



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE CONTROL DEL FLUJO DEL SISTEMA  
REDUCTOR DE HIDROPERÓXIDOS DEPENDIENTE DE TRIPAREDOXINA DE  
*Trypanosoma cruzi*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
ZABDI ABRAHAM GONZÁLEZ CHÁVEZ

TUTOR PRINCIPAL: Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira  
**I NSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez (Facultad de medicina)  
Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo (Facultad de química)

MÉXICO, D. F. Enero, 2013



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.

## Índice

Índice de tablas y figuras	5
Abreviaturas	6
Resumen	8
Abstract	9
1 INTRODUCCIÓN	10
1.1 Biología de <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
1.2 Ciclo de vida del parásito	11
1.3 Descubrimiento de la enfermedad de Chagas	13
1.4 Mecanismos de transmisión de la enfermedad	13
1.5 Características de la enfermedad	14
1.6 Estadísticas de la enfermedad de Chagas	15
1.6.1 Estadísticas de la enfermedad de Chagas en México	16
1.7 Tratamiento de la enfermedad de Chagas	17
1.8 Sistema antioxidante <i>T. cruzi</i>	21
1.9 Metabolismo del tripanotión	22
1.10 Características generales de la TXN	26
1.11 Características generales de la TXNPx	26
1.12 Características generales de la GPxA	27
1.13 Características cinéticas de las enzimas TXN, TXNPx y GPxA de <i>T. cruzi</i>	28
1.13.1 Características cinéticas de la TXN	29
1.13.2 Características cinéticas de la TXNPx	30
1.13.3 Características cinéticas de la GPxA	31
1.14 Los parámetros cinéticos de las enzimas aisladas como criterio de validación de blanco terapéutico	32
1.15 Análisis de control metabólico como herramienta para determinar la distribución de control de una vía metabólica	36
2 JUSTIFICACIÓN	38
3 HIPÓTESIS	39
4 OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo general	39

4.2	Objetivos particulares	
5	METODOLOGÍA	40
5.1	Clonación de los genes, sobreexpresión y purificación de las proteínas recombinantes <i>TcTryR</i> , <i>TcTXN</i> , <i>TcGPxA</i> y <i>TcTXNPx</i>	40
5.2	Síntesis <i>in vitro</i> de T(SH) <sub>2</sub>	41
5.2.1	Sobreexpresión y purificación de <i>CfTrySC59A</i>	41
5.2.2	Reacción de síntesis de T(SH) <sub>2</sub>	42
5.2.3	Purificación del T(SH) <sub>2</sub>	42
5.2.4	Determinación de la pureza de T(SH) <sub>2</sub>	42
5.3	Determinación de actividad específica de las enzimas recombinantes	43
5.4	Constantes de afinidad de TXNPx y GPxA por otros hidroperóxidos	44
5.4.1	Curva de saturación de GPxA por t-butOOH y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	44
5.4.2	Curva de saturación de TXNPx por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	45
5.5	Cultivo de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	45
5.6	Obtención del extracto citosólico de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	45
5.7	Determinación de actividades enzimáticas en extractos	46
5.7.1	Actividad de TXN y TXNPx en extractos de epimastigotes	46
5.7.2	Actividad de GPxA en extractos de epimastigotes	46
5.8	Determinación de los coeficientes de control de flujo por reconstitución <i>in vitro</i> de la vía metabólica	47
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
6.1	Síntesis <i>in vitro</i> y purificación de T(SH) <sub>2</sub>	49
6.1.1	Sobreexpresión y purificación de <i>CfTrySC59A</i>	49
6.1.2	Determinación de la actividad de <i>CfTrySC59A</i> y síntesis <i>in vitro</i> de T(SH) <sub>2</sub>	50
6.2	Caracterización cinética de las enzimas recombinantes GPxA y TXNPx	52
6.2.1	Curva de saturación de GPxA por t-butOOH	52
6.2.2	Curva de saturación de GPxA por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	54
6.2.3	Curva de saturación de TXNPx por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	55
6.2.4	Estabilización de la TXNPx con DMSO	56
6.3	Determinación de actividades de enzimas en extractos de parásitos	58
6.3.1	Actividad de TXN en el extracto	58
		60

6.3.2	Actividad de peroxidasas en el extracto	
6.3.3	Comparación de las eficiencias catalíticas de las enzimas en el parásito	64
6.4	Determinación de los coeficientes de control de flujo	65
7	DISCUSIÓN GENERAL	69
8	CONCLUSIONES	73
9	PERSPECTIVAS	74
10	REFERENCIAS	75
Anexo1	Breve repaso de cinética enzimática	83
Anexo 2	Breve repaso al análisis de control metabólico	85

