879 – 1934) mientras realizaba una campaña para combatir la malaria en el estado de Minas Gerais, Brasil, descubrió un parásito que denominó *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, el cual es transmitido a los humanos por insectos hematófagos de la familia *Reduviidae*, género *Conorhinus* conocidos como “barbeiros” por los naturales de la zona, y que provoca la enfermedad denominada tripanosomiasis americana (Chagas, 1909), que actualmente se conoce como Enfermedad de Chagas.

1.4 Mecanismos de transmisión de la enfermedad

No se conoce cómo se dio la primera transmisión del parásito al humano, pero se cree que fue un contacto bajo condiciones silvestres (Coura y Borges, 2010). En 1912 Emile Brumpt (Brumpt, 1912) observó que el parásito es transmitido a través de las heces de insectos del género *Triatoma* (en México se les conoce con varios nombres, siendo el más común “chinche besucona”); el parásito es internalizado al mamífero al momento de rascarse a través de la piel por la herida causada por el triatómino o por mucosas conjuntiva, nasal u oral (Tay-Zavala *et al.* 1995).

Los vectores de la enfermedad además del género *Triatoma* pueden ser: *Paratriatoma*, *Rhodnius*, *Panstrongylus* y *Eratyrus* por mencionar algunos. En México el problema es aún mayor, debido a la diversidad tan extensa de los vectores, ya que se han encontrado cerca de 30 especies de triatomas (Cruz y Pickering, 2006) siendo difícil establecer qué especie es más infectiva, pues esto depende de distintos factores como su distribución geográfica, adaptación y localización intradomiciliaria, ciclo de vida, capacidad vectorial (que se relaciona con el tiempo transcurrido entre la ingesta y la deyección), índice de infección natural (porcentaje de hematófagos portadores del parásito), porcentaje de tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior, número de parásitos defecados, entre otros (Salazar *et al.* 2005; Cruz y Pickering, 2006; Coura y Borges, 2010).

Las vías de contaminación con el parásito son distintas, siendo las principales la deyección del triatómino en el humano y la transfusión de sangre; para esta última se estima alrededor del 20% de los casos (Velasco *et al.* 2002). Algunas menos

frecuentes son la ingesta de alimentos crudos o agua que estuvieron en contacto con la materia fecal del triatómino; la ingesta del mismo insecto (algunas culturas acostumbran comerlos); por trasplante de órganos; transmisión congénita de la madre a los hijos durante el embarazo, al momento del parto o durante la lactancia si los pezones de la madre tienen heridas con sangre e inclusive se han dado algunos casos de accidentes en laboratorios y al manipular animales que sirven como reservorio del parásito (Tay-Zavala *et al.* 1995, Velasco *et al.* 2002; OMS 2009). Coura y Borges (2010) determinaron que las probabilidades de ser infectado naturalmente por *T. cruzi* serían bajas si no fuera por la alta frecuencia de contacto con el vector.

1.5 Características de la enfermedad

La enfermedad consta de tres etapas.

Etapas aguda: Se inicia en el momento de la mordedura del vector y generalmente es asintomática; sin embargo el 10% de los pacientes presentan algunos síntomas de la infección como son edema en cualquiera de las puertas de entrada del parásito (conocido como chagoma) o signo de Romaña si la entrada se dio por vía conjuntiva. Estos síntomas pueden durar hasta 30 días, y es común que se confundan con algunos otros padecimientos o simples mordeduras de insectos, estimándose que sólo el 1-2% de las ocasiones se identifica como enfermedad de Chagas (WHO 2002). En otros casos, puede presentarse fiebre, vómito, diarrea o anorexia (Tay-Zavala *et al.* 1995).

Etapas de latencia: En esta etapa no se presentan síntomas y comienza cuando las manifestaciones clínicas han disminuido después de 4 – 8 semanas de la entrada del parásito. En el 50 – 70% de los pacientes infectados, esta etapa puede durar el resto de su vida (Murta *et al.* 1998), actuando como reservorios del parásito y ayudando a mantener su ciclo de vida; el resto de los pacientes evoluciona a la etapa crónica (WHO 2002; Coura y Borges, 2010).

Etapas crónicas: Puede presentarse hasta 10 o 20 años después de iniciada la infección, donde algunas de las complicaciones son cardiomiopatías, caracterizada por arritmia o paro cardíaco (produciendo la muerte); cambios en el sistema nervioso periférico que causan debilitación sensorial; complicaciones digestivas caracterizadas

por megaesófago, megacólon o anormalidad en los movimientos peristálticos. Se estima que alrededor de 1.8 a 2.5 millones de personas presentan la etapa crónica de la enfermedad (WHO 2002; Coura, 2007).

1.6 Estadísticas de la enfermedad de Chagas

Se considera zona endémica de la enfermedad de Chagas desde Argentina hasta el sur de los Estados Unidos de América (18 - 21 países) (OMS 2009, Cruz y Pickering, 2006); la enfermedad se encuentra distribuida preferentemente en zonas con clima cálido, donde se reproducen los vectores de transmisión. Si bien se tienen algunos reportes donde se dice que el parásito se transmitió a los humanos desde hace 4000-9000 años (Guhl *et al.* 1999; Afderheide *et al.* 2004) la propagación de la enfermedad probablemente comenzó hace 300 años con la deforestación del hábitat natural de los insectos y de los animales de los cuales se alimentaban, el cual fue reemplazado por comunidades humanas, propiciando de esta manera el contacto entre los hematófagos y sus nuevos hospederos (Coura y Borges, 2010). En nuestros días, la propagación del parásito ha venido a ser mayor, debido a la migración a nivel mundial de personas infectadas, las cuales por transfusión sanguínea o donación de órganos a personas no infectadas, ha hecho que aumente el número de casos diagnosticados en países no endémicos como Australia, Canadá, Japón y algunos otros de Europa (OMS 2009; Coura y Albajar, 2010).

Hasta 1990 los reportes sobre la enfermedad de Chagas indicaban que en el mundo alrededor de 30 millones de personas se encontraban infectados por *T. cruzi*; aproximadamente 700,000 nuevos casos se daban cada año y cerca de 45,000 personas murieron por la enfermedad (OMS 2009). Estas estadísticas han disminuido progresivamente: de 18 millones hasta 8 millones de infectados en el periodo de 2002-2006; de 21,000 hasta 11,000 defunciones en el periodo 2002-2008; y de 300,000 hasta 56,000 nuevos casos por año en el periodo de 2002- 2006 (TDR 2002; WHO/TDR 2004; OMS 2009).

Con 120 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad por las condiciones precarias de sus viviendas en toda América (TDR 2002), antes se consideraba la enfermedad de Chagas como un problema de salud de las zonas

rurales, donde las condiciones de vida y el hábitat natural cercanos son propicios para la interacción de los vectores con las poblaciones. Sin embargo, ahora también se considera un problema de salud urbano, debido a la migración de estos sectores de la población, y a la posterior contaminación por transfusión sanguínea, reportándose que la incidencia de sangre contaminada con *T. cruzi* en los bancos de sangre es mayor a la del VIH y los virus de hepatitis B y C, alcanzando una tasa del 3 hasta el 53% en algunas ciudades del continente americano (OMS 2009).

En México no se tenían datos claros sobre la enfermedad, los vectores, las cepas de *T. cruzi* y los reservorios del parásito. Fue en 2005 cuando Alejandro Cruz y José Pickering del Instituto de Biología de la UNAM generaron una base de datos de trabajos bibliográficos de la enfermedad de Chagas publicados desde 1928 hasta 2004 denominado CHAGMEX® y disponible en la red (<http://unibio.unam.mx/chagmex/>) (Cruz y Pickering, 2005) que posteriormente derivó en un mapeo de la distribución espacial y temporal de la enfermedad en México (Cruz y Pickering, 2006). A través de esta información, conocemos que los estados de Jalisco, Oaxaca, Veracruz y Guerrero son aquellos con mayor número de casos (Fig. 3)

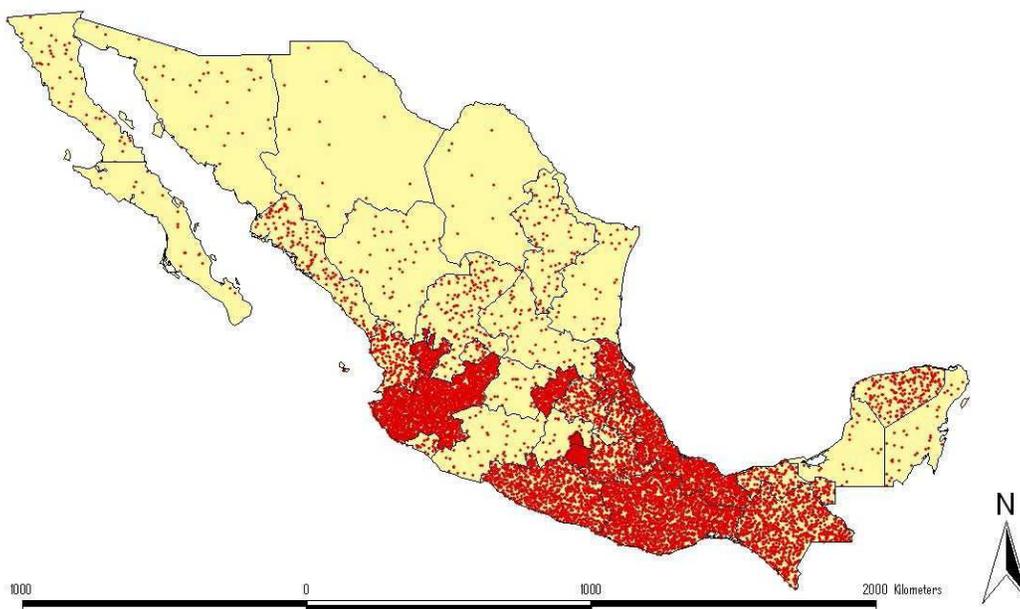


Figura 3. Casos de enfermedad de Chagas reportados por estado. Un punto corresponde a un caso. Tomado de <http://www.ibiologia.unam.mx/pdf/noticias/CHAGMEX.pdf>

La enfermedad de Chagas en México constituye un importante problema de salud pública, reportándose para el año 2005, 1.1 millones de personas infectadas, 7,700 nuevos casos por año sólo por transmisión vectorial, y casi 30 millones de personas expuestas a contraer la enfermedad, por lo tanto la tasa de prevalencia es de 1.03% y de incidencia de 0.007% (WHO/NTD/IDM 2006, citado en Reisenman *et al.* 2010).

Debido a estas estadísticas y afectaciones a la población mexicana por esta enfermedad, es necesario encontrar nuevas formas de combatirla.

1.7 Tratamiento contra la enfermedad de Chagas

Se han utilizado una gran cantidad de fármacos para el tratamiento de esta enfermedad (Coura, 2009); sin embargo, actualmente los más utilizados son el **nifurtimox** (NFX; [N-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinn-4-il)-1-(5-nitro-2-furil)metanimina]) y el **benznidazol** (BZ; [N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida]) (Fig. 4) (Coura y de Castro, 2002).

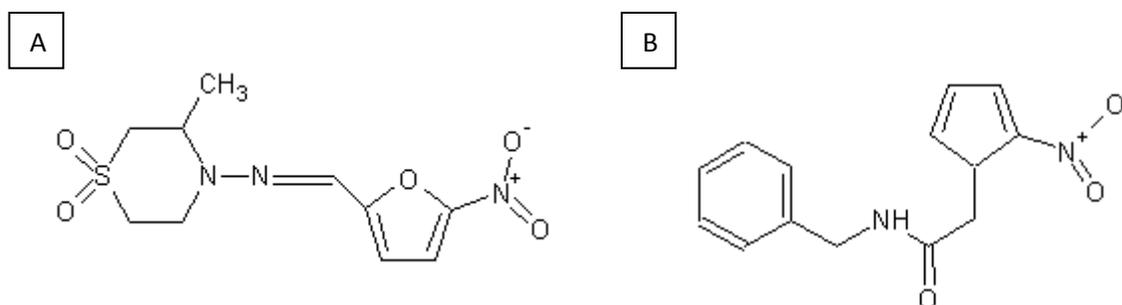


Figura 4. Estructuras de los fármacos utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. (A) Nifurtimox (N-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinn-4-il)-1-(5-nitro-2-furil)metanimina). (B) Benznidazol (N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida).

El NFX (Fig. 4A) actúa a través de la formación de radicales libres (especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno; ERO y ERN, respectivamente). El grupo nitro del NFX es reducido por acción de la nitroreductasa celular (NADPH oxidasa P450), dando lugar a la formación de radicales libres intermediarios como el radical nitro $\text{RNO}_2^{\cdot-}$, que puede reaccionar con el oxígeno molecular (O_2) para regenerar al grupo nitro (RNO_2) del NFX y formar al ión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$); esta ERO es tomada por la superóxido

dismutasa (SOD) para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2). A partir de esta segunda ERO se pueden formar otras, como el radical hidroxilo ($HO\cdot$) y el ion hidroxilo (HO^-) a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Hansberg *et al.* 2002). Asimismo, se pueden formar ERN a partir del óxido nítrico ($NO\cdot$) formado por la sintasa de óxido nítrico (NOS), el cual puede reaccionar con el $O_2\cdot^-$ para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) el cual pueden dañar estructuras de lípidos, proteínas y ADN (Maya *et al.* 2007).

Por otro lado, el grupo nitro del BZ (Fig. 4B) también es reducido por la nitroreductasa, formando metabolitos electrofílicos (RNO, RNHOH), que pueden formar conjugados con moléculas con grupos tiol ($-SH$) como el tripanotión [N^1, N^8 -bis(glutathionil)espermidina, $T(SH)_2$] o el glutatión [L - γ -glutamyl- L -cisteinilglicina, GSH], o reaccionar con el radical $HO\cdot$ y de esta manera formar conjugados con macromoléculas (proteínas, lípidos y ADN) (Maya *et al.* 2007).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el fármaco ideal para el tratamiento de una enfermedad debe cumplir los siguientes requisitos (citado por Coura y de Castro, 2002; Coura, 2009):

- i) Ser una cura tanto en la etapa aguda como en la crónica de la enfermedad.
- ii) Ser efectiva en una dosis única o con pocas dosis.
- iii) Ser accesible para los pacientes (bajo costo y de fácil obtención).
- iv) No causar daños colaterales o tener efectos teratogénicos.
- v) No requerir de hospitalización durante el tratamiento.
- vi) No inducir o mostrar resistencia en el agente etiológico.

Haciendo una comparación de los puntos arriba mencionados con el tratamiento actual de la enfermedad, sabemos que:

i) La eficiencia de estos fármacos es del 40 – 80% en la etapa aguda de la enfermedad (Murta *et al.* 1998); pero tienen capacidad limitada (20%) contra la etapa crónica (Coura, 2009). Se ha visto que su efecto tripanomicida es contra todos los estadios del parásito, sin embargo es mayor contra tripomastigotes que contra amastigotes (Coura y de Castro, 2002; Maya *et al.* 2007);

ii) El tratamiento de la enfermedad involucra la administración de 8 – 10 mg/Kg/día para el NFX o de 5mg/Kg/día para el BZ, dividido en 2 ó 3 dosis durante 60 días (Coura, 2009);

iii) Su uso implica un alto costo (Wilkinson *et al.* 2008), que conjuntamente con su baja disponibilidad comercial lo hacen poco accesible a amplios sectores de la población infectada (Coura, 2009);

iv) Tienen efectos secundarios adversos sobre el hospedero, como pueden ser anorexia, alteraciones psicológicas, somnolencia, hipersensibilidad (erupciones cutáneas, dermatitis), alucinaciones, depresión medular y depresión del sistema nervioso central y periférico (Coura y de Castro, 2002; Maya *et al.* 2007; Coura, 2009);

v, vii) Debido a todas estas razones y a que el tratamiento no requiere que los pacientes sean hospitalizados, en muchas ocasiones el tratamiento es abandonado, lo que ha ocasionado la aparición de cepas resistentes (Wilkinson *et al.* 2008; Coura, 2009).

Bajo este panorama, la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos es primordial, dentro de los cuales se han propuesto a las enzimas involucradas en el metabolismo antioxidante del parásito que se basa en el T(SH)₂.

1.8 Sistema antioxidante de *T. cruzi*

En la mayoría de los organismos, el metabolito que se encarga de mantener un ambiente reductor es el GSH (Fig. 5A), presente en concentraciones de 1 – 10 mM (Henderson, Fairlamb y Cerami, 1987). El GSH reduce a los hidroperóxidos de manera indirecta por acción de la distintas glutatión peroxidasas dependientes de selenio (SeGPxs), y es transformado a disulfuro de glutatión (GSSG), el cual es regenerado por la glutatión reductasa (GR) a expensas de NADPH (Fig. 11A) (Januel *et al.* 2006, Augustyns *et al.* 2001). Estas enzimas no son las únicas que se encargan de neutralizar las ERO ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $HO\cdot$), pues también existen distintas SODs, que generan H_2O_2 a partir de $O_2^{\cdot-}$, la catalasa (Cat) que dismuta el H_2O_2 en O_2 y H_2O , y el sistema tioredoxina reductasa/tioredoxina (TrxR/Trx) /tioredoxina peroxidasa (Fig.8B) (Hansberg *et al.* 2002, Augustyns *et al.* 2001, Alphey *et al.* 1999).

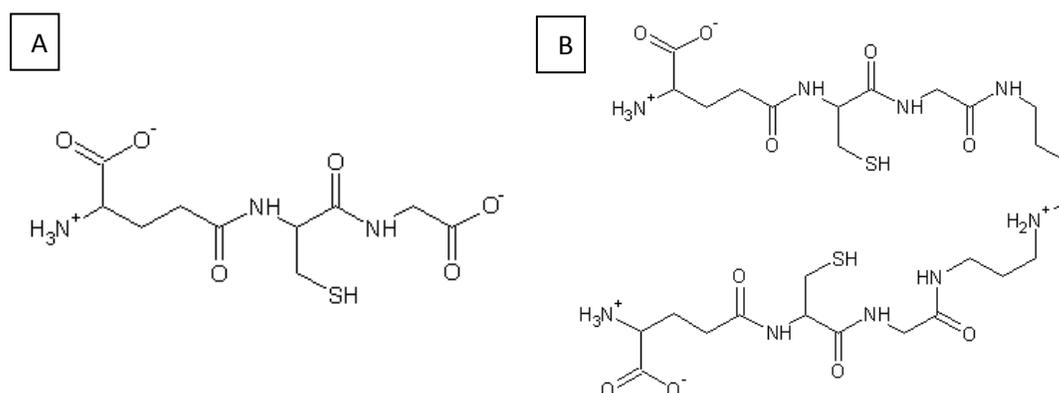


Figura 5. Principales tioles en *T. cruzi*. (A) Estructura del glutatión, L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina. (B) Estructura del tripanotión, N¹,N⁸-bis(glutathionil)espermidina.

En humanos y otros mamíferos, el metabolismo antioxidante depende del GSH, sin embargo en los tripanosomátidos depende del T(SH)₂ (Fig. 5B). Esta diferencia se da a pesar de que la concentración de GSH es importante (0.3 - 0.6 mM considerando que el 20% está en forma libre de un total de 5 - 9.5 nmol/10⁸ células y que hay 30 μ L de volumen intracelular en 10⁹ epimastigotes de *T. cruzi*; Olin-Sandoval *et al.* 2010) y a pesar de que los potenciales redox del GSH y T(SH)₂ son muy similares (-230 a -250mV y -242mV, respectivamente). La razón por la cual se da esta dependencia es porque cinéticamente se favorece más la oxidación de los tioles intramoleculares del T(SH)₂, que la oxidación entre dos moléculas de GSH. Asimismo, el pKa del T(SH)₂ (7.4) coincide con el pH fisiológico, lo que lo hace más reactivo con respecto al GSH (pKa 8.7) en el parásito. Por lo tanto, el T(SH)₂ junto con su enzima la tripanotión reductasa (TryR) reemplazan al sistema GSH/GR de mamíferos (Krauth-Siegel *et al.* 2007, Fairlamb y Cerami, 1992). Se ha visto que las concentraciones de T(SH)₂ (0.1-2.1 mM) y GSH pueden variar dependiendo del estadio del parásito, en algunos casos, llegando el segundo a concentraciones comparables con las del primero (Olin-Sandoval *et al.* 2010).

1.9 Metabolismo del tripanotión.

El metabolismo del tripanotión (Fig.6) se puede separar en dos secciones, la vía de su síntesis (Fig. 6A) y la de su consumo y regeneración (Fig. 6B) (Irigoín *et al.* 2008; Olin-Sandoval *et al.* 2010).