## Índice de tablas y figuras

Figura 1. Estadios morfológicos de <i>T. cruzi</i>	11
Figura 2. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	12
Figura 3. Casos de enfermedad de Chagas reportados por estado.	16
Figura 4. Estructuras de los fármacos utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas	17
Figura 5. Modo de acción de los fármacos antichagásicos	18
Figura 6. Principales tioles en <i>T. cruzi</i>	21
Figura 7. Metabolismo del T(SH) <sub>2</sub> en <i>T. cruzi</i>	24
Figura 8. Vía de reducción de hidroperóxidos dependiente de TXN en tripanosomátidos	43
Figura 9. Purificación de la CfTrySC59A	49
Figura 10. Curvas de saturación de CfTrySC59A	51
Figura 11. Cromatogramas de moléculas con grupos tiol	52
Figura 12. Curvas de saturación de GPxA por t-butOOH y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	53
Figura 13. Curva de saturación de TXNPx por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	55
Figura 14. Efecto estabilizador del DMSO sobre la actividad de TXNPx	57
Figura 15. Marcha de purificación de TXN.	59
Figura 16. Curva de actividad de peroxidasa en extracto con respecto a la concentración del hidroperóxido.	61
Figura 17. Curvas de inactivación de peroxidasa por CumOOH	62
Figura 18. Curva de saturación de GPx por CumOOH con el sistema GSH/GR	64
Figura 19. Curvas para la determinación del coeficiente de control de flujo del sistema reductor de hidroperóxidos dependiente de TXN	67
Figura 20. Esquema de distintas vías metabólicas	70
Figura 21. Gráfico comparativo de enzimas con distintos coeficientes de control de flujo	88
Tabla 1. Parámetros cinéticos de la TXN recombinante de <i>T. cruzi</i> y <i>C. fasciculata</i>	
Tabla 2. Parámetros cinéticos de la TXNPx recombinante de <i>T. cruzi</i>	30
Tabla 3. Parámetros cinéticos de la GPxA recombinante de <i>T. cruzi</i>	31
Tabla 4. Comparación de parámetros cinéticos de las enzimas pertenecientes a la vía de reducción de hidroperóxidos dependiente de TXN	32 35
Tabla 5. Condiciones de los ensayos enzimáticos para medir <i>V<sub>m</sub></i> de las enzimas recombinantes	44
Tabla 6. Componentes del ensayo para medir la <i>V<sub>m</sub></i> de la TXN y TXNPx en extractos clarificados del parásito	46
Tabla 7. Condiciones experimentales para determinar los coeficientes de control de flujo	48
Tabla 8. Condiciones para medir la actividad de CfTrySC59A y para sintetizar <i>in vitro</i> el T(SH) <sub>2</sub>	50
Tabla 9. Caracterización cinética de GPxA y TXNPx con distintos hidroperóxidos	53
Tabla 10. Actividad de enzimas antioxidantes en extractos de <i>T. cruzi</i>	58
Tabla 11. Análisis del contenido de TXN en <i>T. cruzi</i>	60
Tabla 12. Determinación del coeficiente de control de flujo del sistema generador de hidroperóxidos	66
Tabla 13. Distribución del control de flujo del sistema reductor de hidroperóxidos dependiente de TXN en <i>T. cruzi</i>	68

## Abreviaturas

ADN:	ácido desoxirribonucleico
$a_i$ :	actividad de la enzima $i$
$a_{i0}$ :	actividad basal de la enzima $i$
APx:	ascorbato peroxidasa
BSA:	albúmina bovina sérica
BNZ:	benznidazol
$C_{ai}^J$ :	coeficiente de control de flujo de la enzima $i$
Cat:	catalasa
Cf21:	Peroxiredoxina 21 de <i>Crithidia fasciculata</i>
CumOOH:	hidroperóxido de cumeno
Cys:	cisteína
$E^\circ$ :	potencial redox
ERN:	especies reactivas de nitrógeno
ERO:	especies reactivas de oxígeno
$\gamma$ -EC:	gamma glutamil cisteína
$\gamma$ -ECS:	gamma glutamil cisteína sintetasa
Glu:	glutamato
Gly:	glicina
GPx, GPxA:	glutación peroxidasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
GR:	glutación reductasa
GSH:	glutación (forma reducida)
GSSG:	disulfuro de glutación
J:	flujo de la vía
$k_{cat}$ :	constante catalítica
$K_i$ :	constante de inhibición
$K_m$ :	constante de Michaelis-Menten
LinOOH:	hidroperóxido de ácido linoléico
NAD <sup>+</sup> :	dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada)
NADH:	dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
NADP <sup>+</sup> :	fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada)
NADPH:	fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
NFX:	nifurtimox
PCOOH:	hidroperóxido de fosfatidilcolina
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
Prx:	peroxiredoxina
Put:	putrescina
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-butOOH:	ter-butyl hidroperóxido
TDPx:	triparedoxina peroxidasa tipo II de <i>Leishmania major</i>

Trx:	tioredoxina
TrxR:	tioredoxina reductasa
TryP:	triparedoxina peroxidasa de <i>Leishmania major</i>
TryR:	tripanotión reductasa
TryS:	tripanotión sintetasa
TS <sub>2</sub> :	disulfuro de tripanotión
T(SH) <sub>2</sub> :	tripanotión (forma reducida)
TS <sub>2</sub> :	disulfuro de tripanotión (forma oxidada)
TXN:	triparedoxina de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TXNPx:	triparedoxina peroxidasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
v <sub>0</sub> :	velocidad inicial
V <sub>m</sub> :	velocidad máxima

## Resumen

*Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas. Debido a la falta de fármacos efectivos y específicos contra el parásito, continúa la búsqueda de nuevos sitios terapéuticos. En tripanosomátidos, el sistema desintoxicante de peróxidos recae en el tripanotión (TSH) en lugar del glutatión como en células de mamífero. El TSH cede sus electrones a la triparedoxina (TXN); esta proteína en su forma reducida transfiere los electrones a la triparedoxina peroxidasa (TXNPx) y la glutatión peroxidasa (GPxA), las cuales reducen distintos hidroperóxidos. El tripanotión oxidado es reducido nuevamente por la tripanotión reductasa (TryR). Debido a estas peculiaridades, todas las enzimas de esta vía se han propuestos como blancos terapéuticos.

Mediante la comparación de las eficiencias catalíticas ( $k_{cat}/K_m$ ) de las enzimas recombinantes, diversos autores han propuesto a la reducción de TXN por el TSH como el sitio potencial de intervención terapéutica. Sin embargo, durante la realización de mi tesis de licenciatura demostré que bajo condiciones fisiológicas de pH y temperatura, en este sistema antioxidante la reacción con menor  $k_{cat}/K_m$  era la reducción del peróxido por la GPxA.

En esta tesis apliqué los fundamentos del Análisis del Control Metabólico y la reconstitución *in vitro* de la vía, para determinar el grado de aportación de cada una de las enzimas al flujo de la vía, denominado coeficiente de control de flujo. Primero establecí un protocolo para determinar la actividad de las enzimas en el parásito, obteniendo que su proporción fisiológica era de 3:1:2:0.08 para TryR, TXN, TXNPx y GPx, respectivamente. La reconstitución *in vitro* la realicé respetando estas proporciones para determinar los coeficiente de control de flujo, los cuales fueron TryR=0.2, TXN=1.0, TXNPx=1.0, GPxA<0.3. Este análisis indicó que el control del flujo de reducción de hidroperóxidos lo tienen la TXN y la TXNPx por lo que serían mejores blancos terapéuticos que la TryR.

## Abstract

*Trypanosoma cruzi* is the causal agent of Chagas disease. The lack of effective drugs against this parasite supports the search for new therapeutic targets. In trypanosomes, the peroxide detoxifying system relies in trypanothione (TSH) instead of glutathione as in mammalian cells. TSH transfers its electrons to tryparedoxin (TXN); in its reduced form, TXN in turn transfer them to tryparedoxin peroxidase (TXNPx) and glutathione peroxidase (GPxA), which catalyze the hydroperoxide reduction. Oxidized trypanothione is reduced by trypanothione reductase (TryR). Due to these peculiarities, all the pathway enzymes have been proposed as drug targets.

By comparing the catalytic efficiencies ( $k_{cat}/K_m$ ) values of the recombinant enzymes, several authors have proposed that TXN reduction by TSH was a potential site for therapeutic intervention. However, in my undergraduate thesis, I demonstrated that at physiological temperature and pH conditions, the reaction with the lowest  $k_{cat}/K_m$  of the system was the hydroperoxide reduction mediated by GPxA. In this thesis, I applied the fundamentals of Metabolic Control Analysis and the *in vitro* pathway reconstitution to determine the degree of influence of each enzyme to the pathway flux, named flux control coefficient. Firstly, I established an experimental protocol to determine the enzyme activities in cytosolic parasite extracts. I determined a ratio of 3:1: 2: 0.08 for TryR, TXN, TXNPx and GPX, respectively. The *in vitro* pathway reconstitution was done using this physiological ratio to determine the flux control coefficients for each enzyme, which were TryR=0.2, TXN=1.0, TXNPx=1.0 and GPxA<0.3. This analysis indicates that the control on the flux of hydroperoxide reduction in the parasite mainly relied on TXN and TXNPx which can be better therapeutic targets than TryR.