La primera parte involucra la síntesis de sus dos precursores, el GSH y la espermidina (Spd). La síntesis de GSH se lleva a cabo de la misma manera tanto en *T. cruzi* como en la mayoría de otros organismos. El GSH se sintetiza en dos reacciones dependientes de ATP: la primera catalizada por la γ -glutamylcisteína sintetasa (γ -ECS) que une una cisteína (Cys) y glutamato (Glu) formando γ -glutamylcisteína (γ -EC); la segunda reacción es catalizada por la glutatión sintetasa (GS) que une a la γ -EC y glicina (Gly) (Fig. 6). Por otro lado, la Spd se sintetiza a partir de putrescina (Put) y s-adenosilmetionina descarboxilada por la acción de la espermidina sintasa (SpdS), o bien se transporta desde el medio extracelular por transportadores de alta afinidad (Algranati, 2010; Hasne *et al.* 2010).

Una vez obtenido el GSH y la Spd, el T(SH)₂ se sintetiza en otra reacción dependiente de ATP catalizada por la tripanotión sintetasa (TryS), la cual une dos moléculas de GSH, con una de Spd. Sin embargo, la TryS de *T. cruzi*, a diferencia de la de otros tripanosomátidos puede unir otras poliaminas como la cadaverina para formar homotripanotión [N¹,N⁹-bisglutathionilaminopropilcadaverina] o espermina, dando lugar a otro homólogo del tripanotión [N¹, N¹²-bisglutathionilespermina].

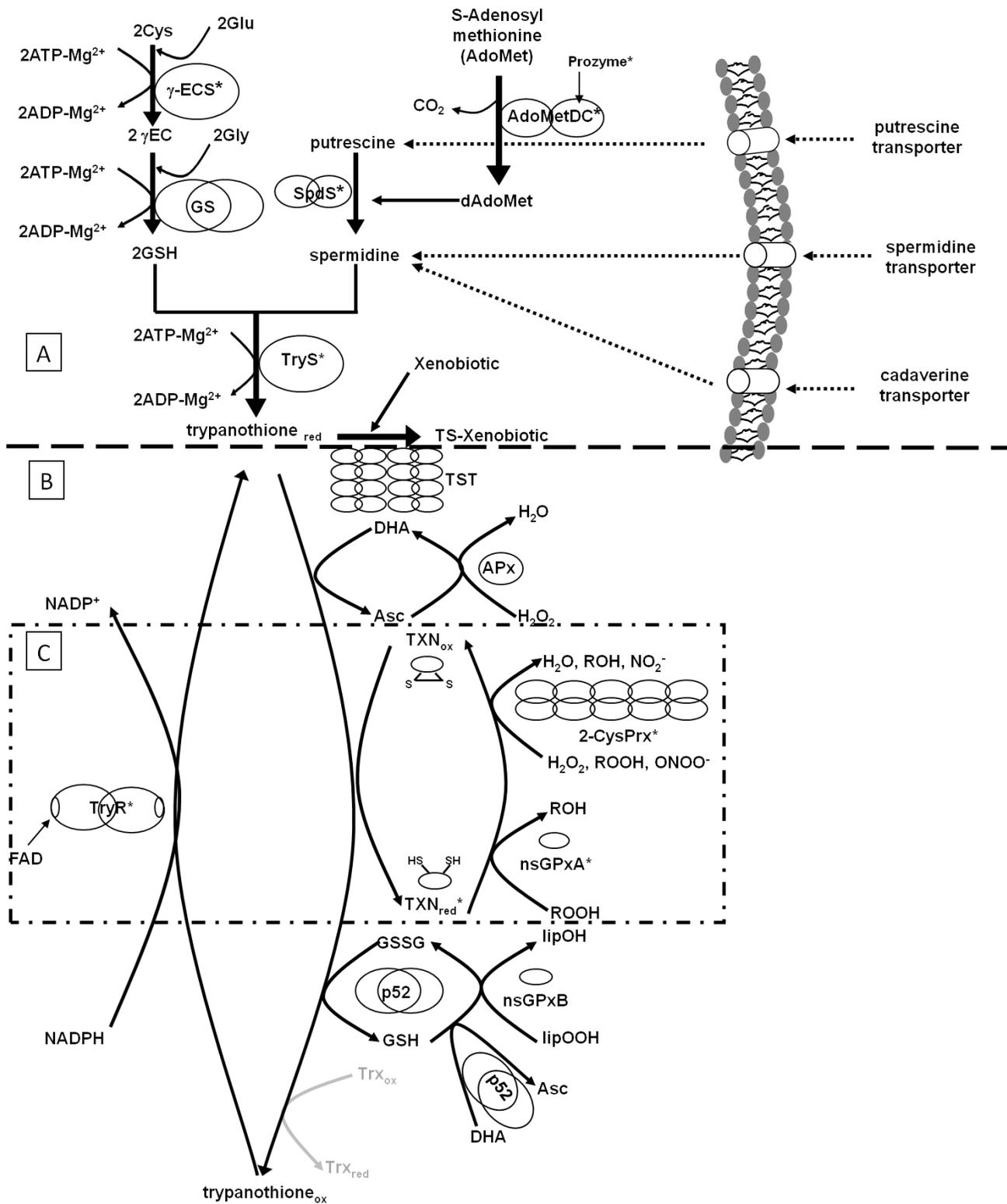


Figura 6. Metabolismo del T(SH)₂ en *T. cruzi*. (A) Vía de síntesis de tripanotión; (B) Vía de consumo de tripanotión; (C) Vía de reducción de hidroperóxidos dependiente de TXN. (Modificada de Olin-Sandoval *et al.* 2010)

El sistema desintoxicante de hidroperóxidos en *T. cruzi* depende en último grado del $T(SH)_2$ (Fig. 6B). Este último transfiere sus equivalentes reductores al dehidroascorbato (DHA) y el GSSG, los cuales son sustratos de las enzimas antioxidantes ascorbato peroxidasa (APx) y de la glutatión peroxidasa B (GPxB), respectivamente. Así mismo, el $T(SH)_2$ reduce a algunas proteínas con grupos tioles reactivos como la tioredoxina (Trx) y la triparedoxina (TXN); esta última es sustrato de la glutatión peroxidasa A (GPxA) y de la 2-cisteín peroxiredoxina, también conocida como triparedoxina peroxidasa (TXNPx) (Fig. 6). La TXN junto con la GPxA y TXNPx constituyen el principal sistema antioxidante de los parásitos. Posteriormente, el disulfuro de tripanotión (TS_2) que se produce por la reducción de los hidroperóxidos es reducido por la TryR, que es una flavoproteína que cataliza una reacción dependiente de NADPH (Fig. 6B).

En el hospedero humano, las enzimas GR, Cat, TrxR y distintas SeGPxs neutralizan las ERO; sin embargo, en los tripanosomátidos no se ha detectado la actividad de estas enzimas (Krauth-Siegel *et al.* 2007), razón por la que tempranamente se pensó que los parásitos no podían contender con el estrés oxidante (Henderson *et al.* 1987, Carnieri *et al.* 1993). Posteriormente se determinó que en su lugar se encuentran las enzimas antioxidantes específicas de tripanosomátidos TryR, TXN, GPxA, GPxB, TXNPx, además de otras que sí se comparten con el hospedero como algunas SODs (Mateo *et al.* 2008) y la Trx, la cual se ha encontrado en bajas concentraciones en *T. brucei* (Reckenfelderbäumer *et al.* 2002). Actualmente se reconoce que el parásito tiene un sistema antioxidante muy eficiente (Irigoín *et al.* 2008).

En esta tesis el estudio se enfocó en el análisis de un segmento de la vía desintoxicante de peróxidos (Fig. 6C), conocida como la vía de reducción de hidroperóxidos dependiente de TXN (Fig. 7), en la cual están involucradas las enzimas citosólicas (TXN, TXNPx y GPx) (Irigoín *et al.* 2008).

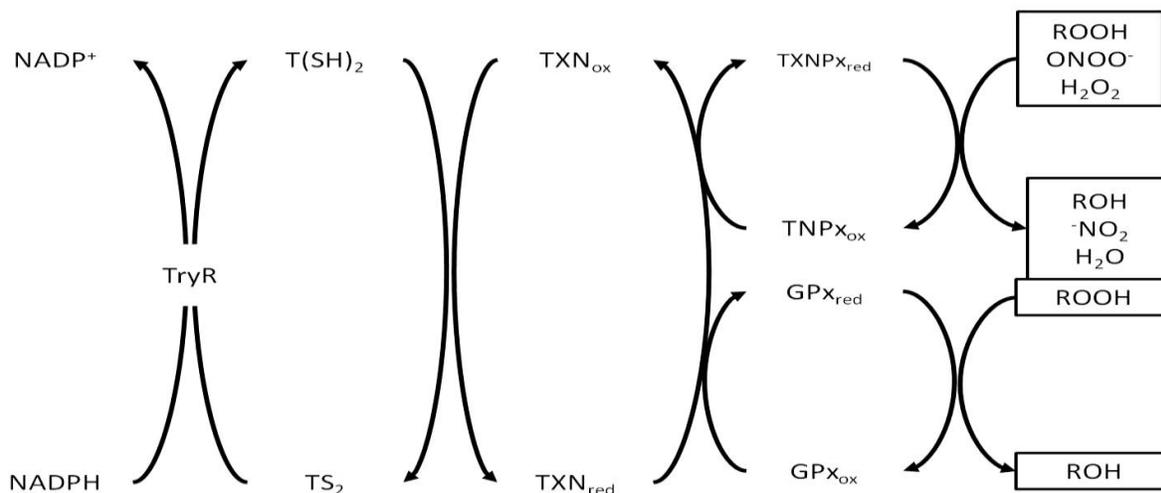
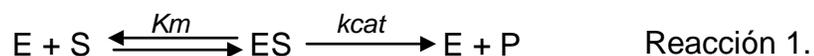


Figura 7. Vía de reducción de hidroperóxidos dependiente de TXN en tripanosomátidos. Los electrones fluyen del NADPH hacia el hidroperóxido a través de una serie de enzimas [triptanotión reductasa (TryR), triparedoxina (TXN), triparedoxina peroxidasa (TXNPx) y glutatión peroxidasa A no dependiente de selenio (GPx)]. Los sustratos de las peroxidasas son hidroperóxidos de ácidos grasos (ROOH), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peroxinitrito ($ONOO^-$).

1.10 Breve repaso de cinética enzimática

Las enzimas (E) son catalizadores que disminuyen la energía de activación de una reacción bioquímica, transformando sus sustratos (S) en productos (P). Para esto, la enzima forma un complejo con el sustrato (ES) en el cual se llevará a cabo la formación de los productos, los cuales posteriormente serán liberados (Reacción 1).



La velocidad de algunas enzimas se comporta de manera hiperbólica al incrementar la concentración de sus sustratos. Este comportamiento se representa por la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 1)

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ecuación 1.}$$

en donde v_0 es la velocidad inicial de la reacción, V_{max} la velocidad máxima, K_m la constante de Michaelis-Menten y $[S]$ la concentración de sustrato (Segel, 1993).

El valor de K_m se conoce como la concentración de sustrato a la cual una enzima alcanza la mitad de su V_{max} . Cuando la $[S] \gg K_m$ se dice que la enzima está saturada y, por lo tanto, el equilibrio de la Reacción 1 se desplaza hacia el complejo ES, de manera que la V_{max} estará definida por la Ecuación 2.

$$V_{max} = k_{cat} [ES] = k_{cat} [E]_T \quad \text{Ecuación 2.}$$

en donde k_{cat} es la constante catalítica y $[E]_T$ es la concentración de enzima total (Northrop, 1999).

Por otro lado, la k_{cat} es la constante de velocidad que indica la cantidad de producto que libera un mol de enzima durante un segundo. Esta constante se calcula a partir de la ecuación 2 y se obtiene experimentalmente a partir de enzimas puras.

A pesar de que la k_{cat} indica qué tan rápida puede ser una enzima, su capacidad catalítica también depende de la afinidad que tiene por sus sustratos. De esta manera, las relaciones k_{cat}/K_m (potencial catalítico) (Eisenthal *et al.* 2007) y V_{max}/K_m (eficiencia catalítica), conjuntan la velocidad de captura del sustrato y la liberación de producto (Northrop, 1999). La diferencia entre ambos radica en que la k_{cat}/K_m permite comparar potenciales catalíticos entre enzimas puras de las cuales se conoce su peso molecular y concentración o también el potencial catalítico de una enzima con diferentes sustratos (mejor denominado constante de especificidad), mientras que la V_{max}/K_m es útil para enzimas no puras o que se encuentran en un extracto, y por lo tanto el valor dependerá de la cantidad de enzima contenida en la muestra (de acuerdo a la Ec. 2). Así, por ejemplo, una enzima con una k_{cat} alta y una afinidad baja (valor de K_m alto) puede tener menor potencial que una con menor k_{cat} pero mayor afinidad (valor de K_m bajo). Estas relaciones nos permiten comparar la capacidad de dos o más enzimas, como catalizadores de la reacción que llevan a cabo.

1.11 Propiedades bioquímicas de la TXN

La TXN es una proteína de 16 kDa perteneciente a la familia de las tioredoxinas, las cuales se caracterizan por tener en su sitio catalítico la secuencia Cys-X-X-Cys en donde X, es cualquier aminoácido. Algunos ejemplos de estas enzimas y sus sitios son la Trx (CGPC), glutaredoxina (CPYC) y la misma TXN (CPPC), la cual tiene el sitio menos común pero el de mayor poder reductor (Guerrero *et al.* 1999). La TXN comparte solamente el 15% de homología con las otras tioredoxinas, es 50% más grande y no es reducida directamente por una flavoproteína dependiente de NADPH como ocurre con la Trx y su enzima TrxR (Fig. 8B), sino que es reducida directamente por el $T(SH)_2$ (Fig. 8A) (Castro y Tomás, 2008).

La TXN se identificó por primera vez en el tripanosomátido parásito de insectos *Crithidia fasciculata* (Nogoceke *et al.* 1997) y se clasificó como una tripanotión: peroxidoredoxina oxidoreductasa (Gommel *et al.* 1997), ya que cataliza la reacción entre el $T(SH)_2$ y la peroxidoredoxina 21 del mismo parásito (Cf21). Posteriormente se determinó que la TXN cataliza la misma reacción en otros tripanosomátidos como *Leishmania major* (Ivens *et al.* 1998), *T. brucei* (Lüdemann *et al.* 1998) y *T. cruzi* (Lopez *et al.* 2000) por mencionar algunos.

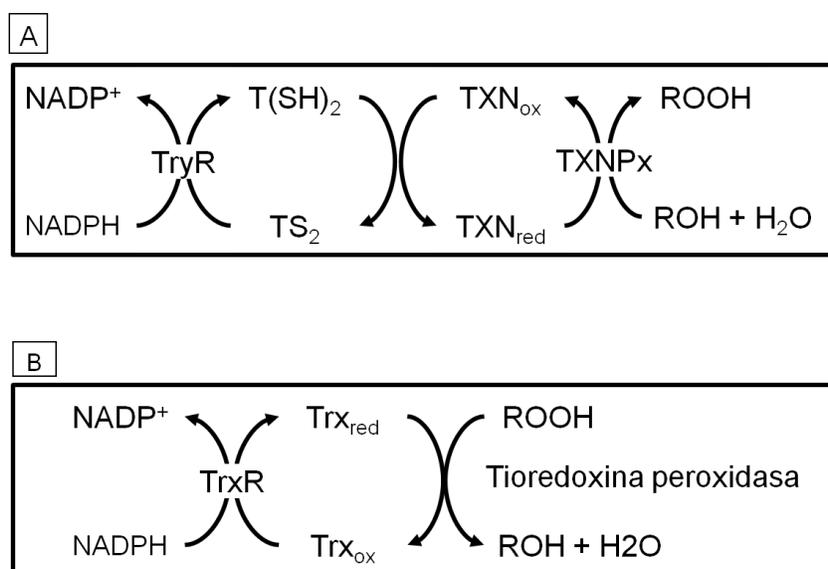


Figura 8. Sistemas antioxidantes en diferentes tipos celulares. (A) Sistema antioxidante dependiente de $T(SH)_2$ en tripanosomátidos. (B) Sistema antioxidante dependiente de Trx presente en células de mamíferos, levaduras y algunas plantas. Modificado de Alpey *et al.* (1999).

Esta proteína es de suma importancia para los tripanosomátidos, ya que además de catalizar las reacciones descritas en las Figs. 6 y 8a, provee de electrones a la ribonucleótido reductasa, la cual cataliza la formación de precursores de ADN (Krauth-Siegel *et al.* 2007), asimismo se ha visto que cumple con algunas otras funciones en *C. fasciculata* (Alphey *et al.* 1999).

La TXN tiene un mecanismo cinético de ping-pong, en el que el sustrato oxidante y el reductor reaccionan de manera ordenada con la enzima, de acuerdo a la reacción de la Figura 9 (Flohé *et al.* 2002a):

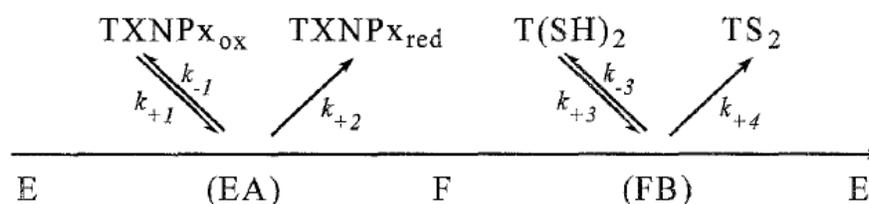


Figura 9. Mecanismo de reducción de la TXN. La TXN reducida (E) se une al sustrato oxidado A (TXNPx_{ox} ó GPx_{ox}) formando el complejo EA que reduce y libera al sustrato reducido, mientras que la enzima queda en un estado oxidado (F) el cual es capaz de unir al T(SH)₂ formando un complejo FB. El T(SH)₂ reduce el puente disulfuro de la enzima, quedando nuevamente en su estado reducido (E) y liberando al TS₂. Tomada de Flohé *et al.* (2002a).

Diversos autores reportan que la TXN es abundante en tripanosomátidos (*T. brucei* (Reckenfelderbäumer y Krauth-Siegel, 2002), *T. cruzi* (Wilkinson *et al.* 2002), *C. fasciculata* (Nogoceke *et al.* 1997)); estimándose que su concentración es del 3 – 5% de la proteína total de los parásitos. La TXN ha sido caracterizada en distintos tripanosomátidos, incluyendo *T. cruzi* (Wilkinson *et al.* 2002). Los parámetros obtenidos para la TXN recombinante de *T. cruzi* (TcTXN) se resumen en la Tabla1, los cuales son semejantes a los reportados para la TXN de *C. fasciculata* (CfTXN) purificada y recombinante ($Km_{\text{T(SH)}_2}$ 130 y 406 μM ; Km_{Ct21} 2.2 y 4.8 μM ; k_{cat} 6.5 y 26.4 s^{-1} , respectivamente) (Gommel *et al.* 1997; Guerrero *et al.* 1999).

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la TcTXN obtenidos a 25°C y pH 8.0

Sustrato	<i>Km</i> (μM)	<i>Vmax</i> (nmol/min·mg de TXN)	<i>kcat/Km</i> $\times 10^3$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
T(SH) ₂	41 \pm 5	1174 \pm 41	7.6
GPx	2.2 \pm 0.3	1989 \pm 119	240

Tomados de Wilkinson *et al.* (2002).

Se ha determinado que la CfTXN presenta inhibición por altas concentraciones de TS₂ (Flohé *et al.* 2002a) mientras que la TXN de *T. brucei* (TbTXN) tiene una IC₅₀ de 50 μM por TS₂ a concentraciones de 1 mM de T(SH)₂ (Reckendfelderbäumer y Krauth-Siegel, 2002). No hay reportes del posible efecto inhibitorio sobre la TcTXN.

Se ha descrito que la reacción de la TXN con el T(SH)₂ ocurre de manera más rápida que con el GSH y que este efecto no puede deberse únicamente a la similitud de los valores de pKa entre la TXN (7.2) y el T(SH)₂ (7.4) y su diferencia con el pKa del GSH (8.7), tomando en cuenta que el pH fisiológico es de 7.4. La diferencia tampoco se podría explicar de acuerdo a los potenciales redox (E^0), pues el del T(SH)₂ (-242 mV), GSH (-230 a -250 mV) y TXN (-249 mV) son muy similares y aún más con el valor intracelular en células de mamífero (-235 mV). De esta manera, la rapidez de la transferencia de electrones sólo puede deberse a una interacción específica entre ambos metabolitos (T(SH)₂/TXN) (Reckenfelderbäumer y Krauth-Siegel, 2002). Por lo tanto, este par redox es el factor más importante y eficiente para mantener el potencial redox citosólico del parásito (Krauth-Siegel, 2007).

1.12 Propiedades bioquímicas de la GPx

La GPxA es una enzima monomérica de 19.8 kDa que cataliza la reacción de reducción de hidroperóxidos orgánicos tomando como donador de electrones a la TXN (Fig. 7), por esta razón se le conoce alternativamente como triparedoxina peroxidasa (Wilkinson *et al.* 2002; Castro y Tomás, 2008). Debido a su semejanza con las SeGPxs

de humano (~30% de identidad) también se considera una glutatión peroxidasa; por lo que su nombre completo sería triparedoxina peroxidasa tipo glutatión peroxidasa (Wilkinson y Kelly, 2003; Krauth-Siegel, 2007).

Su mecanismo de reacción es de sustitución o ping-pong (Fig. 10). En primer lugar, la Cys48 es oxidada por el hidropéroxido, formándose un intermediario derivado del ácido sulfénico (RSO⁻); posteriormente, la Cys96 ataca dicho intermediario dando lugar a la formación de un puente disulfuro entre la Cys48 y la Cys96, el cual es posteriormente reducido por la TXN (Patel *et al.* 2010).

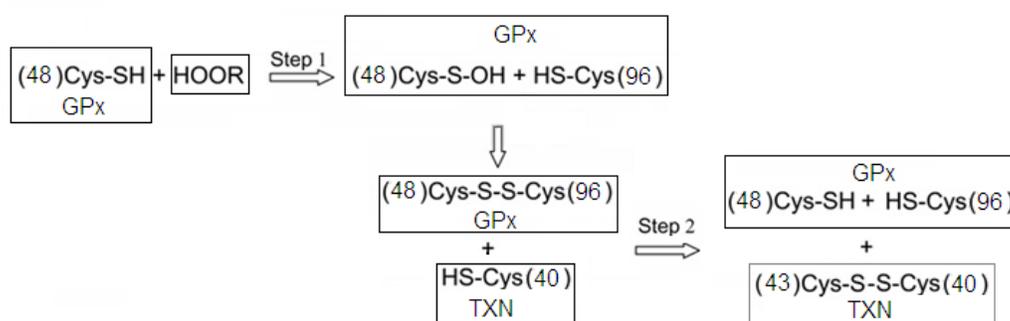


Figura 10. Mecanismo de oxidación-reducción descrito para la TcGPx. Como primer paso se da la unión de GPx con el hidropéroxido (HOOR); el paso intermediario es la formación del puente disulfuro intramolecular en la GPx; en el último paso, la TXN se une a la GPx, liberándose al final la GPx reducida. (Modificado de Patel *et al.* 2010).

Las formas de SeGpxs en humanos son la citosólica (SeGPxI), la gastrointestinal (SeGPxII), la extracelular (SeGPxIII) y la reductora de hidropéroxidos de fosfolípidos (SeGPxIV), que puede estar en citosol y en mitocondria (Januel *et al.* 2006). Las tres primeras son tetraméricas, mientras que la última es monomérica. Debido a la semejanza en la utilización de los sustratos y por tener el mayor porcentaje de identidad (ligeramente >30%), a la GPx de *T. cruzi* se le compara con la SeGPxIV (Wilkinson y Kelly, 2003). La diferencia entre las enzimas humanas y la de los tripanosomátidos, es que las primeras tienen en su sitio activo una selenocisteína catalítica, mientras que en las segundas se encuentra una Cys; por esta razón también se le conoce como GPx no selenocisteínica (Irigoín *et al.* 2008). Además, los sitios involucrados en la unión a GSH

en la enzima de tripanosomátidos están mutados o ausentes (Castro y Tomás, 2008), lo que trae como consecuencia una baja afinidad por este sustrato (Km_{GSH} 6 – 8 mM; Wilkinson *et al.* 2000), por lo que no se le considera como su sustrato fisiológico, mientras que la enzima tiene una alta afinidad por la TXN (Km 2.2 μ M, Wilkinson *et al.* 2002). Sin embargo, hay que enfatizar que las SeGPxs son 5-10 veces más eficientes que las no selenocisteínicas (Hillebrand *et al.* 2003, Shlecker *et al.* 2005). Por lo tanto, esta vía reductora de hidroperóxidos en el parásito difiere drásticamente de la que ocurre en mamíferos (Fig. 11B) (König y Fairlamb, 2007).

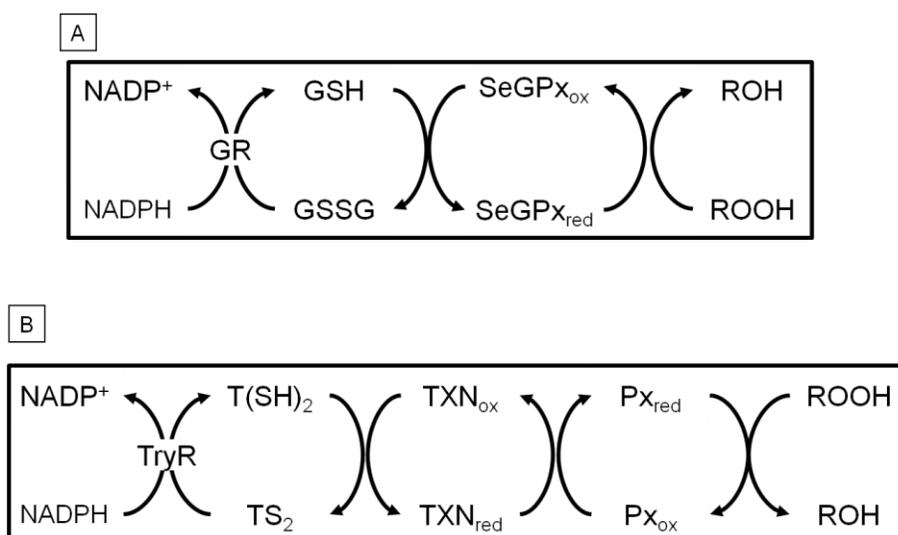


Figura 11. Sistema antioxidante dependiente de GSH y T(SH)₂. (A) Esquema de la glutatión peroxidasa dependiente de selenio. (B) Esquema de la triparedoxina peroxidasa tipo glutatión peroxidasa. Modificado de König y Fairlamb (2007).

La enzima homóloga de *T. brucei* conocida como triparedoxina peroxidasa III (*TbPxIII*) tiene el 72% de identidad con la *TcGPx*; sin embargo, la primera tiene como sustratos fisiológicos al H₂O₂ ($kcat/Km$ 8.7X10⁴ M⁻¹s⁻¹), hidroperóxido de timina ($kcat/Km$ 7.6X10⁴ M⁻¹s⁻¹) e hidroperóxido de ácido linoléico (LinOOH $kcat/Km$ 4X10⁴ M⁻¹s⁻¹) y es inhibida por el hidroperóxido de fosfatidilcolina (PCOOH) (Schlecker *et al.* 2005); mientras que la *TcGPx* es incapaz de reducir al H₂O₂ y principalmente reduce hidroperóxidos orgánicos, especialmente los derivados de ácidos grasos y fosfolípidos (Krauth-Siegel *et al.* 2007; Irigoín *et al.* 2008).

Hillebrand *et al.* (2003) reportaron que la *TbPxIII* no tiene una cinética de saturación por hidroperóxido ($Km \infty$ y $Vmax \infty$) cuando se utiliza Trx ($kcat/Km$ 5×10^3 $M^{-1}s^{-1}$) o TXN ($kcat/Km$ 2×10^5 $M^{-1}s^{-1}$) como donadores de electrones; mientras que al utilizar GSH como reductor, se observó saturación utilizando como sustratos hidroperóxido de cumeno (CumOOH, Km_{CumOOH} $12 \mu M$) y ter-butil hidroperóxido (t-butOOH, $Km_{t-butOOH}$ $47 \mu M$); con valores de Km_{GSH} de 16 y 46 mM con dichos sustratos, respectivamente. De la misma manera que ocurre con la *TcGPx*, los valores de Km_{GSH} son tan altos que éste no sería su sustrato fisiológico; mientras que los valores de $Km_{hidroperóxido}$ son semejantes a los reportados para la *TcGPx*, enzima en la que sí se observó una saturación, sin importar el donador de electrones utilizado (GSH/GR o T(SH)₂/TXN/TrxR). Los datos cinéticos reportados para *TcGPx*, resumidos en la Tabla 2, muestran valores de Km menores por hidroperóxidos de ácidos grasos de cadena larga que por los de cadena corta; sin embargo, de acuerdo a estos resultados, los valores pueden variar dependiendo de la fuente de electrones utilizada.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la TcGPx

Reductor	K_m (mM)	Oxidante	K_m (μM)	V_{max} (nmol/min-mg)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m $\times 10^3$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	*
GSH/ GR	-	H ₂ O ₂	ND	ND	ND	ND	A
		PCOOH	0.74 \pm 0.09	32 \pm 0.9	-	-	A
	5.9 \pm 0.6	LinOOH	0.6 \pm 0.05	18.2 \pm 0.2	-	-	A
			1 \pm 0.2	-	-	-	D
	7.9 \pm 1.2	t-butOOH	5.6 \pm 0.5	34 \pm 0.9	-	-	A
			4.6 \pm 0.2	-	-	-	D
			52 \pm 4	360 \pm 20	0.11 \pm 0.005	2.2 \pm 0.3	C
	-	-	CumOOH	1.7 \pm 0.2	18.2 \pm 0.2	-	-
TXN/ T(SH) ₂ / TryR	Ver Tabla 1 TXN _{GPx}	CumOOH	16 \pm 1	1899 \pm 155	-	35	B
-	-	t-butOOH	51 \pm 10	1300 \pm 160	0.4 \pm 0.05	8.3 \pm 3	B

*Condiciones experimentales usadas: (A) pH 7.4/ 30°C, GSH (3 mM), GR (1.4U), TcGPx (40 μg), LinOOH (20 μM), t-butOOH (20 μM). (B) pH 8.0 / 30°C TryR (0.5 μM), T(SH)₂ (20 μM), TXN (1 μM), TcGPx (2 μM). (C) pH 7.4/ 30°C, GSH (3 mM), GR (1.4U), TcGPx (2.2 μM). (D) Condiciones similares a "A", excepto que se consideran valores de $K_{m\text{hidroperóxido}}$ verdaderos, debido a que fueron determinados bajo distintas concentraciones de GSH (3, 5, 10 mM). ND actividad no detectada. Datos reportados por Wilkinson *et al.* (2000, 2002) y Patel *et al.* (2010).

La proteína homóloga de *Leishmania major* es la TXNPx tipo II (denominada como TDPx). Con una identidad del 70% con TcGPx, tiene valores de $K_{m\text{TXN}}$ semejantes a los reportados para la TcGPx (2.2 – 3.5 μM), mientras que los valores de $K_{m\text{ROOH}}$ son significativamente mayores ($K_{m\text{H}_2\text{O}_2}$ = 193 – 211 μM ; $K_{m\text{t-butOOH}}$ = 2244 μM ; $K_{m\text{CumOOH}}$ = 207 μM) (König y Fairlamb, 2007).

En *T. cruzi*, la GPxA se encuentra en citosol y glicosoma, mientras que su proteína homóloga GPxB se encuentra en retículo endoplásmico, y tiene una identidad del 30% con aquella. Ambas pueden metabolizar hidroperóxidos de ácidos grasos y fosfolípidos; sin embargo, sólo la GPxA puede metabolizar hidroperóxidos de cadena corta, y ninguna de las dos reduce al H₂O₂; (Krauth-Siegel *et al.* 2007, Irigoín *et al.* 2008). Además, la GPxB no puede ser reducida por TXN, por lo que se cree que su agente reductor es el GSH (Fig. 6) (Wilkinson *et al.* 2002).

1.13 Propiedades bioquímicas de la TXNPx

La TXNPx es una 2-Cys peroxiredoxina típica perteneciente a la familia de las peroxiredoxinas (Prxs). La enzima es activa únicamente en su forma decamérica, compuesta de dímeros formados por subunidades de 22 kDa (Alphey *et al.* 2000; Flohé *et al.* 2002a; Krauth-Siegel *et al.* 2007). Las enzimas pertenecientes a esta familia tienen porcentajes de homología altas; son generalmente ubicuas y muy abundantes en las células y se pueden presentar en diversas isoformas con actividades reductoras de hidroperóxidos y peroxinitrito (Castro y Tomás, 2008). Las Prxs aprovechan las propiedades de la Cys para reducir y oxidar, de manera que no requieren de grupos prostéticos o cofactores como metales para tener actividad (Alphey *et al.* 2000). De acuerdo al número de cisteínas reactivas que tengan y al mecanismo de reacción, se dividen en 1-Cys Prxs y 2-Cys Prxs y estas últimas a su vez se subdividen en típicas y atípicas. Las enzimas de los tres grupos se caracterizan por tener un motivo VCP amino terminal (N-terminal), mientras que las 2-Cys peroxiredoxinas además de éste, tienen otro motivo VCP en el carboxilo-terminal (C-terminal).

De acuerdo a su mecanismo de reacción ping-pong, no se forman complejos ternarios en los que la enzima se une a los dos sustratos, sino que el hidroperóxido primero reacciona con la Cys N-terminal formándose un RSO^- el cual reacciona con un tiol (1-Cys Prxs) ó con la Cys C-terminal de la subunidad adyacente del oligómero (2-Cys Prxs típicas) o con la Cys de la misma subunidad (2-Cys Prxs atípicas). El puente disulfuro resultante es reducido por otra molécula del tiol (1-Cys Prxs), o por una Trx (2-Cys Prxs) (Piñeyro *et al.* 2005; Flohé *et al.* 2002b). La Figura 12 muestra el mecanismo de una 2-Cys Prx típica como la *TcTXNPx*.

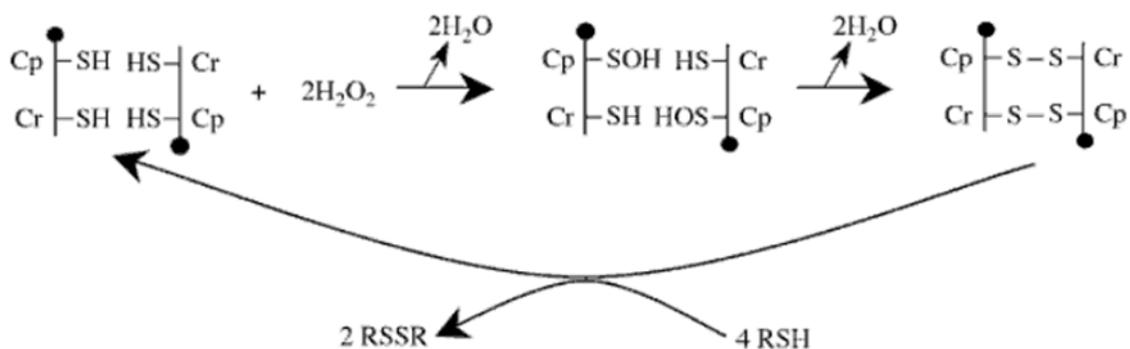


Figura 12. Mecanismo descrito para la *TcTXNPx*. La enzima reacciona de manera ordenada con el hidrógeno peróxido y con la TXN (RSH/RSSR); el paso intermedio es la formación de un derivado del ácido sulfénico. Cp y Cr corresponden a la Cys N-terminal y C-terminal respectivamente. El círculo cerrado hace referencia al extremo amino de cada subunidad. Modificado de Knoops *et al.* 2007.

La TXNPx es una enzima citosólica (cTXNPx), sin embargo existe una homóloga en mitocondria (mTXNPx), la cual tiene aprox. 50% de similitud con la citosólica. Además, en vez de tener los sitios VCP de estas enzimas, el segundo sitio es IPC, lo cual es inusual (Castro y Tomás, 2008).

La TXNPx tiene como sustratos los hidroperóxidos orgánicos de cadena corta, el ONOO^- y H_2O_2 (Nogueira *et al.* 2009). Esta enzima se caracterizó en *T. cruzi* bajo condiciones no saturantes de la vía (Guerrero *et al.* 2000); los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de *TcTXNPx*.

Sustrato	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m $\times 10^3$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
CfTXN2	1.7	1.7	1030
t-butOOH	52		33

Valores reportados por Guerrero *et al.* (2000). Condiciones estándar del medio de reacción: 50 mM HEPES, pH 7.6, 0.1 mM NADPH, 1 mM EDTA, 0.34 U CfTryR, 45 μM T(SH)₂, 1 μM CfTXN1, 1 μM TXNPX y 50 μM t-butOOH.

La TcTXNPx tiene una identidad del 71% con su homóloga en *L. major* (TryP) y *C. fasciculata* (CfTXNPx). La TryP tiene valores de Km_{TXN} de 2.8, 4.3 y 4.9 μM , utilizando H_2O_2 ($Km_{\text{H}_2\text{O}_2} = 6.3 \mu\text{M}$), t-butOOH ($Km_{\text{t-butOOH}} = 10.5 \mu\text{M}$) y CumOOH ($Km_{\text{CumOOH}} = 8.0 \mu\text{M}$), respectivamente (König y Fairlamb, 2007). Por otro lado, la CfTXNPx no presenta saturación ($Km \infty$ y $V_{\text{max}} \infty$) con ninguno de sus dos sustratos (TXN y ROOH) (Montemartini *et al.* 1998, 1999; Flohé *et al.* 2002a).

Se ha descrito que esta enzima presenta inhibición por sustrato, principalmente por H_2O_2 , e inactivación por dilución a concentraciones menores de 300 $\mu\text{g/mL}$ (reportándose que a 150 $\mu\text{g/mL}$ la enzima pierde el 50 % de su actividad después de 2 horas) (Flohé *et al.* 2002a).

1.14 Antecedentes directos del proyecto

De acuerdo a los resultados de Wilkinson *et al.* (2002), la reacción TXN – T(SH)₂ tiene el menor k_{cat}/K_m ($7.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), comparado con el de TXN – GPx ($240 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y la de la reducción del CumOOH por GPx ($35 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$); por otro lado, si estos valores también los comparamos con los reportados por Guerrero *et al.* (2000) para la reacción entre TXNPx – TXN ($1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y el valor para TXNPx – t-butOOH ($33 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), la reacción entre T(SH)₂ y TXN es la menos eficiente cinéticamente, y por lo tanto se ha planteado como un blanco terapéutico. Cada una de estas caracterizaciones se realizó en condiciones distintas de pH y temperatura, por lo tanto se puede esperar que bajo condiciones fisiológicas estas características se modifiquen, ya sea aumentando o disminuyendo la afinidad de alguna de las enzimas por su sustrato, o bien modificando la velocidad de catálisis. Además la baja eficiencia de una reacción enzimática se verá compensada por la concentración de su(s) sustrato(s) *in vivo*, por lo cual la vía no estaría limitada por la enzima.

2. JUSTIFICACIÓN

Desde el punto de vista metabólico, un blanco con alto potencial terapéutico debería ser aquel que: a) no se encuentra en el hospedero y b) sea una enzima(s) con poca actividad y/o tenga una baja eficiencia catalítica (V_{max}/K_m) en el parásito.

Diversos investigadores han propuesto a la reacción de la TXN con el T(SH)₂ como un sitio de intervención terapéutica para inhibir el metabolismo antioxidante en *T. cruzi* (Wilkinson *et al.* 2002); *C. fasciculata* (Gommel *et al.* 1997, Guerrero *et al.* 1999) y *T. brucei* (Hillebrand *et al.* 2003). Sin embargo, los datos cinéticos obtenidos por estos investigadores, trabajando con las enzimas purificadas, en condiciones experimentales no saturantes de sus sustratos (dando valores subestimados de k_{cat}) y en condiciones de pH y temperatura lejanas a las fisiológicas (pH 8 y 25°C) pueden dar ideas erróneas acerca del control que la(s) enzima(s) puede tener en la vía en el parásito vivo. Además, estos estudios no consideran la abundancia de las actividades enzimáticas en las células, de tal manera que un bajo potencial catalítico de la enzima purificada podría compensarse con un incremento en la actividad enzimática/proteína en el parásito. Por otro lado, se deben también considerar las concentraciones *in vivo* de los sustratos de cada enzima, pues aunque su valor de k_{cat}/K_m sea el menor de la vía de reducción de hidroperóxidos, esto también puede compensarse con una alta concentración de sustratos.

Por lo tanto, una caracterización cinética adecuada en condiciones fisiológicas de pH y temperatura de estas enzimas, aunado a la determinación de actividades enzimáticas y de la concentración de metabolitos en el parásito, puede ayudar a la identificación de las enzimas o reacciones menos eficientes de la vía de desintoxicación de peróxidos y por lo tanto a proponer a las más indicadas para su intervención terapéutica.

3. HIPÓTESIS

Si las concentraciones *in vivo* de T(SH)₂ y TXN son saturantes, la transferencia de electrones entre estos dos componentes del sistema de reducción de hidroperóxidos no sería limitante, por lo que el paso menos eficiente desde el punto de vista cinético debe localizarse en otra reacción del sistema, el cual dependerá de los valores de actividad /contenido de proteína mínimos presente en el parásito.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar los potenciales catalíticos (*k_{cat}/K_m*) de las enzimas recombinantes (TXN, GPx y TXNPx) del sistema reductor de hidroperóxidos en *T. cruzi*, para identificar las enzimas/reacciones que pueden limitar la eficiencia del sistema.