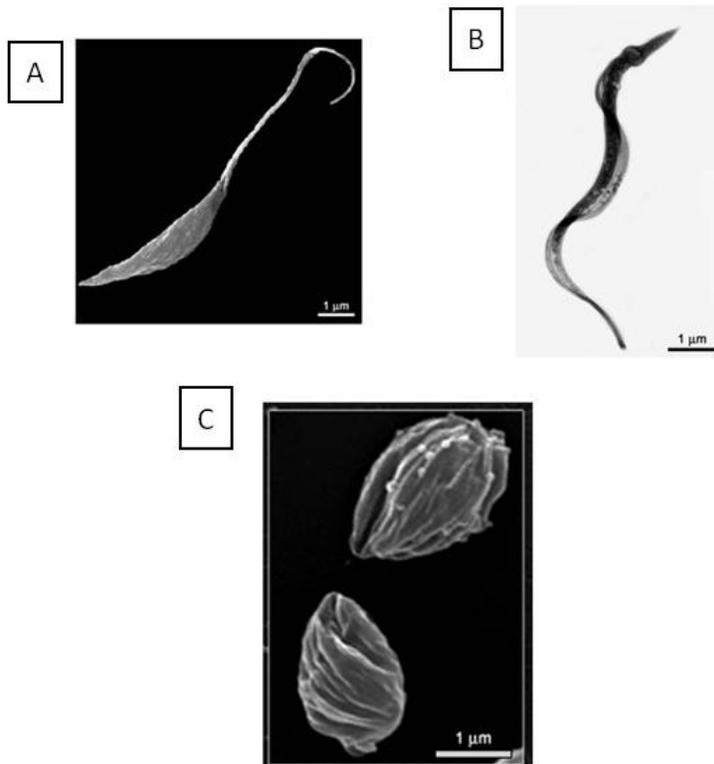
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Biología de *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es un protista flagelado del Orden Kinetoplastida, de la familia de los Tripanosomatidae, el cual es el causante de la enfermedad de Chagas. Este parásito se caracteriza 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 (Fig. 1) durante su ciclo de vida (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 anterior 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 7 de las enzimas glicolíticas, además de otras enzimas del metabolismo intermediario (Michels *et al.* 2006)

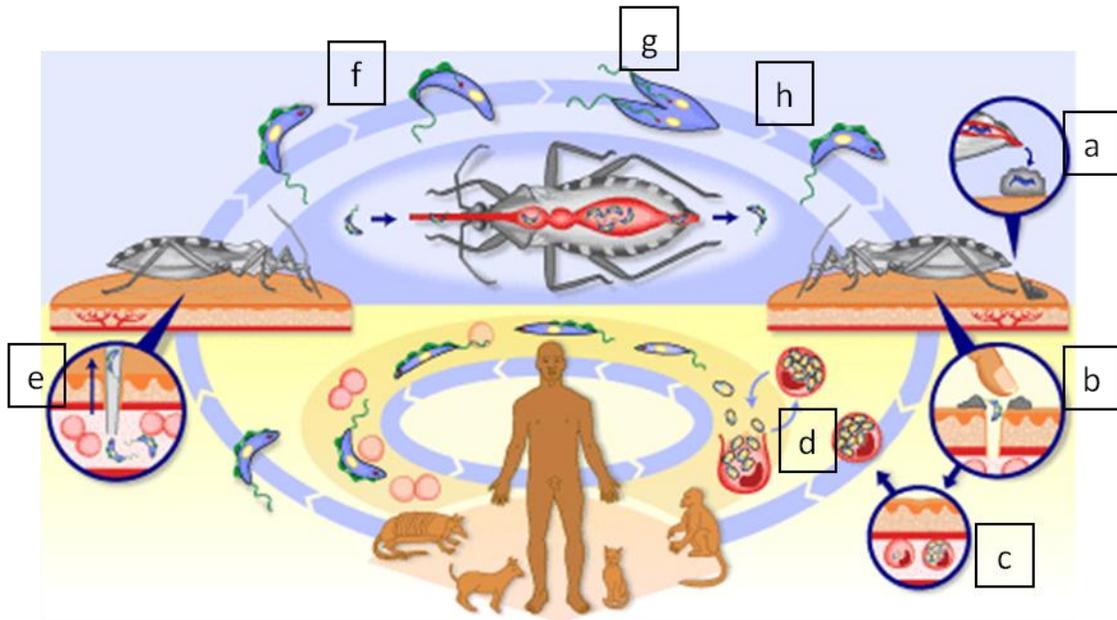


**Figura 1. Estadios morfológicos de *T. cruzi*.** (A) Microscopía electrónica de barrido de epimastigote. (B) Microscopía electrónica de alto voltaje de tripomastigote. (C) Microscopía electrónica de barrido de alta resolución de amastigote. Tomadas de <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=70>