4.2 Objetivos particulares

- Clonar los genes que codifican para la TXNPx, GPX y TXN de *T. cruzi*.
- Sobre-expresar las proteína en bacterias y purificar las enzimas
- Caracterizar cinéticamente a las enzimas bajo condiciones pseudo-fisiológicas (pH7.4 / temperatura 37°C).
- Identificar las reacciones menos eficientes del sistema de reducción de hidroperóxidos.

5. METODOLOGÍA

5.1 Obtención de las secuencias de los genes de interés en el GenBank® y diseño de los cebadores

Se realizó la búsqueda de los genes que codifican para TXN, GPX y TXNPx en el GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Las secuencias corresponden a la cepa CL Brener, la cual es un híbrido de dos tipos generales de aislados de *T. cruzi* (Sodré *et al.* 2009).

TXN (# acceso AJ313314) 435pb

```

ATGTCTGGTTTGGCGAAGTACCTCCCCAGCACCATTAAGCTGGTCTCCAAGAGCGGCACC
M S G L A K Y L P S T I K L V S K S G T
GTCAGCCCCATTTCCCTTGCCGGGAAGACGGTGTTTTTTTACTTCTCCGCCTCCTGGTGC
V S P I S L A G K T V F F Y F S A S W C
CCGCCCTGCCGCGGCTTCACCCCGACCCTTGTGGAGTTTTACGAGAAGTTCCGTGAATCG
P P C R G F T P T L V E F Y E K F R E S
AAGA ACTTCGAGGTCGTACTTGTACCTGGGACGACGAGGAGGAGGCGTACAACGGGTAC
K N F E V V L V T W D D E E E A Y N G Y
TTCGCCAAGATGCCATGGCTCGCCATCCCCTTCTCGAGCCGCACAGAGCTGGAGGCCCTC
F A K M P W L A I P F S S R T E L E A L
CGGTCGACTTTTGGCGTGGAGACTATCCCCACAGTTATTGCCGTCAACGCCGACACGGGC
R S T F G V E T I P T V I A V N A D T G
GCCGTGGTCAGCACGAAGGGACGCGAGCGACTTTTGACCGACCCCGAGGGCAAAA ACTTC
A V V S T K G R E R L L T D P E G K N F
CCCTGGTCCGACTAA
P W S D -

```

GPx (# acceso AJ313312) 534pb

ATGTTTCGTTTCGGTCAATTGCTTAGGGCAGCCGAGATGAAAAGCATCTACGAATTTTCAG
 M F R F G Q L L R A A E M K S I Y E F Q
 GTGAACGCAGCCGATGGAAAGCCGTATGATCTCTCGCAGCACAAGGGACATCCACTGCTG
 V N A A D G K P Y D L S Q H K G H P L L
 ATCTACAATGTGGCGAGTAGGTGTGGCTACACGAAGGGTGGCTACGAGACGGCCACGACG
 I Y N V A S R C G Y T K G G Y E T A T T
 CTCTACAACAAGTACAAGGGCCAGGGCTTTACTGTTCTGGCGTTCCCGTGTAACCAATTT
 L Y N K Y K G Q G F T V L A F P C N Q F
 GCCGGGCAGGAGCCGGGGACGGCGCTGGAGGTGAAGGAATTTGCCTGCACGCGGTTTAAAG
 A G Q E P G T A L E V K E F A C T R F K
 GCGGACTTCCCCATCATGGCAAAGATTGACGTGAATGGCAGCAAGGCACATCCGCTGTAT
 A D F P I M A K I D V N G S K A H P L Y
 GAGTTTATGAAGGCAACAATTTCCCGGTCTTTTTGGCACTAAAGCCATCAAGTGGAACTTT
 E F M K A T I P G L F G T K A I K W N F
 ACTTCGTTCCCTTATTGACAGGCATGGTGTTCCCGTGGAGCGTTTTTTCGCCTGGTGCATCT
 T S F L I D R H G V P V E R F S P G A S
 GTGGAAGATATTGAGAAAAAATTTTTGCCGCTTCTGGTGGTGTCTAGGATTTGA
 V E D I E K K L L P L L G G A R I -

TXNPx (# acceso AJ012101) 600pb

ATGTCCTGCGGAGACGCAAAGCTCAACCACCCGGCGCCCGACTTCAATGAGACGGCGCTG
 M S C G D A K L N H P A P D F N E T A L
 ATGCCCAACGGCACCTTCAAGAAGGTGGCTCTCACCTCCTACAAGGGCAAGTGGCTGGTG
 M P N G T F K K V A L T S Y K G K W L V
 CTCTTCTTCTACCCGATGGACTTCACCTTCGTCTGCCCCACAGAGATCTGCCAATTCTCG
 L F F Y P M D F T F V C P T E I C Q F S
 GACCGTGTGAAGGAGTTCTCTGACATTGGCTGCGAGGTGCTTGCATGCTCCATGGACAGC
 D R V K E F S D I G C E V L A C S M D S
 GAGTATTCCCATTTGGCTTGGACAAGCATTGAGCGCAAGCGTGGCGGACTTGGCCAGATG
 E Y S H L A W T S I E R K R G G L G Q M
 AACATCCCCATTCTTGCCGACAAGACCAAGTGCATCATGAAGTCGTATGGTGTGCTGAAG
 N I P I L A D K T K C I M K S Y G V L K
 GAGGAGGATGGCGTGGCGTACCGTGGCCTTTTCATTATCGACCCGAAGCAGAACCTGCGG
 E E D G V A Y R G L F I I D P K Q N L R
 CAGATCACCGTCAACGACCTCCCCGTTGGCCGCGACGTGGACGAGGCCCTTCGCCTTGTG
 Q I T V N D L P V G R D V D E A L R L V
 AAGGCGTTCCAGTTCGTGGAGAAGCATGGCGAGGTGTGCCCCGCAACTGGAAGCCCGGT
 K A F Q F V E K H G E V C P A N W K P G
 GACAAGACGATGAAGCCGGATCCCGAAAAGTCCAAGGAGTACTTTGGTGTGCTGTCGCGTAG
 D K T M K P D P E K S K E Y F G A V A -

Los cebadores diseñados son los siguientes:

TXN

Fw: 5'CGTA CATATG TCTGGTTTGGCGAAGTAC3'

Rw: 3'GAAGGGGACCAGGCTGATT TTCGAA TCG5'

GPx

Fw: 5'GCA CATATG TTTCGTTTCGGTCAATTGCTTAG3'

Rw: 3'GAACCACCACGATCCTAAACT TTCGAA TCG5'

Sitio de restricción para NdeI

Sitio de restricción para HindIII

TXNPx

Fw: 5'CGTA CATATG TCCTGCGGAGACGCG3'

Rw: 3'CCACGACAGCGCATC TTCGAA TAGC5'

Los recuadros muestran los sitios de restricción añadidos con el fin de facilitar su clonación

5.2 Amplificación de los genes

A través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por la siglas en inglés de polymerase chain reaction) se amplificaron los genes que codifican para la TXN, GPx y TXNPx, utilizando como templado el ADN genómico de *T. cruzi* de la cepa Ninoa.

La mezcla de reacción contenía:

- 1.5 mM MgCl₂
- 100 μM dNTPs
- 2% DMSO 10 μg BSA
- 200 ng cebador Fw
- 200 ng cebador Rw
- 650 ng ADN
- 1.25 U Polimerasa

En el caso de TXN y TXNPx, la polimerasa que se utilizó fue la de *Pyrococcus furiosus* (Pfu, marca Fermentas) y para la GPx se utilizó el sistema Expand High-fidelity (marca Roche), que contiene Taq Polimerasa y Tgo Polimerasa. El esquema de amplificación que se utilizó es el siguiente: 95°C por 5 min; 31 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de alineamiento a 60-63°C y 1 min de extensión a

72°C; por último se dio un ciclo de 5 min a 72°C. Tanto para la TXN como para TXNPx, la temperatura de alineamiento fue de 63°C, mientras que para la GPx fue de 60°C.

5.3 Separación por electroforesis de los productos amplificados

Los productos de la reacción de PCR se sometieron a una electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Éste es un método de separación de moléculas de acuerdo a su tamaño molecular cuando se hace pasar una corriente eléctrica a través de una matriz inerte como la agarosa. La agarosa se disuelve por calentamiento en buffer TBE (45 mM Tris, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA) adicionado con 5 µg/mL de bromuro de etidio y se vierte en un molde al cual se le coloca un “peine” para formar los pozos en los que se colocan las muestras a separar. Una vez solidificado el gel, se sumerge en el mismo buffer en una cámara de electroforesis. Las muestras problema (20 µL de la reacción de PCR) y el estándar de peso molecular se preparan en buffer de carga (0.25% azul de bromofenol, 40% sacarosa), se cargan en los pozos dentro del gel y se aplica un voltaje de 100 volts. Las moléculas de ADN cargadas negativamente migran hacia el ánodo, quedando más cerca de éste, aquellas con un peso molecular menor. El bromuro de etidio presente en el gel se intercala entre las bases de ADN de las muestras y fluoresce al exponerse a luz ultravioleta. Las bandas de ADN que muestra el tamaño esperado de acuerdo a la secuencia de nucleótidos de cada gene se cortan para purificar el ADN.

Se utilizó un sistema de purificación de ADN (UltraClean15 de MoBio) que consta de una solución salina de ioduro de sodio donde se disuelve el pedazo de gel a 55°C por 5 min, lo que evita que se resolidifique. Posteriormente se adiciona sílica y se incuba durante 5 min a temperatura ambiente, durante el cual, el ADN se une fuertemente a ésta. Se centrifuga durante 5 s y se retira el sobrenadante. La sílica se resuspende cuidadosamente en una solución de lavado (NaCl/Tris/EDTA/etanol al 50%) y se centrifuga durante 5 s. El sobrenadante se elimina y la sílica se resuspende en agua, lo que favorece la despegada del ADN. Por último se centrifuga durante 5 s y el sobrenadante, el cual contiene el ADN, se transfiere a un tubo limpio.

5.4 Ligación al vector de clonación

El vector de clonación usado para la TXN y GPx fue pGEM®-T Easy vector (marca Promega), para lo cual primeramente se adicionan adeninas en los extremos 5' y 3' de los productos de PCR purificados del gel de agarosa. Esto se hace con la siguiente mezcla de reacción en un volumen de 10 µL:

- 5 µL producto de PCR purificado
- 1X de buffer de reacción para la Taq DNA polimerasa
- 2.5 mM MgCl₂
- 0.2 mM dATP
- 5 U de Taq DNA polimerasa

Esta mezcla se incuba a 70°C por 30 min. Pasado este tiempo, se toman 4 µL de esta mezcla y se les adiciona:

- 5 µL de buffer de ligación rápida 2X (60 mM Tris-HCl pH7.8, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% PEG)
- 0.5 µL (25 ng) pGEM®-T easy vector (Promega)
- 1 µL (3U) T4 DNA polimerasa

La mezcla se incuba a 4°C toda la noche.

Para el producto de la TXNPx se utilizó el vector pJET (CloneJET™ PCR Cloning Kit; marca Fermentas), teniendo en la mezcla de reacción:

- 5 µL buffer de reacción 2X
- 2 µL producto PCR
- 50 ng pJET™ 1.2/blunt Cloning Vector
- 5 U T4 DNA Ligasa

Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min.

5.5 Preparación de células competentes

Se inocularon bacterias *E. coli* Top10 y BL21(DE3) en 5 mL de medio líquido Luria-Bertani (LB; 1% extracto de levadura, 1% triptona, 0.5% NaCl) y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se tomó una alícuota de 500 µL y se inocularon 50 mL de medio líquido LB y se incubó a 37°C el tiempo suficiente para alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0.4 – 0.5, tomando como blanco el medio de

cultivo. El cultivo ya listo se enfrió en hielo por 10 min y se cosecharon las células en condiciones de esterilidad a $2547 \times g$ durante 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en 33 mL de una solución de 0.1 M CaCl_2 estéril y enfriada a 4°C . Las células se incubaron a 4°C por 1 h y se cosecharon como se describió anteriormente. La pastilla nuevamente se resuspendió en 2 mL de una solución de 0.1 M CaCl_2 -17% glicerol.

5.6 Transformación de células competentes.

Células *E. coli* Top10 competentes obtenidas en el inciso anterior, se transformaron por el método de choque térmico con los plásmidos que contienen los fragmentos de DNA clonados obtenidos en el inciso 5.4. Se mezclaron 10 μL de la reacción de ligación con 50 μL de células competentes y se incubó a 4°C durante 30 min. Las muestras se colocaron en un baño a 42°C durante 40 s para inducir el choque térmico; pasado este tiempo, las muestras se transfirieron inmediatamente a 4°C y se incubaron durante 3 min. Debido a que las células requieren un periodo para recuperar la estabilidad membranal, se incubaron con 1 mL de medio LB líquido a 37°C durante una hora. Las células se cosecharon por centrifugación a $450 \times g$ y se plaquearon en medio LB sólido con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. En el caso de la GPx y TXN que se clonaron en el pGEM® T-easy vector, al medio se les adicionó 0.4 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-GAL) para diferenciar las células que contienen al inserto de aquellas que no. El X-GAL les confiere un tono azul a las células que son capaces de romperlo por la acción de la β -galactosidasa; el IPTG induce la expresión del gen que codifica para esta enzima presente en el sitio de clonación múltiple del plásmido; en el caso de que éste se interrumpa por la inserción del fragmento clonado, la enzima no se expresa aún en presencia del inductor, por lo que las colonias que no muestran tinción azul indican que el plásmido contiene un inserto. Por otro lado, el vector pJET™ tiene en su secuencia al gen que codifica para la enzima de restricción *eco47IR*, una enzima letal, de manera que si el plásmido se recirculariza sin inserto, se expresa la proteína y las bacterias no crecen.

5.7 Extracción de plásmido

Para identificar los plásmidos que contienen los fragmento de DNA y posiblemente los genes de interés, se extraen los plásmidos de las bacterias transformantes y se hace un análisis de digestión del ADN con enzimas de restricción.

Para obtener los plásmidos, se seleccionaron 5 transformantes y se cultivaron en 5 mL de medio LB en presencia de los antibióticos (100 µg/mL ampicilina o 30 µg/mL de kanamicina en el caso de plásmido pET28), los cultivos se incubaron a 37°C en agitación durante toda la noche. Posteriormente, las células se cosecharon y se extrajo el DNA plasmídico por el sistema Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (marca Promega). Las células se resuspenden en 250 µL de Cell Resuspension Solution (50 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNasa A), se lisaron agregando 250 µL de Cell Lysis Solution (0.2 M NaOH, 1%SDS). Se agregaron 10µL de Alkaline Protease Solution y se incubó por 5 min. Las muestras se neutralizaron en presencia de un agente desnaturizante para proteína con 350 µL de Neutralization Solution (4.09 M hidrocloreuro de guanidinio, 0.759 M acetato de potasio, 2.12 M ácido acético glacial, pH 4.2). La mezcla se centrifugó a 16000 x g por 10 min. El sobrenadante se decantó en una columna donde el ADN se adsorbe y se centrifugó durante 1 min, y el eluato se descarta. La columna se lavó dos veces sucesivamente con 750 y 250 µL de Wash Solution (60 mM acetato de potasio, 8.3 mM Tris-HCl pH 7.5, 40 µM EDTA pH 8.0, 60% etanol). Finalmente, el DNA se eluyó adicionando 100 µL de agua libre de nucleasas a la columna y se centrifugó a 16000 x g por 1 min.

5.8 Identificación del gen. Análisis de restricción y secuenciación

Al ADN plasmídico purificado de varias transformantes se les realizó una digestión con las enzimas de restricción NdeI + HindIII para determinar si contenían o no inserto. Estas enzimas liberan el inserto del plásmido pero no lo cortan de manera interna.

Por otro lado se les realizó un patrón de restricción de la siguiente manera: la TXN con las enzimas NdeI+Sall; para la TXNPx se realizó una restricción con NcoI tanto del producto de PCR como del inserto NdeI + HindIII purificado; en el caso de la

GPx no se realizó otra restricción. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo en 20 μ L y contenían:

10 μ L muestra de ADN plasmídico

2 μ L buffer 2 (50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT)

10 U en el caso de NdeI, HindIII o Sall

5 U en el caso de NcoI

Las reacciones se incubaron a 37°C durante 2 h. Por otro lado, los insertos contenidos en los plásmidos (TXN en el plásmido pGEM[®] T-easy y las GPx y TXNPx en el plásmido de sobreexpresión pET28) se secuenciaron en un secuenciador automático. Las secuencias de nucleótidos obtenidas se compararon con las reportadas en el GenBank para la cepa CL Brener de *T. cruzi* y sobre las que se diseñaron los cebadores. Una vez que se determinó que los insertos correspondían a los genes de interés y que no tuvieran mutaciones introducidas durante el proceso de amplificación, se clonaron en plásmidos para sobre-expresar las proteínas en bacterias.

5.9 Ligación de los genes al vector de sobre-expresión

El vector de sobre-expresión utilizado para obtener las enzimas fue pET28 (marca Novagen). Este plásmido permite la expresión de proteínas recombinantes en células *E. coli*. (BL21 DE3), las cuales contienen en su genoma el gen que codifica para la T7RNA polimerasa (proveniente del bacteriófago T7) y se expresa en las células bajo el control del operón *lacUV5*. Una vez que la T7 RNA polimerasa se ha expresado en presencia de IPTG (análogo de la lactosa), ésta puede unirse al promotor del gen que codifica para la enzima blanco, presente en el plásmido, nuevamente bajo el control del operón *lacUV5*, es decir en presencia del inductor. De esta manera es posible mantener el gen blanco transcripcionalmente silenciado en ausencia del inductor y conservar al plásmido estable en células que no contienen el gen para la T7 RNA polimerasa, la cual puede ser una proteína potencialmente tóxica. La Figura 13 muestra como se da el control de la expresión de cada uno de los genes.

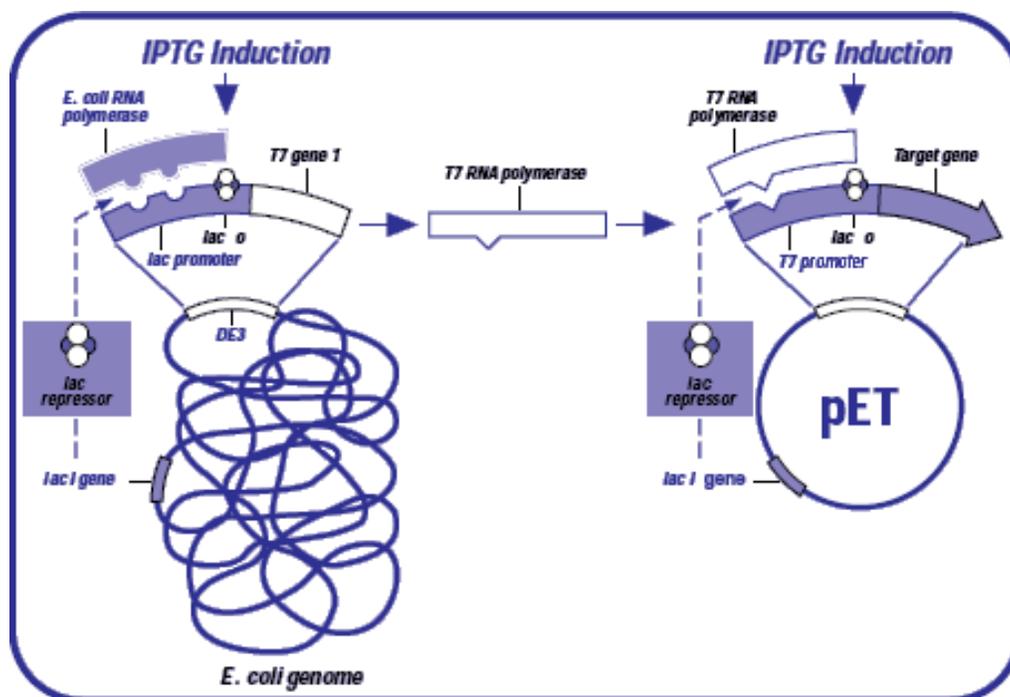


Figura 13. Mecanismo de control del sistema pET. En presencia del inductor (IPTG) el represor Lac I no se une a la región operadora *lac o*, y la célula puede expresar la T7 RNA polimerasa. Lo mismo ocurre en el plásmido, donde se encuentra el gen blanco, precedido por el promotor T7. Modificado de pET System Tutorial tomado de: www.ebiotrade.com/buyf/productsf/Novagen/C183-002.pdf

El plásmido de sobre-expresión pET28 se digirió con NdeI + HindIII y se desfosforiló con fosfatasa alcalina para evitar su recircularización. El plásmido se purificó a través de una extracción con fenol-cloroformo. Por otro lado, los plásmidos que contienen los genes de interés se digirieron con NdeI + HindIII y se purificaron los insertos. El plásmido pET28 digerido y los genes se ligaron en una reacción de 20 μ L. La reacción contiene:

5 μ L pET28 (>50 ng/ μ L)

10 μ L inserto (>25 ng/ μ L)

2 μ L buffer de reacción (200 mM Tris-Cl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 250 μ g/mL albúmina bovina sérica acetilada)

1 μ L T4 DNA ligasa (0.2 U)

La reacción se incubó a 16°C durante toda la noche. Se tomaron 10 μ L para transformar células de *E. coli* BL21(DE3) como se describió anteriormente. Las células

se plaquearon en medio LB sólido en presencia de 30 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina e incubaron a 37°C toda la noche.

5.10 Sobre-expresión de proteínas

Para identificar las clonas que expresan la proteína de interés, se realizó un tamizaje inicial de al menos 5 transformantes obtenidas en el paso anterior. Cada colonia se inoculó en 5 mL de medio LB líquido suplementado con 30 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina y las células se cultivaron a 37°C en agitación hasta que el cultivo llegó a una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.6-0.8$. Se indujo la expresión de la proteína con la adición de IPTG (concentración final de 0.4 mM) y el cultivo se continuó a 30°C durante toda la noche.

La sobreexpresión de las proteínas en cada transformante se monitoreó por electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE; sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). De cada uno de los diferentes cultivos de las transformantes así como de bacterias sin plásmido tratadas de manera similar (control), se tomaron muestras de 20 μL , se les adicionó 5 μL de buffer de carga (10% glicerol, 10% SDS, 0.02% azul de bromofenol, 5% β -mercaptoetanol) y se rompieron las células por ebullición durante 5 min. Las muestras se cargaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 15% junto con un estándar de peso molecular para proteínas. Las proteínas se separaron en una cámara de electroforesis (marca BioRad) aplicando un voltaje de 100 volts. El gel se tiñó con una solución de azul de coomassie (50% MetOH, 7.5% ácido acético, 0.2% azul brillante de coomassie R-250) y se destiñó con una solución desteñidora (50% MetOH, 7.5% ácido acético).

Ya identificadas las células que sobre-expresan en gran abundancia cada proteína, se realizaron cultivos de 25 mL de medio LB líquido + kanamicina de células transformadas y no transformadas de la manera descrita anteriormente. Las células se cosecharon y se resuspendieron en 10 mL de buffer de lisis cuya composición es 100 mM trietanolamina (TEA), 300 mM NaCl, 2 mM imidazol. Las células se rompieron por sonicación en un sonicador Branson con 10 ciclos de 1 min sonicación (al 10-15 % de output total) y 1 min enfriamiento. El lisado celular se centrifugó a 12000 x g durante 15 min. Se recuperó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 10 mL de buffer de lisis. Las proteínas de cada una de las fases (20 μL) y el estándar de peso

molecular de proteína se separaron por SDS-PAGE como se describió anteriormente. El procesamiento del gel también fue el mismo. Por comparación con el patrón de sobrenadante/precipitado de las células sin plásmido, se determinó si las proteínas de interés particionan principalmente en el sobrenadante. En caso de que la proteína se encontrara principalmente en el precipitado, se ensayarían nuevos protocolos de temperatura y tiempo de inducción de la sobre-expresión.

5.11 Purificación de proteínas

De acuerdo al diseño de la clonación de los genes en el vector pET28, las proteínas recombinantes se expresan en la bacteria con una cola de 6 histidinas en sus extremos N-terminal para facilitar su purificación. Se prepararon cultivos de 250 mL para el caso de la TXNPx y de 500 mL para TXN y GPx de medio líquido LB + kanamicina de la manera descrita anteriormente de las transformantes. Las células se cosecharon a 2547 x g durante 10 min. En el caso de la TXN, al precipitado celular se le dieron 2 ciclos de congelación con nitrógeno líquido a -70°C y descongelación a temperatura ambiente. Las muestras se resuspendieron en 10 mL de buffer de lisis, se sonicaron por 7 ciclos y el lisado se centrifugó como se describió anteriormente.

Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad con metales con una resina comercial acoplada a cobalto (TALON metal-affinity resin, marca Clontech). El sobrenadante conteniendo las proteínas solubles se mezcló con 1 mL de la resina y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente bajo lenta agitación con el fin de que la proteína sobre-expresada se una a la resina a través de la etiqueta de histidinas. Transcurrido este tiempo, la resina se separó del sobrenadante por centrifugación a 832 x g durante 5 min. Se realizaron tres lavados a la resina (para eliminar el pegado inespecífico de proteínas) con 10 mL de buffer de lisis, incubando 10 min con agitación suave y centrifugando 5 min para coleccionar la resina. En el tercer lavado, la resina se vertió en una columna de cromatografía, que consistente en una jeringa de 15 mL con un filtro en su parte inferior. La resina presente en la columna se lavó con 10 mL de buffer de lisis en presencia de 10 mM de imidazol. La proteína se eluyó con 5 mL de buffer de lisis suplementado con 100 mM de imidazol. Las proteínas se concentraron en filtros tipo Amicon (marca Millipore) con un corte de 30 kDa en el caso de la TXNPx;

en el caso de la GPx primero se pasó por un filtro de corte de 30 kDa para eliminar contaminantes de bajo peso molecular y se concentró en un filtro de corte de 10 kDa; la TXN solamente se concentró por filtración con un corte de 10 kDa.

Para mantener las enzimas estables durante el almacenamiento, se les agregó glicerol a una concentración final del 50% y se guardaron a -20°C. El límite máximo de almacenamiento fue de 1 semana.

5.12 Cuantificación de proteínas

La proteína se cuantificó por el método de Lowry (Lowry *et al.* 1951). Debido a que el imidazol del buffer de purificación tiene reacción por éste método, se eliminó de la muestra de proteína. Se tomaron 5-20 μ L por duplicado de las proteínas purificadas y se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final del 13% y se incubó toda la noche a 4°C. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 20817 x g a 4°C. La proteína precipitada se resuspendió en 100 μ L de SDS al 1%.

Para la cuantificación de la proteína, se construyó una curva patrón de BSA de 0, 5, 10, 20, 40 y 60 μ g en un volumen final de 100 μ l. Tanto la curva patrón como las muestras se hicieron reaccionar con 1.0 mL de una mezcla que contiene 1.0 mL de solución B (0.4% CuSO₄) por cada 50 mL de solución A (1% SDS, 2% Na₂CO₃, 0.4% NaOH y 0.16% de tartrato de Na-K). Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se les agregó 100 μ L de reactivo de folin-Ciocalteaus diluido 1:2 y se incubó durante 30 min. Se midió la absorbancia a 660 nm utilizando como blanco 1 mL del reactivo de Lowry y 100 μ L de reactivo de folin.

5.13 Ensayos enzimáticos

Para la determinación de los parámetros *K_m* y *V_{max}* de las enzimas de interés se utilizó un sistema reconstituido de la vía antioxidante similar al de la Figura 7 para monitorear la oxidación del NADPH a 340 nm. Los ensayos se realizaron en 0.5 mL a 37 °C utilizando como buffer de ensayo 40 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA y utilizando TryR recombinante (Olin-Sandoval, tesis de doctorado en curso), la cual se sobre-expresa en células *E. coli* BL21 y se purifica de manera similar a la descrita para las enzimas caracterizadas en esta tesis. El ensayo se realizó bajo condiciones de

velocidad inicial (15 min máximo) manteniendo limitante la enzima a medir y en ausencia de producto, se varió la concentración de su sustrato y se saturó el resto de los reactantes. Antes de iniciar la reacción con la enzima, se incubaron el resto de los componentes con hidroperóxido durante 30 – 60 s, con el fin de cuantificar la reacción espuria entre éste y el tripanotión, y así poder restar dicha basal a la pendiente dada por la reacción enzimática específica. Para llegar a los ensayos enzimáticos estándar que se describen a continuación, previamente fue necesario realizar al menos una curva de saturación para cada enzima y sustrato, con base en los valores reportados en la literatura, y así determinar la concentración en la que se obtiene la V_{max} .

5.13.1 Curva de saturación de TXN por T(SH)₂

La reacción contenía buffer de ensayo, 160 μM NADPH, 0.5 μM TryR, 20 μM TXNPx, T(SH)₂ 0 – 400 μM y se trazó una basal adicionando 520 μM t-butOOH; la reacción se inició adicionando 0.12 – 0.16 μM TXN.

5.13.2 Curva de saturación de GPx por TXN

El buffer de ensayo fue 160 μM NADPH, 0.5 μM TryR, 400 μM T(SH)₂, TXN 0 – 22 μM ; la basal se determinó adicionando 1 mM CumOOH y la reacción se inició con 0.030 – 0.076 μM GPx.

5.13.3 Curva de saturación de GPx por CumOOH

El buffer de ensayo fue 160 μM NADPH, 0.5 μM TryR, 400 μM T(SH)₂, 22 μM TXN; se monitoreó la reacción espuria adicionando 0 – 1 mM CumOOH y la reacción se inició con GPx 0.054 – 0.145 μM .

5.13.4 Curva de saturación de TXNPx por TXN

El buffer de ensayo fue 160 μM NADPH, 10 nM TryR, 45 μM T(SH)₂, 0 – 20 μM TXN; la reacción espuria se determinó adicionando 120 μM t-butOOH; posteriormente, la reacción se inició adicionando 1 μM TXNPx.

5.13.5 Curva de saturación de TXNPx por hidroperóxido

El buffer de ensayo fue 160 μM NADPH, 10 nM TryR, 45 μM T(SH)₂, 1 μM TXN; se trazó una basal al adicionar 0 – 800 μM de CumOOH ó 0 – 700 μM de t-butOOH, la reacción se inició adicionando 1 μM TXNPx.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Amplificación de los genes que codifican para la TXN, GPx y TXNPx de *T. cruzi*

En el banco del genoma de *T. cruzi* de la cepa CL Brener se identificaron las secuencias de los genes que codifican para las enzimas a estudiar. Basándose en las secuencias de nucleótidos de los extremos 5' y 3' (ver Metodología), se diseñaron cebadores para amplificar los genes correspondientes de *T. cruzi* de la cepa Ninoa (tipo 1) la cual fue aislada en México (Espinoza *et al.* 2010).

A partir del DNA genómico de *T. cruzi* de dicho aislado y con los cebadores, se amplificó por PCR un fragmento para cada uno de los genes. La Figura 14 muestra la electroforesis en geles de agarosa iluminados con luz UV, en donde se observó que cada amplificado tenía el tamaño esperado de acuerdo a la secuencia de los genes de la cepa de *T. cruzi* CL Brener.

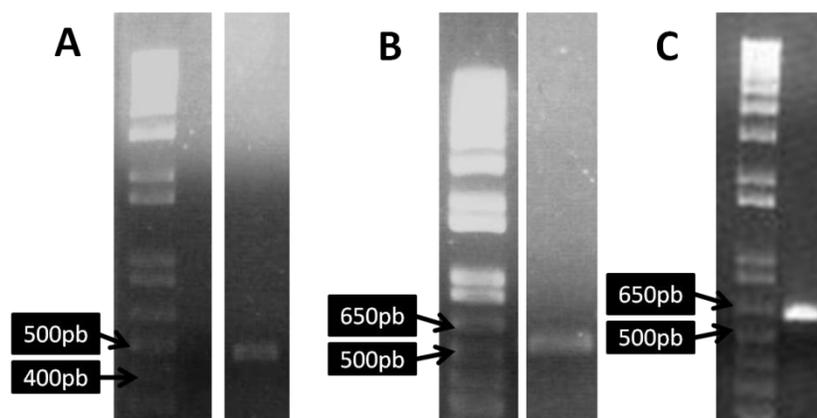


Figura 14. Electroforesis de los productos de la reacción de PCR. Gel de agarosa al 0.8% que muestra las bandas de amplificación por PCR utilizando los cebadores para: A) TXN (435 pb); B) GPx (534 pb); C) TXNPx (600 pb).

6.2 Clonación de los fragmentos y transformación en bacterias

Los fragmentos de DNA amplificados se purificaron del gel y se ligaron a los vectores de clonación pGEM[®]-T easy o pJET[™] (ver Metodología). Posteriormente se transformaron células *E. coli* Top 10 para obtener suficientes copias de cada plásmido. Para seleccionar aquellas clonas que contuvieran el plásmido, la mezcla de transformación se plaqueó en medio sólido de LB+ampicilina. De las clonas que crecieron, para el caso de la transformación con pGEM, se seleccionaron aquellas que fueran blancas, lo cual indica que el marco de lectura de la β -galactosidasa se vio interrumpido por la inserción del fragmento de interés y no pueden sintetizar la enzima, la cual rompe el sustrato cromogénico X-GAL (ver Metodología). En el caso del pJET, las clonas que no contienen inserto no crecen.

Aproximadamente 5 colonias positivas se cultivaron en 3 mL de medio para purificar los plásmidos. Para identificar que el plásmido contuviera el inserto, se realizó una doble digestión de las muestras con las enzimas NdeI y HindIII, las cuales liberan al inserto del plásmido.

De las clonas positivas a la presencia del inserto, se seleccionó solamente una y se confirmó el análisis de restricción como se describió en la Metodología. La Figura 15 muestra que en cada restricción se observó 1) una banda con el tamaño esperado para cada gen; 2) el plásmido sin inserto y linearizado de 3015 pb; 3) para el gen de la TXN se muestra la restricción interna, donde se observan bandas de aprox. 300 y 130 pb, correspondientes a los sitios NdeI y Sall; 4) para el gen de TXNPx se muestra la restricción del inserto de 600 pb purificado, observándose dos bandas correspondientes a 370 y 230 pb, pues el sitio de restricción para NcoI está en la posición 230 del inserto. La GPX no tiene sitios de restricción internos para las enzimas que tenemos en el laboratorio.

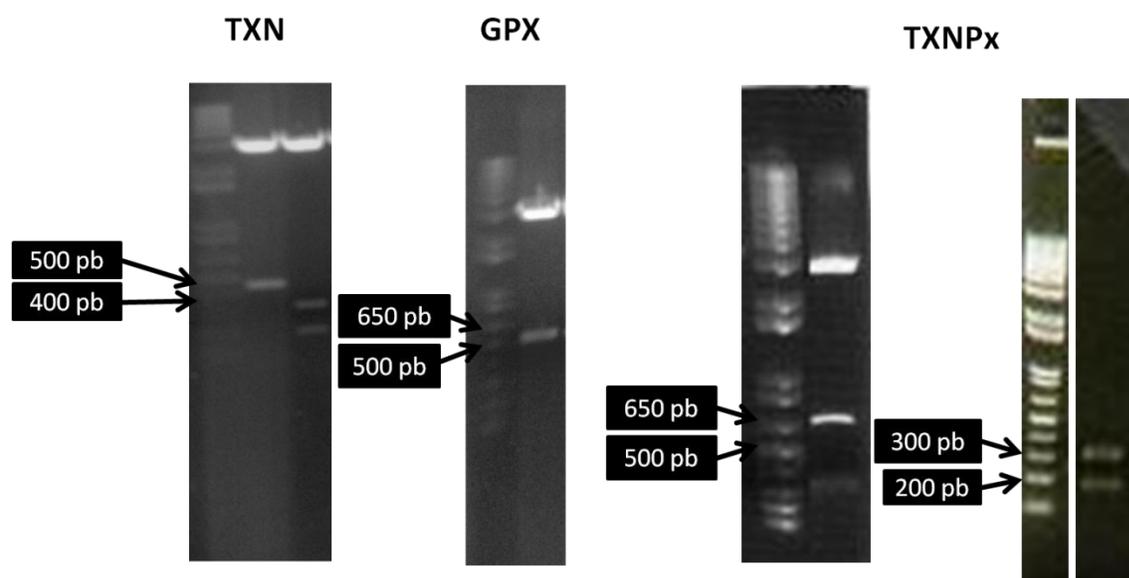


Figura 15. Clonación de los amplificadores en los vectores pGEM-T-easy y CloneJet. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% que muestra la restricción del vector de clonación con las enzimas NdeI/HindIII. Pesos moleculares son TXN 435 pb; GPx de 534 pb; y TXNPx 600 pb.

6.3. Análisis de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos

El plásmido de una clona positiva para cada gen se sometió a secuenciación automática de nucleótidos. Las secuencias obtenidas se tradujeron a secuencia de aminoácidos y se compararon con las secuencias reportadas para las enzimas de *T. cruzi* CL Brener y las secuencias de otros tripanosomátidos.

Se obtuvieron porcentajes de identidad a nivel de aminoácidos del 99% para TXN y del 98% para GPx y TXNPx entre las cepas CL Brener y Ninoa de *T. cruzi*. Para la TXN se obtuvieron porcentajes de identidad de 66, 63 y 62% entre la enzima clonada y las de *L. braziliensis*, *C.fasciculata* y *T. brucei* respectivamente. La GPx clonada tuvo porcentajes de identidad del 73, 70, 66 y 64%, comparada con las enzimas homólogas de *T. brucei*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, y *L. major*, respectivamente. Para el caso de la TXNPx clonada, los porcentajes de identidad con sus homólogas de *C.fasciculata*, *L. braziliensis* y *L. major* fueron del 70% y 69% con la de *L. infantum*.

TXN

CL Brener#Acc.AJ313314 MSGLAKYLPSTIKLVSKSGTVSPISLAGKTVFFYFSASWCPPCRGFTPTL
 Ninoa MSGLAKYLPSTINLVSKSGTVSPISLAGKTVFFYFSASWCPPCRGFTPTL
L. braziliensis MSGLNKHLPGVVTLQKQQSEVSVSSLSGKTVFFYFSASWCPPCRGFTPLL
C. fasciculata MSGLDKYLPGIEKLRRGDGEVEVKSLAGKLVFFYFSASWCPPCRGFTPQL
T. brucei MSGLAKYLPGATNLLSKSGEVSLSGLVKGTVFLYFSASWCPPCRGFTPVL
 **** *:***. .* .. *. ** ** **:***** * *

CL Brener#Acc.AJ313314 VEFYEFKRESKNFEVVLVTWDEEEAYNGYFAKMPWLAI PFSRTELEAL
 Ninoa VEFYEFKRESKNFEVVLVTWDEEEAYNGYFAKMPWLAI PFSRTELEAL
L. braziliensis IEFYEKYHDSKNLEVILVTWDEEEEGFNYYAKMPWLAI PFSQRHLVEGL
C. fasciculata IEFYDKFHESKNFEVVFCTWDEEEDGFAGYFAKMPWLAVPFAQSEAVQKL
T. brucei AEFYEKHHVAKNFEVVLISWDENESDFHDYVGKMPWLALPFDQRSTVSEL
 :*. : **:: : **:*. : .*:*****:*. . : *

CL Brener#Acc.AJ313314 RSTFGVETIPTVIAVNADTGAVVSTKGRERLLTDPEGKNFPWSD--
 Ninoa RSTFGVETIPTVIAVNADTGAVVSTKGRERLLTDPEGKNFPWSD--
L. braziliensis TKAFKVESIPTVIGVCADTGDVVTTRARHALTQDPEGEQFPWRD--
C. fasciculata SKHFNVESIPTLIGVDADSGDVVTTRARATLVKDPEGEQFPWKDAP
T. brucei GKTFGVESIPTLITINADTGAI IGTQARTRVIEDPDGANFPWPN--
 . * **:***:* : **:* : : *:* : **:*. : **:

GPx

L. infantum -----MSIYDFKVNQSDHQPYDLGQHKGHPLLIYNVASKCGFT
L. major -----MSIYDFKVNQSDHQPYDLGQHKGHPLLIYNVASKCGFT
L. braziliensis -----MSIYDFQVNDSDHQPYNLSQHKGHPLLIYNVASKCGYT
 CL Brener#Acc.AJ313312 MFRFGQLLRAAEMKSIYEFQVNAADGKPYDLSQHKGHPLLIYNVASCYGT
 Ninoa MFRFGQLLRAAEMKSIYEFQVNAADGKPYDLSQHKGHPLLIYNVASCYGT
*T. brucei*GPXIII -MLRSSRKKMSAASIFDFEVLADHFKPYNLVQHKGSPLLIYNVASKCGYT
 :*: * : **:*. : **:

L. infantum KGGYETATTLYNKYKHLGFTVLAFCNQFAGQEPGTEEEVKEFACTRFKAE
L. major KGGYETATALYNKYKHLGFMVLAFCNQFAGQEPGTEEEVKSFACTRFKAE
L. braziliensis KSGYETATTLYEKYKGRGFTVLAFCNQFAHQEPGTEAEVKTFACTRFKAN
 CL Brener#Acc.AJ313312 KGGYETATTLYNKYKQGFTVLAFCNQFAGQEPGTALEVKEFACTRFKAD
 Ninoa KGGYETATTLYNKYKQGFTVLAFCNQFAGQEPGTALEVKEFACTRFKAD
*T. brucei*GPXIII KGGYETATALYNKYKSQFTVLAFCNQFAGQEPGTEEEIKEFVCTKFKAE
 *.*****:*** ** *****. ***** *:*.**:*:***:

L. infantum FPIMEKVCVNGEHEHPLYHYLKSCKGILGTTFVKWNFTAFLVDKDGHPVC
L. major FPIMEKVCVNGEHEHPLYHYLKNCTCKGILGTTLVKWNFTAFLVDKDGHAVC
L. braziliensis FPIMEKVNNGEKEHPLYCYLKNCTCKGILGTTLVKWNFTSFLVDKDGHAVH
 CL Brener#Acc.AJ313312 FPIMAKIDVNGSKAHPLEYEFMKATIPGLFGTKAIKWNFTSFLIDRHGVPVE
 Ninoa FPIMAKIDVNGDKAHPLEYEFMKARI PGLFGTKAIKWNFTSFLIDRHGVPVE
*T. brucei*GPXIII FPIMAKINVNGENAHPLYEYMKKTKPGILATKAIKWNFTSFLIDRDGVPVE
 **** *: ***. : ***. : * * :*. : *****:***:*. *

L. infantum RFAPGATVSEIEKLLPLLQADSDGAKVLSSTQS
L. major RFAPGATVSEIEKLLPLLQADSDGAKVLPSTQS
L. braziliensis RFPPGATVEEIEKLLVPLLDAASSNL-----
 CL Brener#Acc.AJ313312 RFSPGASVEDIEKLLPLLGGARI-----
 Ninoa RFSPGASVEDIERKLLPLLGGARI-----
*T. brucei*GPXIII RFSPGASVKDIEEKLIPLLGSARL-----
 .:*. : ***. : ***. : **

TXNPx

<i>L. major</i>	MSCGNAKINSPAPSFEEVALMPNGSFKKISLSSYKQKVVVLFYPLDFTF
<i>L. infantum</i>	MSCGDAKINCPAPPFEEVALMPNGSFKKISLAAYKQKVVVLFYPLDFTF
<i>L. braziliensis</i>	MSCGDAKMNEPAPPFEEMALMPNGSFKKITLASYKQKVVVLFYPLDFTF
<i>C. fasciculata</i>	MSCGAAKLNHPAPEFDDMALMPNGTFKKVSLSSYKQKYVVVLFYPMDFTF
CL Brener#Acc.AJ012101	MSCGDAKLNHPAPDFNETALMPNGTFKKVALTSYKQKWLVLFFYPMDFTF
Ninoa	MSCGDAKLNHPAPDFNETALMPNGTFKKVALSSYKQKWLVLFFYPMDFTF **** *: * ** * : : *****:***: :*: :*****:*****:****
<i>L. major</i>	VCPTEVIAFSDSVSRFNELNCEVLACSIDSEYAHLQWTLQDRKKGGLGTM
<i>L. infantum</i>	VCPTEIIAFSENVSRFNELNCEVLACSMDSYAHLQWTLQDRKKGGLGAM
<i>L. braziliensis</i>	VCPTEIIQFSDSIKRFNELDCEVMSCSVDSEYAHLQWTLQERKKGGLGPM
<i>C. fasciculata</i>	VCPTEIIQFSDDAKRFAEINTEVISCSCDSEYSHLQWTSVDRKKGGLGPM
CL Brener#Acc.AJ012101	VCPTEICQFSDRVKEFSDIGCEVLACSMDSYSHLAWTSIERKRGGLGQM
Ninoa	VCPTEICQFSDRVKEFSDIGCEVLACSMDSYSHLAWTSVERKRGGLGQM *****: ** : ..* : : . ** : : * * *****: * * ** : ** : ***** *
<i>L. major</i>	AIPMLADKTKSIARSYGVLEESQGVAYRGLFIIIDPHGMLRQITVNDMPVG
<i>L. infantum</i>	AIPMLADKTKSIARAYGVLEEKQGVAYRGLFIIIDPNGMVRQITVNDMPVG
<i>L. braziliensis</i>	EIPMLADKTKCICRAYGVLDKKGVAIRGLFIIIDPKGILRQIIIVNDMPVG
<i>C. fasciculata</i>	AIPMLADKTKGIARAYGVLDSDSGVAYRQVFIIDPNGKLRQIIINDMPIG
CL Brener#Acc.AJ012101	NIPILADKTKCIMKSYGVLKEEDGVAYRGLFIIIDPKQNLRQITVNDLPVG
Ninoa	NIPILADKTKCIMKSYGVLKEEDGVAYRGLFIIIDPKQNLRQITVNDLPVG ** : ***** * : : ***** .. *****: *****: : *** : ** : ** :
<i>L. major</i>	RSVEEVLRLLEAFQFVEKHGEVCPANWKKGAPTMMKPEPNASVEGYFSKQ
<i>L. infantum</i>	RNVVEEVLRLLEAFQFVEKHGEVCPANWKKGAPTMMKPEPKASVEGYFSKL
<i>L. braziliensis</i>	RNVVEALRLLEALQFVEKHGEVCPANWKKGDATMKPERQASIEGYFSTV
<i>C. fasciculata</i>	RNVVEEVIRLVEALQFVEEHGEVCPANWKKGDAKKKEGH-----
CL Brener#Acc.AJ012101	RDVDEALRLVKAFQFVEKHGEVCPANWKPDKMTMKPDPEKSKEYFGAVA
Ninoa	RDVDEALRLVKAFQFVEKHGEVCPANWKPDKAMKPDPEKSKEYFGAVA * . * : . : * : : * : *****: ***** * *

Figura 16. Alineamientos múltiples de diferentes secuencias de TXN, GPx y TXNPx de distintos tripanosomátidos. “CL Brener” indica las secuencias reportadas para cada gen. “Ninoa” muestra las secuencias obtenidas por secuenciación automática de los genes clonados. “*” indica que el aminoácido se conservan en todas las secuencias, “:” indica que las diferencias conservan el tipo de aminoácido, “.” se muestra cuando al menos una secuencia no conserva el tipo de aminoácido, pero en la mayoría sí lo conserva, “ ” se muestra cuando las diferencias no conservan el tipo de aminoácido. Los residuos de las proteínas involucrados en las oxidación/reducción se muestran sombreados

En la Figura 16 se puede observar que los sitios involucrados en la oxidación/reducción de cada proteína, se conservan entre la secuencia reportada (CL Brener) y los genes clonados para esta tesis (Ninoa).

6.4 Sobre-expresión de las proteínas

Una vez confirmada la identidad de cada gen, estos se ligaron al vector de sobre-expresión pET28 con el que se transformaron células de *E.coli* de la cepa BL21(DE)3. Por análisis de restricción con NdeI-HindIII se seleccionaron aquellas clonas que contuvieran el plásmido con el inserto y se realizaron cultivos de 5 mL de medio LB + kanamicina. Se indujo la expresión de la proteína adicionando IPTG y continuando el cultivo a 30°C. La Figura 17 muestra un gel de poliacrilamida en donde se separaron las proteínas de distintas colonias y en donde se comparó el patrón con células control no transformadas con el plásmido.

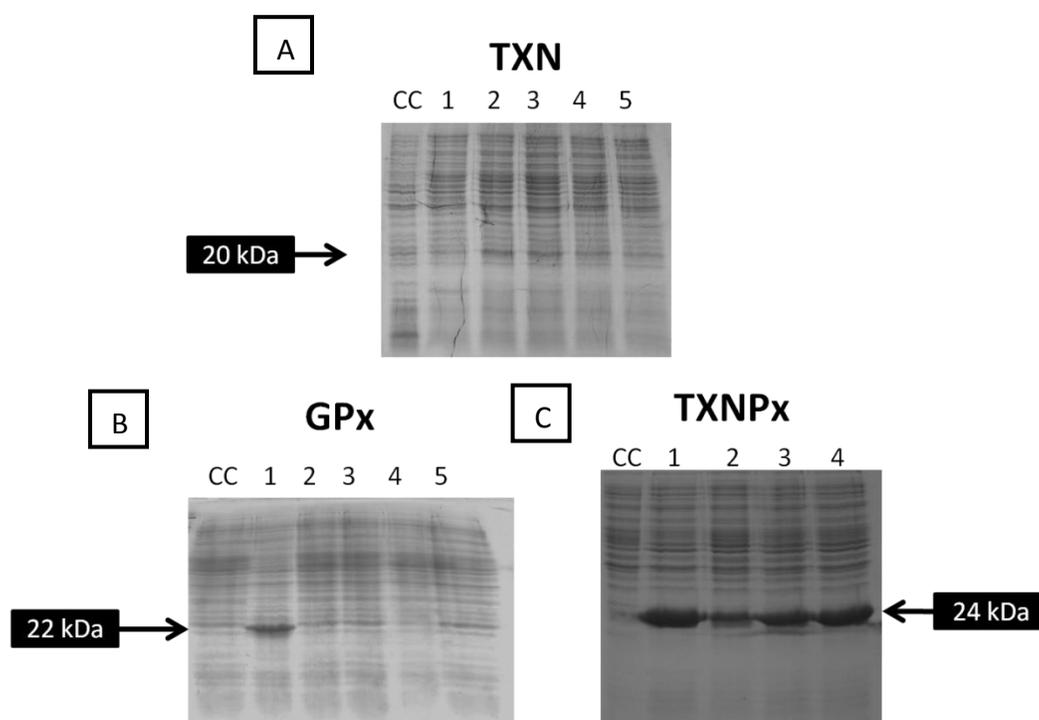


Figura 17. Sobre-expresión de las proteínas en células de *E.coli* BL21(DE3). SDS-PAGE de una alícuota de cultivos de diferentes clonas (1 – 5) que sobre-expresan las proteínas de interés (A TXN; B GPx; C TXNPx), las cuales se señalan con una flecha que indica su tamaño. CC indica células control no transformadas.

Debido a que hay variabilidad en la cantidad de proteína sobre-expresada, se ensayaron diferentes protocolos de sobre-expresión. Después de la adición del inductor, las células se cultivaron a 16, 30 y 37 °C, observándose que la mayor sobre-expresión se da a los 30 °C en el caso de las tres proteínas.

Una vez que se seleccionaron las células que sobre-expresaban mejor cada proteína, se tuvo que determinar si la proteína se expresaba en forma soluble (adecuada para su purificación) o insoluble. Se cultivaron en 50 mL de medio líquido LB+kanamicina, se indujo la expresión, se cosecharon las células y se rompieron por sonicación. El extracto celular se centrifugó para separar la fracción soluble (donde se espera que estén las proteínas) de la no soluble (precipitado). La Figura 18 muestra el gel de poliacrilamida-SDS en donde se separaron las proteínas y se hizo la comparación con las fracciones soluble (sobrenadante) e insoluble (precipitado) de células control no transformadas con el plásmido. Se puede observar que la GPx y TXNPx se sobre-expresaron preferencialmente en la parte soluble. En el caso de la TXN, parte de la proteína se observó en la fracción insoluble, debido a la remanencia de células sin lisar y a la posible formación de cuerpos de inclusión; sin embargo, una cantidad considerable de la proteína se expresó en forma soluble.

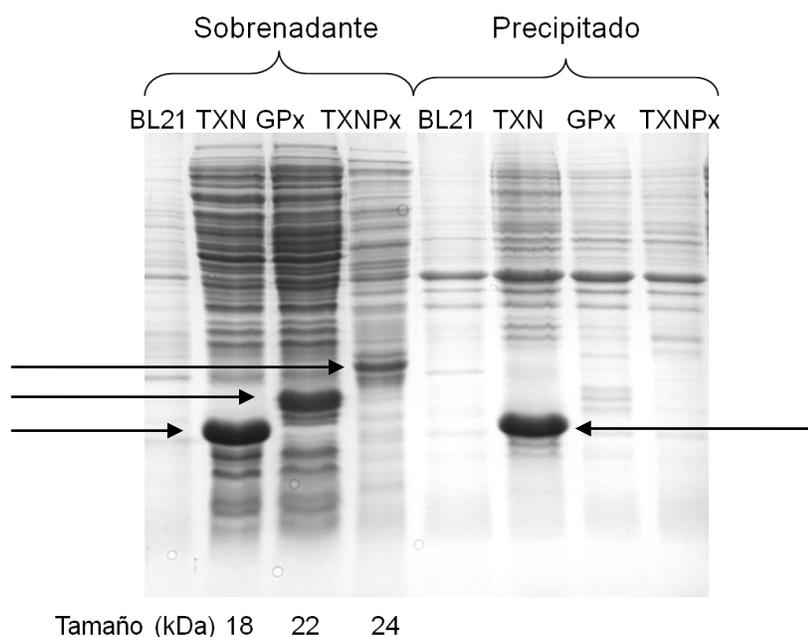


Figura 18. Sobre-expresión de las proteínas en forma soluble. SDS-PAGE de las fracciones solubles (sobrenadante) e insolubles (precipitado) de los extractos celulares. Las flechas indican las bandas que corresponden a las proteínas de interés. BL21 muestra las fracciones de células no transformadas.

6.5 Purificación de las proteínas

Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad a metales. La fracción soluble de células que expresaron las proteínas se incubó con una resina acoplada a cobalto, la cual se lavó 4 veces con dos concentraciones diferentes de imidazol para finalmente eluir la proteína a una mayor concentración del compuesto (ver Metodología). En la Figura 19 se muestra el perfil de proteínas de los diferentes pasos del proceso de purificación de las tres proteínas, analizadas a través de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. En la Figura 19A se puede observar que las bandas que no corresponden a la proteína fueron desapareciendo conforme la realización de los lavados con 2 mM imidazol, en el último carril se observa que con 10 mM imidazol, las proteínas de interés comenzaron a eluir de la resina, sin embargo dicho lavado fue necesario para obtener las proteínas más puras. En el panel inferior se muestra el corrimiento de alícuotas de las proteínas purificadas. El análisis densitométrico del gel indicó que las proteínas alcanzaron en promedio un 90% de pureza al final del proceso de purificación.

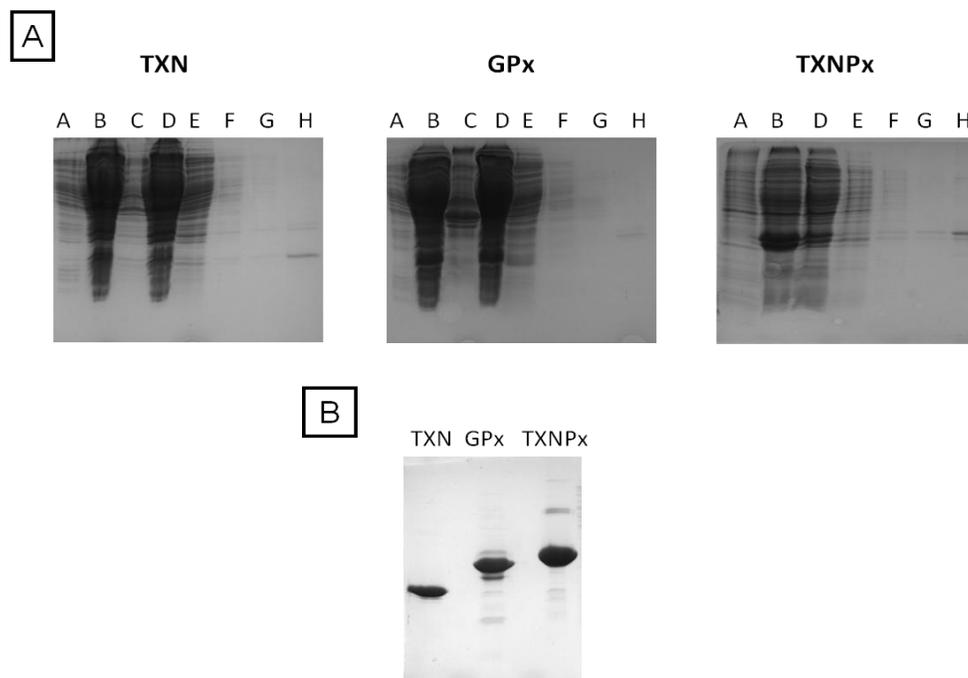


Figura 19. Perfil de proteínas en el proceso de purificación de las tres enzimas, a través de cromatografía de afinidad a metales. Geles de poliacrilamida-SDS al 15% en los que se separaron alícuotas tomadas en los diferentes pasos de purificación. “A”: (A) fracción soluble de células BL21; (B-H) purificación de las enzimas (B) fracción soluble; (C) fracción insoluble; (D) eluato que no se pegó a la columna; (E), (F), (G) lavados 1, 2 y 3 con buffer con 2 mM imidazol; (H) lavado 4 con buffer 10mM de imidazol. “B”: Alícuotas de las enzimas purificadas y concentradas.

El rendimiento para cada proteína fue de 0.37 ± 0.13 mg totales para TXN (n=8); 0.14 ± 0.07 mg totales para GPx (n=16) y 4.0 ± 1.5 mg totales para TXNPx (n=8), partiendo de 500 mL de células cultivadas en el caso de TXN y GPx y de 250 mL para TXNPx.

6.6 Caracterización cinética

Una vez que se obtuvieron las proteínas TXN, GPx y TXNPx en su forma purificada, se determinaron los parámetros cinéticos K_m y V_{max} en condiciones de pH 7.4 y temperatura de 37°C, las cuales son cercanas a las fisiológicas de los parásitos. Los datos obtenidos se graficaron en el programa Origin 7.5 y se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 1)

6.6.1 Propiedades cinéticas de la TXN

Para determinar los parámetros cinéticos de la TXN en un ensayo enzimático similar al esquema mostrado en la Figura 7, se mantuvo limitante la enzima a medir, se varió la concentración del $T(SH)_2$ y se mantuvo en exceso el resto de las enzimas y de los sustratos. En la Figura 20 se muestra un gráfico representativo de la curva de saturación.

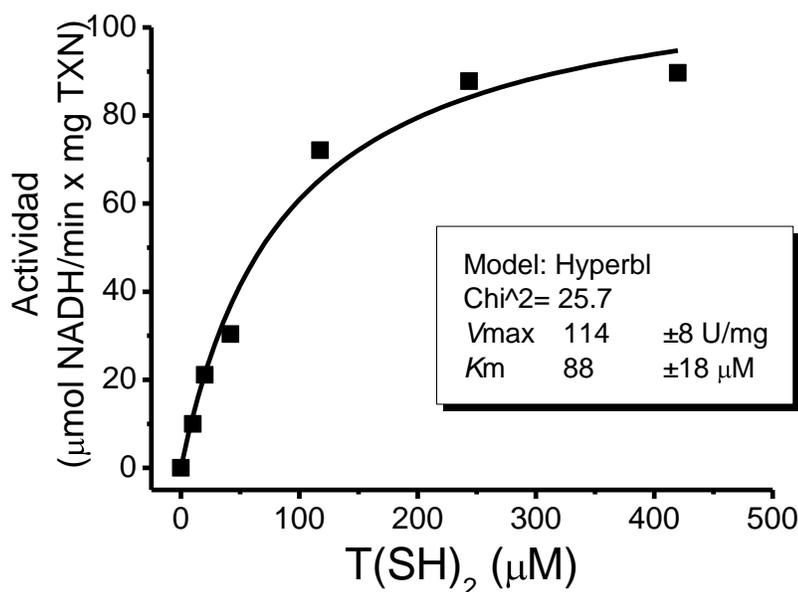


Figura 20. Curva de saturación de TXN por T(SH)₂ en condiciones de pH y temperatura cercanas a las fisiológicas de los parásitos. Curva representativa de tres repeticiones. Tiempo máximo de reacción 15 min. Condiciones 160 μM NADPH, 0.5 μM TryR, 20 μM TXNPx, 0 – 400 μM T(SH)₂, 520 μM t-butOOH, 0.12 – 0.16 μM TXN.

Como se describió en la sección de Metodología, para determinar la K_m de la TXN por T(SH)₂, se utilizó como enzima acoplante a la TXNPx (20μM) y ter-butil hidroperóxido (t-butOOH) como agente oxidante. Al realizar estos ensayos se observó un consumo de NADPH al adicionar TXNPx en ausencia de t-butOOH. Esto se atribuyó a una reacción directa entre el T(SH)₂ y la TXNPx, debido a que: (I) al adicionar TXNPx cuando sólo hay NADPH en ausencia del T(SH)₂, no se observó su consumo, sino sólo el efecto de la dilución y (II) el consumo de NADPH con respecto al tiempo fue distinto al variar la concentración de T(SH)₂ en ausencia del t-butOOH. Debemos considerar que dicha situación sólo se presentó a esta concentración de TXNPx, y que por lo tanto se espera que esto no sucediera *in vivo*, ya que la concentración de esta enzima en el parásito sería menor. Esta reacción espuria *in vitro* desaparece después de un tiempo de incubar y antes de iniciar la reacción; por lo tanto la K_m de TXN por T(SH)₂ que se necesitaba medir se pudo hacer sin dificultad. Es necesario realizar más estudios al respecto para conocer bajo qué condiciones se da este comportamiento (la reacción directa entre la TXNPx y el T(SH)₂), ya que no se había reportado con anterioridad.