## 1.2 Ciclo de vida del parásito.

*Trypanosoma cruzi* necesita tanto insectos hematófagos como algunos mamíferos para completar su ciclo biológico. El ciclo puede empezar cuando un triatómino infectado se alimenta de la sangre de un mamífero y al momento de deyectar deposita 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 metacíclico invade células epiteliales, musculares, nerviosas, fibroblastos o macrófagos del hospedero (Maya *et al.* 2007, Toma *et al.* 2000) y pierde su flagelo transformándose en amastigote, el cual se reproduce por fisión binaria (Fig. 2c). Después de aproximadamente cinco días, el parásito se transforma nuevamente en tripomastigote, rompe la célula y se libera al torrente sanguíneo (tripomastigote sanguíneo) (Fig. 2d). De esta manera, algunos

tripomastigotes invaden otras células para multiplicarse, mientras que otros son 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***

(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 invade las células del hospedero, donde se transforma a amastigote y después de algunos días se transforma a tripomastigote. (d) Las células infectadas se rompen, liberando al torrente los tripomastigotes sanguíneos. (e) El parásito es 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 metacíclico, llegando a formar parte de las heces. Tomado de <http://www.who.int/tdroid/diseases/chagas/lifecycle.htm>.

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). Ahora se sabe 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”). Como se mencionó anteriormente, 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).

Además del género *Triatoma*, los vectores de la enfermedad pueden ser de los géneros *Paratriatoma*, *Rhodnius*, *Panstrongylus* y *Eratyrus* por mencionar algunos. En México el problema puede ser mayor debido a la extensa diversidad de los vectores, ya que se han encontrado cerca de 30 especies de triatomas (Cruz y Pickering, 2006). Esto hace difícil establecer cuál es la especie es más infectiva, ya que esta característica 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 o por infecciones debidas a accidentes en laboratorios y al manipular animales que sirven como reservorio del parásito (Tay-Zavala *et al.* 1995, Velasco *et al.* 2002; OMS 2009). Es importante recalcar lo que 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 dos etapas.

*Etapas aguda:* Se inicia en el momento de la mordedura del vector y generalmente es asintomática; los casos en los que se observan síntomas presentan 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), adenopatía generalizada, hepatoesplenomegalia, miocarditis o en algunos casos severos meningoencefalitis (Coura y Borges, 2010). Estos síntomas pueden durar hasta 30 días, y es común que se confundan con algunos otros padecimientos o simples mordeduras de insectos. Se estima que solamente 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 crónica:* Al comienzo de esta etapa no se presentan síntomas, por lo que los pacientes pueden presentar electrocardiogramas normales, así como radiografías normales del corazón, esófago y colon. Esta etapa inicia 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) en el curso de la cual pueden presentar electrocardiogramas con algunas anormalidades y radiografías de corazón, esófago y colon normales; sin embargo, presentan reactividad positiva a pruebas serológicas, por lo que estos pacientes actúan

como reservorios del parásito y ayudan a mantener su ciclo de vida. El resto de los pacientes evoluciona a la fase sintomática de la etapa crónica (WHO 2002; Coura y Borges, 2010) en la cual se pueden diferenciar las formas cardíacas o digestivas de la enfermedad. La forma cardíaca puede presentarse entre los 5 y los 15 años posteriores a la infección, donde las complicaciones pueden ser arritmia, paro cardíaco (produciendo la muerte), tromboembolismo, bloqueo atrioventricular o de rama, cambios en el sistema nervioso periférico que causan debilitación sensorial. En el caso de la forma digestiva existen complicaciones digestivas caracterizadas por megaesófago, megacolon o anomalía en los movimientos peristálticos (Coura y Borges, 2010). 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).

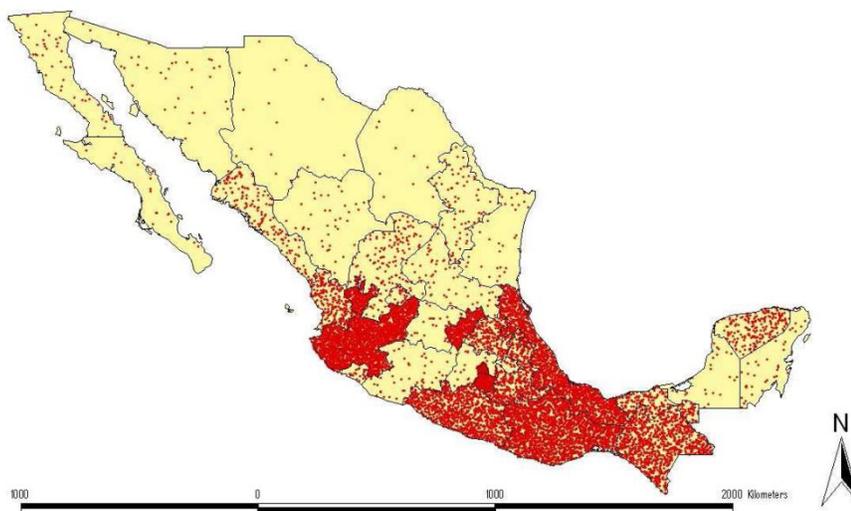
Hasta 1990 los reportes sobre la enfermedad de Chagas indicaban que en el mundo alrededor de 30 millones de personas se encontraban infectados por *T. cruzi*; aproximadamente 700,000 nuevos casos se detectaban cada año y cerca de 45,000

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 a 11,000 defunciones en el periodo 2002-2008; y de 300,000 a 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 a las ciudades y a la posterior contaminación por transfusión sanguínea. La incidencia de sangre contaminada con *T. cruzi* en los bancos de sangre se reporta que 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).