Por otro lado, distintos autores han reportado que existe una reducción directa de diferentes hidroperóxidos por el T(SH)₂ (Boveris *et al.* 1980, Henderson *et al.* 1987 Carnieri *et al.* 1993). Por esta razón, antes de iniciar la reacción con la enzima a medir, todos los componentes del sistema acoplante se incubaron con el hidroperóxido (ver Metodología); nuestras determinaciones tomaron en cuenta esta reacción espontánea para calcular sólo la actividad de la enzima. Es importante destacar que esta reacción espuria es insignificante a concentraciones menores de 100 µM, tanto de T(SH)₂ como de hidroperóxido. Por otro lado, las concentraciones *in vivo* de T(SH)₂ están en el intervalo de 1 a 3 mM (Olin-Sandoval *et al.* 2010), y fueron menores a 0.5 µM de hidroperóxido (Henderson *et al.* 1987); esto sugiere que aunque esta reacción directa podría suceder *in vivo*, se espera que la catalizada por las enzimas ocurra más rápidamente (Comini *et al.* 2007).

El valor de *K_m* de TcTXN por T(SH)₂ (92 ± 20 µM) (Tabla 4), fue 2.2 veces mayor con respecto al valor reportado para la enzima del mismo microorganismo por Wilkinson *et al.* (2002) (41 ± 5); pero se encuentra dentro del mismo orden de magnitud. Esta diferencia pudo deberse solamente al cambio de condiciones (pH/temperatura) del ensayo. Aunque los porcentajes de identidad y similitud de la TcTXN con la TXNI de *C. fasciculata* (CfTXNI) no son muy altos (63% y 75%, respectivamente), los datos obtenidos son similares a los reportados por Gommel *et al.* (1997) para la CfTXNI, con valores de *K_m* por T(SH)₂ de 130 (ó 93) µM.

Por otro lado, el valor de *V_{max}* que se obtuvo en esta tesis (97 ± 20) fue casi dos órdenes de magnitud mayor al reportado por Wilkinson *et al.* (2002) (1.2 ± 0.4), con el consiguiente incremento en 37 veces en el potencial catalítico (Tabla 4). Haciendo el análisis de los experimentos realizados por dichos autores es de notarse que su sistema acoplante no estaba saturado (3 µM GPx, 20 µM CumOOH), lo cual implica que la enzima no trabajaba a su velocidad máxima, y por lo tanto su valor de *V_{max}* está subestimado, por esta razón, para este trabajo se consideró que una concentración de 10 veces el valor de la *K_m* era suficiente para mantener a la enzima saturada.

En el trabajo de Gommel *et al.* (1997), se considera que el paso limitante del sistema reductor de hidroperóxidos, es la reacción entre T(SH)₂ – TXN debido a que la *k_{cat}* (6.5 s⁻¹) de esta reacción es menor a la de TXNI – Cf21 (el homólogo de *C.*

fasciculata de la TcGPX) y Cf21 – ROOH (a 25 °C), además de que la concentración de T(SH)₂ en el parásito no es saturante para todos los estadios. Sin embargo hay que considerar que: a) estas características (*kcat*, *Km*) pueden cambiar a temperatura fisiológica; b) el resto de la vía no está saturada, por lo tanto el valor de Vmax (y por consiguiente de *kcat*) están subestimados como se explicó anteriormente; y c) la concentración de TXN (0.3 – 0.5 mM) *in vivo* es saturante para Cf21 o TcGPx (Olin-Sandoval *et al.*2010).

Por otro lado, Guerrero *et al.* (1999) realizaron la caracterización de la CfTXNI recombinante, bajo las mismas condiciones que Gommel *et al.* (1997), obteniendo una *kcat* mayor (*kcat* = 26.4 s⁻¹ vs. 6.5 s⁻¹), de manera que ese paso puede no ser limitante. Además en este mismo reporte (Guerrero *et al.* 2000) se obtuvieron valores de *Km* mayores a los reportados anteriormente por Gommel *et al.* (1997) (*Km*_{T(SH)₂} 406 vs. 130 μM respectivamente; *Km*_{Cf21} 4.8 vs. 2.2 μM respectivamente) y se considera que las diferencias entre ambos reportes son insignificantes y se deben a la carga positiva que le confiere la etiqueta de histidinas a esta última.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la TXN, GPx y TXNPx recombinantes de *T. cruzi* determinados a pH 7.4 y 37°C.

	<i>Km</i> (μM)	<i>Vmax</i> (U/mg)	<i>kcat</i> (s ⁻¹)	<i>kcat/Km</i> (M ⁻¹ s ⁻¹)
TXN_{T(SH)2}	92 ± 20 (4)	97 ± 20 (4)	26 ± 6 (4)	2.8 x 10⁵
	41 ± 5*	1.2 ± 0.04*	0.31*	7.6 x 10 ^{3*}
GPx_{TXN}	2.3 ± 0.9 (3)	15 ± 0.8 (3)	5 ± 0.2 (3)	2.1 x 10⁶
	2.2 ± 0.3*	2.0 ± 0.1*	0.53*	2.4 x 10 ^{5*}
GPx_{CumOOH}	107 ± 16 (3)	31 ± 9 (3)	10.2 ± 3.1 (3)	9.6 x 10⁴
	16 ± 1*	1.9 ± 0.15*	0.56*	3.5 x 10 ^{4*}
TXNPx_{TXN}	0.45 (1)	2.3 (1)***	8.5 (1)	1.9 x 10⁷
	1.65**	2.9**	1.7**	1 x 10 ^{6**}
TXNPx_{t-butOOH}	24.4 (2)	2.9 (2)***	10.9 (2)	5 x 10⁵
	51.2**	2.9**	1.7**	3.3 x 10 ^{4***}
	Ki= 393			
TXNPx_{CumOOH}	16.5 (1)	2.4 (1)***	8.9 (1)	5.4 x 10⁵
	Ki= 626			

Entre paréntesis se muestra el número de experimentos realizados con distintas preparaciones de proteína. *Valores reportados por Wilkinson *et. al* (2002). **Parámetros reportados por Guerrero *et al.* (2000). *** valores subestimado porque en nuestros ensayos el sistema acoplante no estaba saturante.

6.6.2 Propiedades cinéticas de la GPX

Se realizaron curvas de saturación de la TcGPX para sus sustratos TXN y CumOOH (Fig. 21).

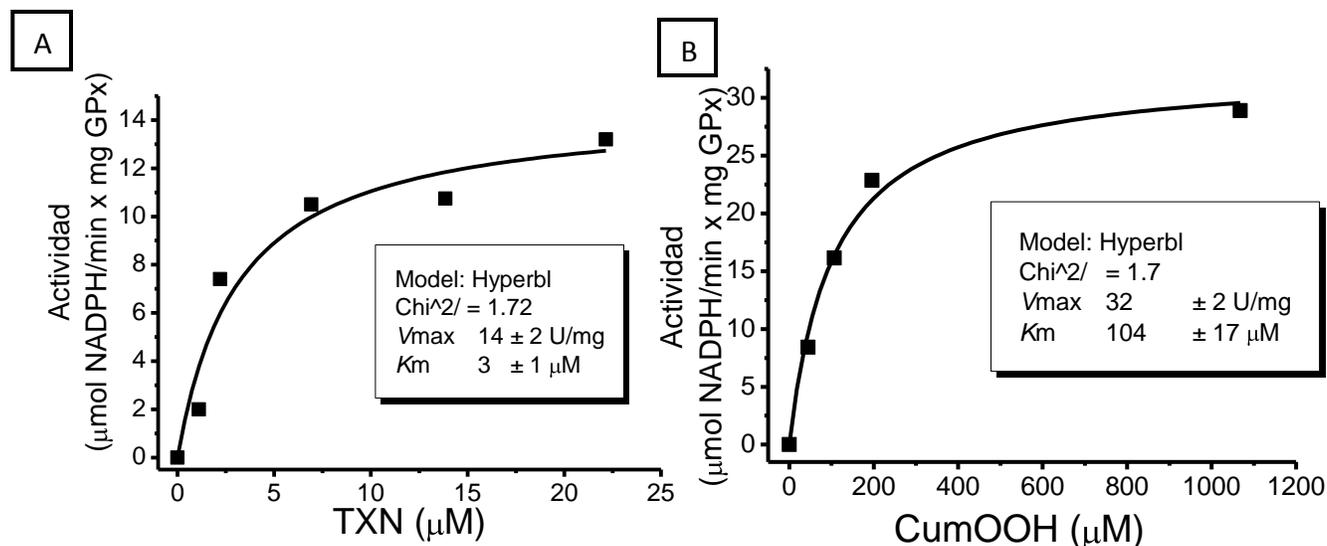


Figura 21. Curvas de saturación de la GPX por sus sustratos. (A) Curva de saturación de GPx con respecto a la concentración de TXN: 160 μM NADPH, 0.5 μM TryR, 400 μM T(SH)₂, 0 – 22 μM TXN, 1 mM CumOOH, 0.030 – 0.076 μM GPx.; (B) Curva de saturación de GPx con respecto a la concentración de CumOOH: 160 μM NADPH, 0.5 μM TryR, 400 μM T(SH)₂, 22 μM TXN, 0 – 1 mM CumOOH, 0.054 – 0.145 μM GPx. Curvas representativas de tres repeticiones. Tiempo máximo de reacción 15 min.

Se puede observar que la enzima presenta cinéticas michaelianas mostrando altas afinidades para ambos sustratos (Tabla 4). Comparando la afinidad de esta enzima por otros hidroperóxidos como el t-butOOH, el cual se reporta en 51 y 52 μM acoplado el ensayo a T(SH)₂/TXN y a GSH respectivamente (Patel *et al.* 2010), podemos decir que el valor determinado en esta tesis es similar a lo reportado. Wilkinson *et al.* (2002) reportó el valor de K_m de la TXN por GPx, es decir, determinó la afinidad variando la concentración de enzima (GPx) y manteniendo fija la concentración de TXN. Comparando el valor que se obtuvo en esta tesis con dicho estudio se puede concluir que no existen diferencias al hacerlo de una u otra forma. Gommel *et al.* (1997), determinaron el valor de K_m de CfTXN1 por Cf21, reportándose en 2.2 (ó 1.5) μM , el cual es similar a la K_m de GPx por TXN determinada en esta tesis.

Por otro lado, sí se observaron diferencias significativas en los valores de afinidad por el CumOOH, siendo 6.7 veces mayor el determinado en esta tesis ($107 \pm$

16 μM) (Tabla 4) comparado con el reportado por Wilkinson *et al.* (2002). En nuestros ensayos nos aseguramos de determinar la concentración exacta del hidroperóxido antes de realizar la cinética, cuantificándolo por el método conocido como FOX2, que implica la reacción del hidroperóxido con un exceso de Fe^{2+} en presencia del colorante naranja de xilenol (XO), de esta manera el ión se oxida generado Fe^{3+} , el cual forma un complejo con el XO (Fe-XO), de esta manera se determinó la concentración de hidroperóxido por espectroscopía a 560nm en un espectrofotómetro y utilizando como coeficiente de extinción molar el valor de $43000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ reportado para CumOOH y t-butOOH (Gay *et al.* 1999). Una probable explicación de esta discrepancia es que se debió al cambio en las condiciones de pH y temperatura que utilizaron los autores (pH 8.0, 30 °C). El pH óptimo de esta reacción no se ha reportado; pero podríamos decir que probablemente el pH 7.4 no favoreció esa reacción.

Los parámetros cinéticos reportados por dicho grupo de investigación se determinaron bajo condiciones no saturantes del sistema acoplante (20 μM CumOOH y 25 a 100 μM de $\text{T}(\text{SH})_2$). Esto afecta la determinación de la v_0 de cada una de las reacciones, por lo que el valor de V_{max} y por lo tanto el de k_{cat} que reportaron están subestimados. Es por esto que todos los valores de velocidad obtenidos en la caracterización cinética de la GPx de esta tesis fueron mayores: mientras que la velocidad de GPx fue un orden de magnitud mayor, la velocidad de la reacción de la TXN con $\text{T}(\text{SH})_2$ casi alcanzó una diferencia de dos órdenes de magnitud (Tabla 4).

6.6.3 Propiedades cinéticas de la TXNPx

El ensayo enzimático para la caracterización de la TXNPx no se logró evaluar en condiciones saturantes del sistema acoplante debido a que la enzima presenta un efecto de inhibición al ser diluida a concentraciones menores de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estos datos concuerdan con lo reportado para esta enzima por Flohé *et al.* (2002a), aunque los autores reportaron que a concentraciones menores de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la enzima pierde el 50% de su actividad. Además, la utilización de concentraciones tan altas de enzima en el ensayo conduce a que la reacción sea muy rápida y no se puedan calcular valores de velocidad inicial aún cuando haya variaciones en la concentración de alguno de sus

sustratos. Cabe mencionar que el uso de esta enzima como parte del sistema para medir la reacción de la TXN con T(SH)₂ no representó ningún problema, pues la concentración llegó a ser de 960 µg/mL.

Como parte del proyecto, se intentó evitar el efecto que tiene la dilución sobre la enzima, aumentando la fuerza iónica del medio de reacción con KCl (100 mM) o aumentando la viscosidad de la solución con 10% de glicerol; sin embargo los resultados fueron muy similares a los encontrados en ausencia de estos componentes.

Debido a esta problemática, en el ensayo enzimático de la TXNPx se tuvo que mantener su concentración lo más baja posible sin que hubiera inactivación, a la par de que se tuvo que limitar el resto de los componentes del ensayo, tal como se hizo en el estudio de Guerrero *et al.* (2000) para poder medir una velocidad de reacción lo más cercana a condiciones de velocidad inicial. Esto trajo como consecuencia que los valores de V_{max} y k_{cat} estén subestimados también en esta tesis. Los resultados se resumen en la Tabla 4 y la Figura 22 muestra una curva representativa de la saturación de TXNPx por diferentes sustratos.

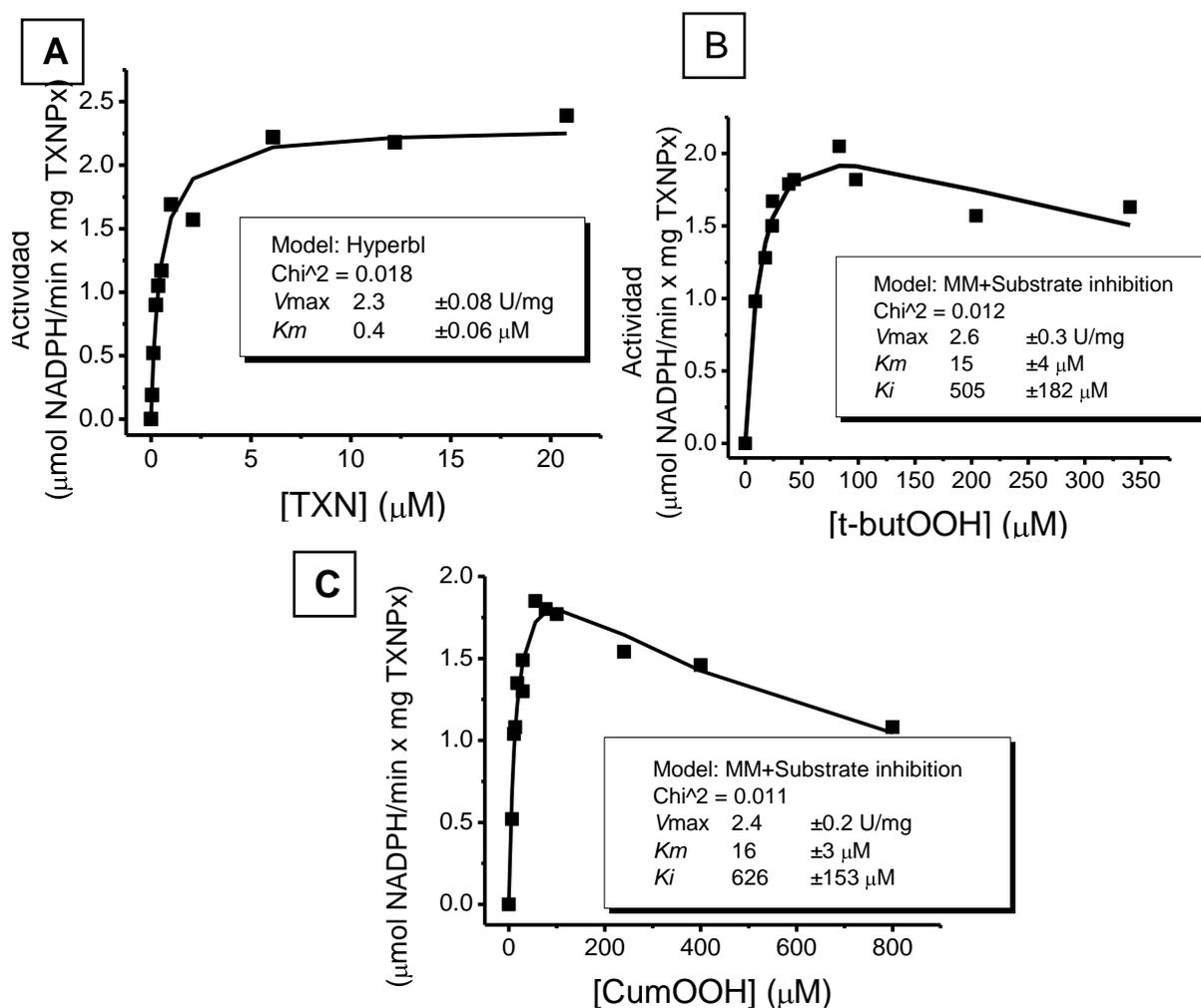


Figura 22. Curvas de saturación de la TXNPx por diferentes sustratos. (A) Curva de saturación de TXNPx con respecto a TXN: 160 μM NADPH, 10 nM TryR, 45 μM T(SH)₂, 0 – 20 μM TXN, 120 μM t-butOOH, 1 μM TXNPx; (B) Curva de saturación e inhibición de TXNPx con respecto a t-butOOH (representativa de dos repeticiones): 160 μM NADPH, 10 nM TryR, 45 μM T(SH)₂, 1 μM TXN, 0 – 700 μM t-butOOH, 1 μM TXNPx; (C) Curva de saturación e inhibición de TXNPx con respecto a CumOOH: 160 μM NADPH, 10 nM TryR, 45 μM T(SH)₂, 1 μM TXN, 0 – 800 μM CumOOH, 1 μM TXNPx. Tiempo máximo de reacción 15 min.

La K_m de la TXNPx por TXN que se obtuvo fue 3.7 veces menor a la reportada por Guerrero *et al.* (2000) (Tabla 4; Fig. 22A). Esta diferencia pudo deberse a que los autores utilizaron la CfTXNII como sustrato en vez de la TXN de *T.cruzi*, su sustrato verdadero, tal como se realizó en este estudio; sin embargo, es necesario un mayor número de repeticiones para corroborar la diferencia.

La K_m de la enzima por t-butOOH (24.4 μM) (Tabla 4; Fig. 22B) es 2 veces menor a la reportada por Guerrero *et al.* (2000). Por otro lado, el valor de K_m de la

enzima por el CumOOH (16.5 μM) (Tabla 4; Fig. 22C) no se había reportado para esta enzima; el valor fue similar al de la enzima por el t-butOOH tal y como se esperaba al ser estos dos sustratos hidroperóxidos de cadena corta. Aunque la enzima también utiliza el H_2O_2 como sustrato, el valor de K_m no se pudo determinar porque este peróxido da una reacción espontánea muy importante con el sistema acoplante.

Si bien se tienen reportes de la inhibición de la TXNPx de *T. cruzi* por sus sustratos hidroperóxidos, siendo muy potente con el H_2O_2 (Flohé *et al.* 2002a), no se habían reportado los valores de K_i . En nuestros ensayos se confirmó dicha inhibición con el t-butOOH y CumOOH (Figs. 22 B y C); sin embargo, los valores determinados fueron muy altos (393 y 626 μM , respectivamente; Tabla 4) y se puede concluir que esta inhibición probablemente es de poco significado fisiológico. Sin embargo, estos sustratos no se encuentran en las células y por lo tanto es más relevante la determinación de K_i con el H_2O_2 . Es importante tener en cuenta esta inhibición por sustrato si se desea medir la V_{max} de la enzima en extractos celulares ya que un exceso del peróxido redundaría en la subestimación de este parámetro.

De nueva cuenta, como en los ensayos cinéticos de la TXNPx no se utilizaron concentraciones saturantes del sistema acoplante (tanto el utilizado en este trabajo como en los reportados previamente en la literatura), los valores de V_{max} recalculados en k_{cat} están subestimados; por consiguiente, el potencial catalítico de la TXNPx debe ser más alto para todos sus sustratos y por lo tanto la TXNPx sería quizá la más eficiente de todas las enzimas de este sistema de reducción de hidroperóxidos.