### 1.6.1 Estadísticas de la enfermedad de Chagas en México

En México los estados con más casos detectados son Jalisco, Oaxaca, Veracruz y Guerrero (Fig. 3) (Cruz y Pickering, 2006).



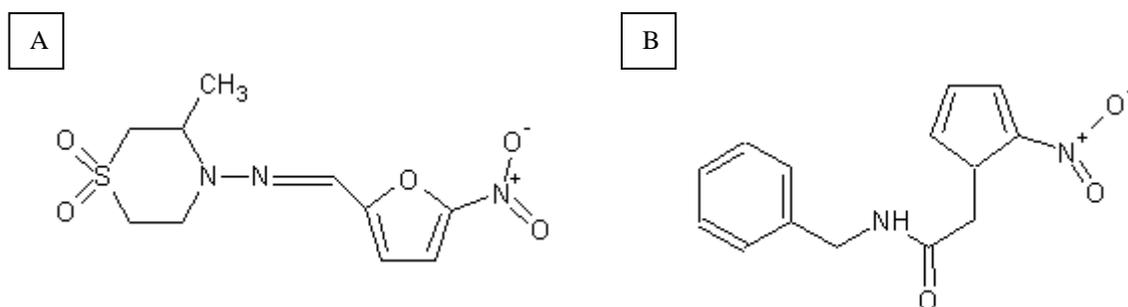
**Figura 3. Casos de enfermedad de Chagas reportados por estado.**  
Un punto corresponde a un caso. Tomado de <http://www.ibiologia.unam.mx/pdf/noticias/CHAGMEX.pdf>

La enfermedad de Chagas en México constituye un importante problema de salud pública. En el año 2005 se reportaron 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. La tasa de prevalencia es de 1.03% y de incidencia de 0.007% (WHO/NTD/IDM 2006, citado en Reisenman *et al.* 2010). Sin embargo, existen zonas del estado de Veracruz donde la seroprevalencia es tan alta que se consideran hiperendémicas, tales como los pueblos Las Josefinas y Caxapa con una seroprevalencia del 40 y 60 % respectivamente, los cuales se encuentran en el municipio de Tezonapa (Ramos-Ligonio *et al.* 2010). Por otro lado, en el estado de San Luis Potosí existen comunidades con una seroprevalencia del 7 al 13 % (Juarez-Tobias *et al.* 2009). Esto sugiere que una razón por la que la mayoría de los casos reportados se encuentran en los estados del sureste mexicano (Fig. 3) es simplemente porque existen más estudios en el sur que en el norte de la república.

Debido a las altas estadísticas y afectaciones por esta enfermedad en la población mexicana es necesario encontrar nuevas formas de combatirla.

### 1.7 Tratamiento contra la enfermedad de Chagas

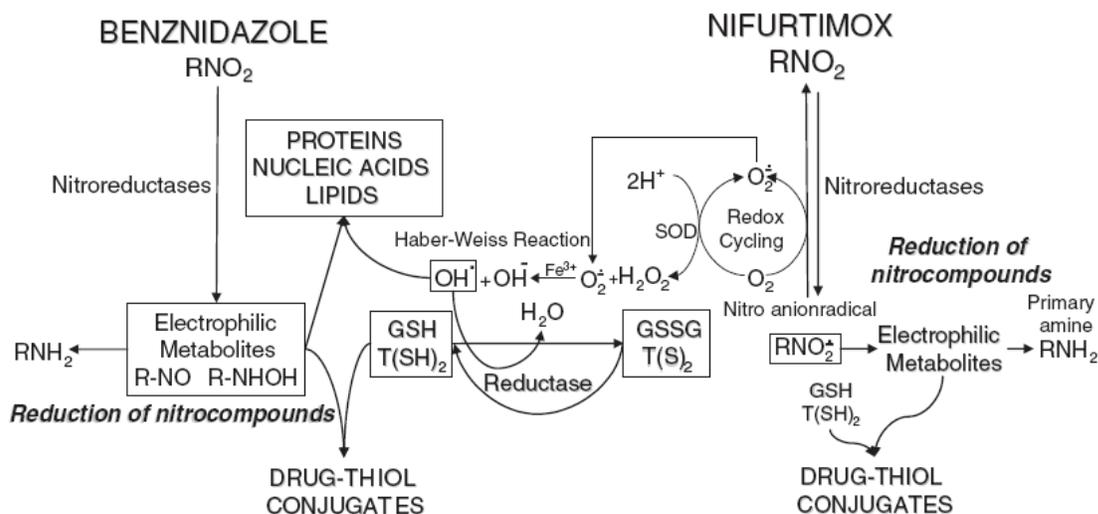
Se han utilizado una gran cantidad de fármacos para el tratamiento de esta enfermedad (Coura, 2009); sin embargo, actualmente los más utilizados son el nifurtimox (NFX; Fig. 4A) y el benznidazol (BNZ; Fig. 4B) (Coura y de Castro, 2002).



**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-tiazin-4-il)-1-(5-nitro-2-furil)metanimina). (B) Benznidazol (N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida).

El modo de acción de estos fármacos es distinto (Fig. 5): el NFX 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 anión radical nitro ( $\text{RNO}_2^{\bullet-}$ ). Este anión puede reaccionar reversiblemente con el oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) para regenerar al grupo nitro ( $\text{RNO}_2$ ) del NFX y formar al ión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ); a su vez, este último puede ser tomado por la superóxido dismutasa (SOD) para formar peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A partir de esta segunda ERO y a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss se puede formar otra como el radical hidroxilo ( $\text{HO}^{\bullet}$ ) (Hansberg *et al.* 2002). Asimismo, se pueden formar ERN a partir del óxido nítrico ( $\text{NO}^{\bullet}$ ) formado por la sintasa de óxido nítrico (NOS), el cual puede reaccionar con el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  para formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), este último puede dañar macromoléculas como lípidos, proteínas y ADN (Maya *et al.* 2007). Por otro lado, el grupo nitro del BNZ también es reducido por la nitroreductasa formando metabolitos electrofílicos ( $\text{RNO}$ ,  $\text{RNHOH}$ ) que pueden formar conjugados con moléculas con grupos tiol ( $-\text{SH}$ ) como el tripanotión ( $\text{T}(\text{SH})_2$ ; [ $\text{N}^1, \text{N}^8$ -bis(glutathionil)espermidina] o el glutatión (GSH;  $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilglicina) o reaccionar con el radical  $\text{HO}^{\bullet}$  y de esta manera formar conjugados con macromoléculas (proteínas, lípidos y ADN) (Maya *et al.* 2007).



**Figura 5. Modo de acción de los fármacos antichagásicos.**

El grupo nitro del BNZ y NFX se reduce por las nitroreductasas de *T. cruzi*, con lo que se generan metabolitos electrofílicos capaces de unirse a moléculas con grupos tiol; además la reversibilidad de la reacción del NFX aumenta la reactividad de este fármaco, por lo que puede generar ERO y ERN). Tomado de Maya *et al.* 2007.

Es claro que la diferencia en el modo de acción de ambos fármacos se debe a la capacidad del NFX para formar ERO y ERN; sin embargo se han documentado otras diferencias:

- 1) cuando se induce la sobreexpresión de una enzima reductora de hidroperóxidos en células de *T. cruzi* y se evalúa su resistencia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ter-butil hidroperóxido (t-butOOH), BNZ o NFX, las células únicamente muestran resistencia a los hidroperóxidos pero no a los fármacos (Wilkinson *et al.* 2000b).
- 2) cuando se evalúa la concentración de tioles (GSH, T(SH)<sub>2</sub>, glutationil espermidina [GSHSp]) de células de distintas cepas de *T. cruzi* sometidas a BNZ o NFX, se observa que en los dos casos existe una tendencia a que disminuya la concentración de tioles; sin embargo, el decremento es mayor en las células tratadas con NFX (Maya *et al.* 1997).
- 3) el efecto del BNZ de disminuir las pozas de tioles, conduce a un estrés oxidante en la célula y probablemente a un aumento en las ERO y ERN, por ello al menos una cepa de *T. cruzi* es resistente a BNZ gracias a que tiene la capacidad de sobreexpresar una enzima reductora de hidroperóxidos. (Nogueira *et al.* 2009);

Estas evidencias experimentales sugieren que el mayor efecto de ambos fármacos sobre células de *T. cruzi* se debe a su capacidad para conjugarse con moléculas con grupos tiol y no a su capacidad (o incapacidad) para formar ERO o ERN.