7. DISCUSIÓN GENERAL

A través de la caracterización cinética de las enzimas del sistema reductor de hidroperóxidos en tripanosomátidos, diversos autores han propuesto a la reacción TXN-T(SH)₂ como un sitio de intervención terapéutica contra los tripanosomátidos *T. cruzi* (Wilkinson *et al.* 2002); *C. fasciculata* (Gommel *et al.* 1997, Guerrero *et al.* 2000) y *T. brucei* (Hillebrand *et al.* 2003) debido a que “es el paso con menor *kcat/Km*”.

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron en esta tesis, la mayoría de los valores de *Km* de las enzimas por sus sustratos son similares, muchos de ellos caen dentro del mismo orden de magnitud a los reportados en la literatura. Sin embargo, como ya se discutió anteriormente, los autores Wilkinson *et al.* (2002) y Guerrero *et al.* (2000) utilizaron el sistema acoplante en condiciones subsaturantes con la consecuente obtención de un valor subestimado de la *Vmax* y *kcat* y un valor también subestimado del potencial catalítico. Además, dichos valores pudieron variar debido a la temperatura y el pH del ensayo utilizado por cada grupo de investigación. En muchos casos, estos parámetros están muy alejados de las condiciones que se presentan en los parásitos vivos. Debido a todas estas consideraciones, los valores cinéticos reportados en la literatura que no cumplan con las condiciones adecuadas en su caracterización, no deberían de utilizarse para calcular la eficiencia catalítica real de una reacción y mucho menos utilizarlos para validar a una reacción como blanco terapéutico en una célula.

Como se puede observar en la Tabla 4, la enzima con menor potencial catalítico determinada en condiciones cercanas a las fisiológicas para todas las enzimas (mismo buffer de reacción, pH y temperatura), fue la GPx con el CumOOH y no la transferencia de electrones entre la TXN-T(SH)₂, por lo que atendiendo solamente a esta caracterización *in vitro*, la reacción de la GPx sería la limitante en el sistema. Es necesario aclarar que aunque la GPx tuvo el menor potencial catalítico, el CumOOH no es un sustrato fisiológico, de manera que la *Km* por el verdadero sustrato fisiológico (que pueden ser otros hidroperóxidos orgánicos de cadena corta) podría variar y por lo tanto también la *kcat/Km*. Por otro lado, si bien se ha reportado que la TXNPx se inactiva por un exceso de hidroperóxido (Flohé *et al.* 2002a), no se ha reportado el efecto inhibitorio sobre GPx, sin embargo en nuestros ensayos, observamos que la enzima se inhibe por CumOOH a concentraciones mayores a 1.5 mM. No se exploró

más acerca de esta inhibición, pues esta concentración de hidropéroxido difícilmente se alcanzaría *in vivo*, además esta concentración (1.5 mM) es mayor a la saturante.

La característica no-limitante de la reacción de TXN-T(SH)₂ concuerda con que al considerar las concentraciones *in vivo* de ambos componentes (T(SH)₂ = 0.1 – 2.1 mM; y TXN= 0.3 – 0.5 mM; revisado en Olin *et al.* 2010), este paso no sería limitante para el parásito, pues aunque el valor de *k_{cat}/K_m* sea semejante al de la reducción de hidropéroxido por GPx (siendo estos los menores de la vía, Tabla 4), su baja eficiencia se compensa con la alta concentración en la célula de los dos metabolitos. Además, considerar que la transferencia de electrones de la TXN-T(SH)₂ es un buen blanco terapéutico tampoco concuerda con los resultados encontrados no sólo en esta tesis, sino también por otros autores, donde se concluye que este par es el factor determinante del potencial redox en el citosol y el más eficiente (Krauth-Siegel *et al.* 2007, Reckenfelderbäumer *et al.* 2002). Por lo tanto, sería difícil encontrar un inhibidor tan específico para la TXN que no afecte a la Trx del hospedero (debido a su similitud) y que se administre en concentraciones que inhiban la alta concentración de TXN y no afecten al hospedero.

Por otro lado, aunque no se conocen las concentraciones de TXNPx y GPx en *T. cruzi*, se sabe que la TXNPx es abundante en *C. fasciculata*, contabilizando hasta un 6% de la proteína total del parásito (Nogoceke *et al.* 1997) y podríamos esperar que también lo sea en *T. cruzi*. Así mismo, ambas son enzimas citosólicas, las cuales comparten como sustratos a los hidropéroxidos orgánicos, pero la TXNPx tiene además como sustratos al H₂O₂ y el peroxinitrito (Krauth-Siegel *et al.* 2007, Nogueira *et al.* 2009). Suponiendo esto, la reducción del hidropéroxido por cualquiera de las dos enzimas citosólicas tampoco sería limitante, pues su baja eficiencia se compensaría con la alta concentración de al menos una de ellas (TXNPx) (Flohé, 1998), y la presencia de otra enzima (GPx) que comparte algunos de los sustratos. De manera interesante, las eficiencias catalíticas de las enzimas de este sistema antioxidante (calculadas a partir de dichas concentraciones de proteína) son 10¹ - 10⁴ órdenes de magnitud mayores a las que presentan las enzimas involucradas en la síntesis de precursores del tripanotión (γ-ECS, GS) y su síntesis (TryS) (Olin-Sandoval & Saavedra, manuscrito en preparación).

Finalmente, buscar blancos de intervención terapéutica en este sistema antioxidante en *T. cruzi* (y quizá en otros tripanosomátidos también), el cual presenta valores de potenciales catalíticos altos, es muy abundante en los parásitos, y al parecer es muy eficiente catalíticamente, parece un objetivo difícil de alcanzar.

8. CONCLUSIONES

Se clonaron y purificaron las enzimas TXN, GPx y TXNPx de *T. cruzi*, y se obtuvieron los parámetros cinéticos V_{max} , K_m y k_{cat} bajo condiciones pseudo-fisiológicas. De acuerdo a los valores obtenidos se determinó que el menor potencial catalítico no recae en la reducción de TXN por $T(SH)_2$ como previamente se había reportado, sino en la reducción de hidroperóxido por GPx. Sin embargo, ninguna de estas enzimas es catalíticamente deficiente en los parásitos, de manera que se pueden excluir a las enzimas de esta vía como blancos potenciales de intervención terapéutica. Es importante recalcar que no es posible proponer a una enzima como blanco terapéutico, solamente a través de su caracterización cinética, sino que además de los parámetros cinéticos aquí descritos, es necesario tomar en cuenta también la concentración de enzima en el parásito y la concentración de sus sustratos y productos.

9. PERSPECTIVAS

-Con los resultados metodológicos obtenidos en esta tesis, se puede medir la actividad de peroxidasa en extractos de *T. cruzi*, tomando en cuenta que si utilizamos cualquiera de los hidroperóxidos utilizados en este trabajo (t-butOOH o CumOOH), no podríamos diferenciar entre la actividad de GPx o TXNPx, pues las dos enzimas los toman como sustrato.

-Para determinar la actividad de las enzimas en el extracto es necesario medir la V_{max} , lo cual se puede lograr con el mismo sistema que se describió en este trabajo, y sustituyendo a la enzima por el extracto.

- Teniendo las enzimas recombinantes de este sistema, se puede determinar el grado de control de las enzimas involucradas en la vía, a través de la reconstitución *in vitro* de la vía basándose en las proporciones de cada una de las enzimas presente en los parásitos así como también las concentraciones de los intermediarios de la vía. Esta aproximación experimental podría ayudar a identificar la(s) enzima(s) dentro del metabolismo del $T(SH)_2$ que podrían tener el mayor potencial terapéutico desde un punto de vista cinético y metabólico.

10. BIBLIOGRAFÍA.

- Afderheide A.C., Salo W., Madden M., Streitz J., Guhl F., Arriazza B., Renier C., Wittmers Jr. L. E., Fornaciari G., Alisson A. A 9.000-years record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci*; **101**: 2034–2039. 2004.
- Algranati I. D. Polyamine metabolism in *Trypanosoma cruzi*: studies on the expression and regulation of heterologous genes involved in polyamine biosynthesis. *Amino acids*; **38**: 645-651; 2010.
- Alphey M. S., Leonard G. A., Gourley D. G., Tetaud E., Fairlamb A. H., Hunter W. N. The high resolution crystal structure of recombinant *Crithidia fasciculata* tryparedoxin-I. *J Biol Chem*; **274**: 25613-25622; 1999.
- Augustyns K., Amsoms K., Yamani A., Rajan P. K., Haemers A. Trypanothione as a target in the design antitrypanosomal and antileishmanial agents. *Curr Pharm Des*; **7**: 1117-1141; 2001.
- Boveris A., Sies H., Martino E., Docampo R., Turens J., Stoppani A. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*; **188**: 643-648; 1980.
- Brumpt E. Le *Trypanosoma cruzi*, evolué chez *Conorhinus megistus*, *Cimex lectularius*, *Cimex boueti* et *Ornithodoros moubata*. Cycle évolutif de ce parasite. *Bull Soc Path Exot*; **5**: 360-367. 1912.
- Carnieri E., Moreno S., Docampo R. Trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages. *Mol. Biochem Parasitol.*; **61**: 79-86; 1993.
- Castro H., Tomás A. Peroxidases of trypanosomatids. *Antioxid Redox Signal*; **10**: 1593-1606; 2008.
- Cevallos A. M., Hernández R. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). En: Martínez E., Martínez J. C. (editores) *Microbios en línea*. Libro virtual <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>.
- Chagas C. J. Nova tripanozomiazé humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; **1**:159-218; 1909.

- Comini M., Krauth-Siegel L., Flohé L. Depletion of thioredoxin homologue tryparedoxin impairs antioxidant defence in African trypanosomes. *Biochem J*; **402**: 43-49; 2007.
- Coura J. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; **102 (Suppl. I)**: 113-122; 2007.
- Coura J. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy – A proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; **104**: 549-554; 2009.
- Coura J., Albajar P. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* **465**: S6-S7. 2010.
- Coura J., Borges J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop*; **115**: 5-13. 2010.
- Coura J, de Castro S. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; **91**: 3-24; 2002.
- Cruz A., Pickering J.M. Chagmex [base de datos en línea]. México DF: UNIBIO, Instituto de Biología, UNAM; 2005 (fecha de acceso 31 noviembre de 2010). <http://www.unibio.unam.mx/chagmex>
- Cruz A., Pickering J.M. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; **101**: 345-354; 2006.
- Eisenthal R., Danson M., Hough D. Catalytic efficiency and k_{cat}/K_m : a useful comparator? *Trends Biotechnol*; **25**: 247-249; 2007.
- Espinoza B., Rico T., Sosa S., Oaxaca E., Vizcaino A., Carallero M., Martínez I. Mexican *Trypanosoma cruzi* *T. cruzi* I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *J Biomed Biotechnol*; 890672; 2010.
- Fairlamb A. H., Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the *kinetoplastida*. *Annu Rev Microbiol*; **46**: 695-729; 1992.
- Flohé L. The achilles' heel of trypanosomatids: trypanothione-mediated hydroperoxide metabolism. *BioFactors*; **8**: 87-91; 1998.

- Flohé L., Steinert P., Hecht H-J., Hofmann B. Tryparedoxin and tryparedoxin peroxidase. En Sies H., Packer L. (editores), *Meth Enzimol* **347**: Protein sensors and reactive oxygen species (Part A: Selenoproteins and thioredoxin); 244-258; 2002a.
- Flohé L., Budde H., Bruns K., Castro H., Clos J., Hofmann B., Kansan-Kalavar S., Krumme D., Menge U., Plank-Schumacher K., Sztajer H., Wissing J., Wylegalla C., Hecht H-J. Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: Molecular cloning, heterologous expression, specificity and catalytic mechanism. *Arch Biochem Biophys*; **397**: 324-335; 2002b.
- Gay C., Collins J., Gebicki J. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Anal Biochem*; **273**: 149-155; 1999.
- Gommel D. U., Nogoceke E., Morr M., Kiess M., Kalisz H. M., Flohé L. Catalytic characteristics of tryparedoxin. *Eur J Biochem*; **248**: 913-918; 1997.
- Guerrero S. A., Flohé L., Kalisz H., Montemartini N., Nogoceke E., Hecht J-H., Steinert P., Singh M. Sequence, heterologous expression and functional characterization of tryparedoxin 1 from *Crithidia fasciculata*. *Eur J Biochem*; **259**: 789-794; 1999.
- Guerrero S. A., Lopez J. A., Steinert P., Montemartini P., Kalisz H. M., Colli W., Singh M, Alves M. J., Flohé L. His-tagged tryparedoxin peroxidase of *Trypanosoma cruzi* as a tool for drug screening. *Appl Microbiol Biotechnol*; **53**: 410-414; 2000.
- Guhl F., Jamillo C., Vallejo G.A., Yockteng R., Cardenas F., Forniciari G. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4000 years old mummified human tissue from northern Chile. *Physiol Anthropol*; **108**: 625–635; 1999.
- Hansberg W. Biología de las especies de oxígeno reactivas. En Cea A., del Arenal I. P., Riveros H., Vázquez E. (editores). *Mensaje Bioquímico*; **XXVI**; 2002.
- Hasne M. P., Coppens I., Soysa R., Ullman B. A high-affinity putrescine- cadaverine transporter from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol*; **76**: 78-91; 2010.
- Henderson G. B., Fairlamb A. H., Cerami A. Trypanothione peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*; **24**: 39-45; 1987.

- Henderson G. B., Fairlamb A. H., Trypanothione metabolism: a chemotherapeutic target in trypanosomatids. *Parasitol today*; **3**: 312-315; 1987.
- Hillebrand H., Schmidt A., Krauth-Siegel L. A second class of peroxidases linked to the trypanothione metabolism. *J Biol Chem*; **278**: 6809-6815; 2003.
- Irigoín F., Cibils L., Comini M. A., Wilkinson S. R., Flohé R., Radi R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radic Biol Med*; **45**: 733-742; 2008.
- Ivens A. C., Lewis S. M., Bagherzadeh A., Zhang L., Chan H. M., Smith D. F. A physical map of the *Leishmania major* friedlin genome. *Genome Res*; **8**: 135-145; 1998.
- Januel C., El Hentati F-Z., Carreras M., Arthur J. R., Calzada C., Lagarde M., Véricel E. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx-4) localization in resting platelets, and compartmental change during platelet activation. *Biochim Biophys Acta*; **1761**: 1228-1234; 2006.
- Knoop B., Loumayer E., Van Der Eecken V. Evolution of the peroxiredoxins. Taxonomy, homology and characterization. En Flohé L., Harris J. R. (editores) *Peroxiredoxin systems. Subcell Biochem*; **44**: 27-40; 2007.
- König J., Fairlamb A. H. A comparative study of type I and II tryparedoxin peroxidases in *Leishmania major*. *FEBS J.*; **274**: 5643-5658; 2007.
- Krauth-Siegel L., Comini M., Shlecker T. The trypanothione system. En Flohé L., Harris J. R. (editores). *Peroxiredoxin systems. Subcell Biochem.* **44**: 231-251; 2007.
- Lopez J. A., Carvalho T. U., de Souza W., Flohé L., Guerrero S. A., Montemartini M., Kalisz H. M., Nogoceke E., Singh M., Alves M. J., Colli W. Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. *Free Radic Biol Med*; **28**: 767-772; 2000.
- Lüdemann H., Dormeyer M., Sticherling C., Stallmann D., Follmann H., Krauth-Siegel L. *Trypanosoma brucei* tryparedoxin, a thioredoxin-like protein in African trypanosomes. *FEBS Lett*; **431**: 381-385; 1998.

- Mateo H., Marín C., Pérez G., Sánchez M. Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; **103**: 271-276; 2008.
- Maya J. D., Cassels B. K., Iturriaga P., Ferreira J., Faúndez M., Galanti N., Ferreira A., Morello A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *CBP Part A*; **146**: 601-620; 2007.
- Michels P. A., Bringaud F., Herman M., Hannaert V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta*; **1763**: 1463-1477; 2006.
- Montemartini M., Nogoceke E., Singh M., Steinert P., Flohé L., Kalisz H. Sequence analysis of the tryparedoxin peroxidase gen from *Crithidia fasciculata* and its functional expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*; **273**: 4864-4871; 1998.
- Montemartini M., Kalisz H., Hecht H-J., Steinert P., Flohé L. Activation of active-site cysteine residues in the peroxiredoxine-type tryparedoxin peroxidase of *Crithidia fasciculata*. *Eur J Biochem*; **264**: 516-524; 1999.
- Murta S., Gazzinelli R. T., Brener Z., Romanha A. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol*; **93**: 203-214; 1998.
- Nogoceke E., Gommel D. U., Kiess M., Kalisz H. M., Flohé L. A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol Chem*; **378**: 827-836; 1997.
- Nogueira F. B. Ruiz J. C. Robello C., Romanha A. J. Murta S. M. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial triparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazol. *Parasitol Res*; **104**: 835-844; 2009.
- Northrop D. So what exactly is V/K, anyway?. En Frey P. A. y Northrop D. (editores). *Enzymatic Mechanisms. Biomedical and Health Research*; **27**: 250-263; 1999.
- Olin V., Moreno R., Saavedra E. Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites. *Curr Drug Targ*; **11**: 1614-1630; 2010.

- Organización Mundial de la Salud. Enfermedad de Chagas: control y eliminación. Informe de la Secretaría. **A62/17**; 2009.
- Patel S., Hussain S., Harris R., Sardiwal S., Kelly J., Wilkinson S. R., Driscoll P. C., Djordjevic S. Structural insight into the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi* GPxI (glutathione peroxidase-like enzyme I). *Biochem J*; **425**: 513-522; 2010.
- Piñeyro M. D., Pizarro J. C., Lema F., Pritsch O., Cayota A., Bentley G. A., Robello C. J. Crystal structure of the tryparedoxin peroxidase from the human parasite *Trypanosoma cruzi*. *Struct Biol*; **150**: 11-22; 2005.
- Reckenfelderbäumer N., Krauth-Siegel RL. Catalytic properties, thiol pK value, and redox potential of *Trypanosoma brucei* tryparedoxin. *J Biol Chem*; **277**: 17548-17555; 2002.
- Reisenman C., Lawrence G., Guerenstein P., Gregory T., Dotson E., Hildebrand J. Infection of kissing bugs with *Trypanosoma cruzi*, Tucson, Arizona, USA. *Emerg Infect Dis*; **16**; 2010.
- Salazar P., De Haro I., Cabrera M., Tres especies de triatóminos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México, *MEDICINA* (Buenos Aires); **65**: 63-69; 2005.
- Schlecker T., Schmidt A., Dirdjaja N., Vondcken F., Clayton C., Krauth-Siegel RL. Substrate specificity, localization and essential role of the glutathione peroxidase-like tryparedoxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*; **280**: 14388-14394; 2005.
- Segel I. H. Enzyme Kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. John Wiley and Sons. California, 1993.
- Sodr  C. L., Chapeaurouge A. D., Kalume D. E., de Mendonça Lima L., Perales J., Fernandes O. Proteomic map of *Trypanosoma cruzi* CL Brener: the reference strain of the genome project. *Arch Microbiol*; **191**: 177-184; 2009.
- Tay-Zavala J., Lara-Aguilera R., Velasco-Castrejón O., Gutiérrez-Quiroz M. *Parasitología médica*. México D.F. Mendez Editores S.A. de C.V. 5ª edición 1995.

- The special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR) <http://www.who.int/tdroid/diseases/chagas/files/chagas-poster.pdf>. 2002
- Toma H. K., Cerávolo I. P., Guerra H. L., Steindel M., Romanha A. J. *Trypanosoma cruzi*: parasitaemia produced in mice does not seem to be related to in vitro parasite-cell interaction. *Int J Parasitol*; **30**: 593-597; 2000.
- Velasco O., Valdespino J. L., Tapia R., Salvatierra B., Guzmán C., Magos C., Llausás A., Gutierrez G., Sepulveda J. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Salud Pública Mex*; **34**: 186-196. 2002.
- World Health Organization, Control of Chagas disease. *WHO technical report series*; **905**. Geneva, Switzerland. 2002.
- WHO/Department of Control of Neglected Tropical Disease/Innovative and Intensified Disease Management (WHO/NTD/IDR). Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. OPS/HDM/CD/425-06. Editado por Jannin J. y Salvatella R. 2006.
- World Health Organization/TDR (WHO/TDR). <http://www.who.int/tdroid/diseases/chagas/diseaseinfo.htm> . 2004 (fecha de acceso 31 de noviembre de 2010).
- Wilkinson S. R., Meyer D. J., Kelly J. M. Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. *Biochem J*; **352**: 755-761; 2000.
- Wilkinson S. R., Meyer D. J., Taylor M. C., Bromley E. V., Miles M. A., Kelly J. M. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPxl is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *J Biol Chem*; **277**: 17062-17071; 2002.
- Wilkinson S. R., Taylor M. C., Horn D., Kelly J. M., Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci*; **105**: 5022-5027; 2008.
- Wilkinson S. R., Kelly J. The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biol Chem*; **384**: 517-525; 2003.