El uso de estos fármacos para el tratamiento de la enfermedad tiene algunas desventajas. 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) El tratamiento con NFX y BNZ cura únicamente alrededor de 40 – 80% de los casos en la etapa aguda de la enfermedad (Murta *et al.* 1998) pero tienen capacidad limitada (20%) en la etapa crónica (Coura, 2009). Se ha visto que su efecto tripanocida es contra todos los estadios del parásito, aunque es mayor contra los 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 para el NFX o de 5 mg/Kg para el BNZ, dividido en 2 ó 3 dosis diarias durante 60 días (Coura, 2009);

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

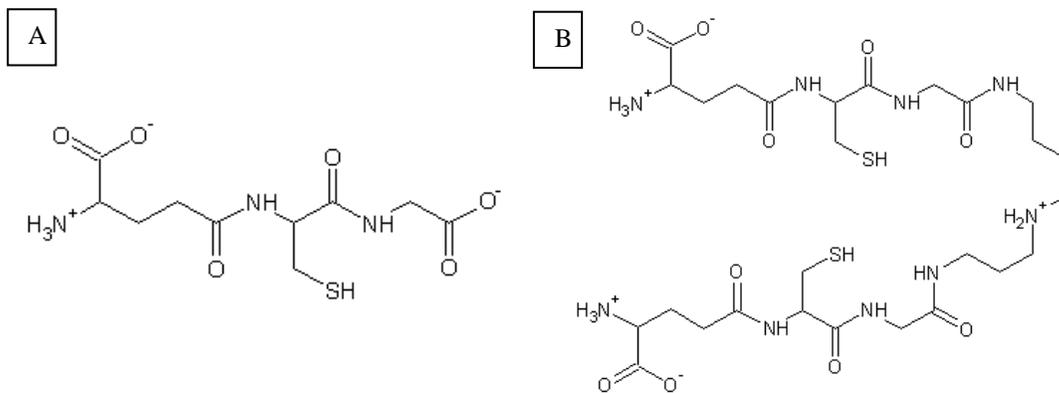
iv) Tienen efectos secundarios adversos sobre el hospedero, tales como anorexia, alteraciones psicológicas, somnolencia, hipersensibilidad (erupciones cutáneas, dermatitis), alucinaciones, depresión medular y depresión del sistema nervioso central y periférico (Coura y de Castro, 2002; Maya *et al.*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

v) Debido a todas estas razones y a que la administración de los fármacos 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. Se han propuesto intervenir en enzimas del metabolismo de esteroides, la proteasa de cisteína cruzipaina, la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa, topoisomerasas de ADN, hidrofolato reductasa y metabolismo del pirofosfato (Coura y de Castro 2002), además de las enzimas involucradas en el metabolismo antioxidante del parásito que se basa en el T(SH)<sub>2</sub>. (Olin-Sandoval *et al.* 2010).

## 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. 6A), el cual está presente en concentraciones intracelulares de 1 – 10 mM (Henderson y Fairlamb, 1987). El GSH reduce a los hidroperóxidos de manera indirecta por acción de distintas glutatión peroxidasas dependientes de selenio (SeGPxs). El disulfuro de glutatión (GSSG) resultante es reducido por acción de la glutatión reductasa (GR) con gasto de NADPH (Fig. 11A) (Januel *et al.* 2006, Augustyns *et al.* 2001). Las SeGPxs no son las únicas que se encargan de neutralizar las ERO ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^{\bullet}$ ), pues también existen distintas SODs que dismutan el  $O_2^{\bullet-}$  para generar  $H_2O_2$ , el cual es transformado por la catalasa (Cat) en  $O_2$  y  $H_2O$ . Además existe el sistema reductor de peróxidos dependiente de tioredoxina (tioredoxina reductasa/tioredoxina/tioredoxina peroxidasa (TrxR/Trx/TrxPx) (Fig.8B) (Hansberg *et al.* 2002, Augustyns *et al.* 2001, Alphey *et al.* 1999).



**Figura 6. Principales tioles en *T. cruzi*.**

(A) Estructura del glutatión, L-γ-glutamil-L-cisteinilglicina. (B) Estructura del tripanotión, N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(glutathionil)espermidina.

En humanos y otros mamíferos, el metabolismo antioxidante depende del GSH, sin embargo en los tripanosomátidos depende del T(SH)<sub>2</sub> (Fig. 6B). Esta diferencia en la función fisiológica se da a pesar de que:

1) la concentración de GSH en el parásito es de 0.3 - 0.8 mM (5 - 9.5 nmol/10<sup>8</sup> células considerando que el 20% está en forma libre y que hay 30 µL de volumen intracelular en 10<sup>9</sup> epimastigotes de *T. cruzi*; revisado en Olin-Sandoval *et al.* 2010; Olin-Sandoval *et al.* 2012). Estas concentraciones son comparables con las del T(SH)<sub>2</sub> (0.1-2.1 mM); aunque ambas pueden variar dependiendo del estadio del parásito (Olin-Sandoval *et al.* 2010) y

2) los potenciales redox del GSH y T(SH)<sub>2</sub> son muy similares (-230 a -250 mV y -242 mV, respectivamente).

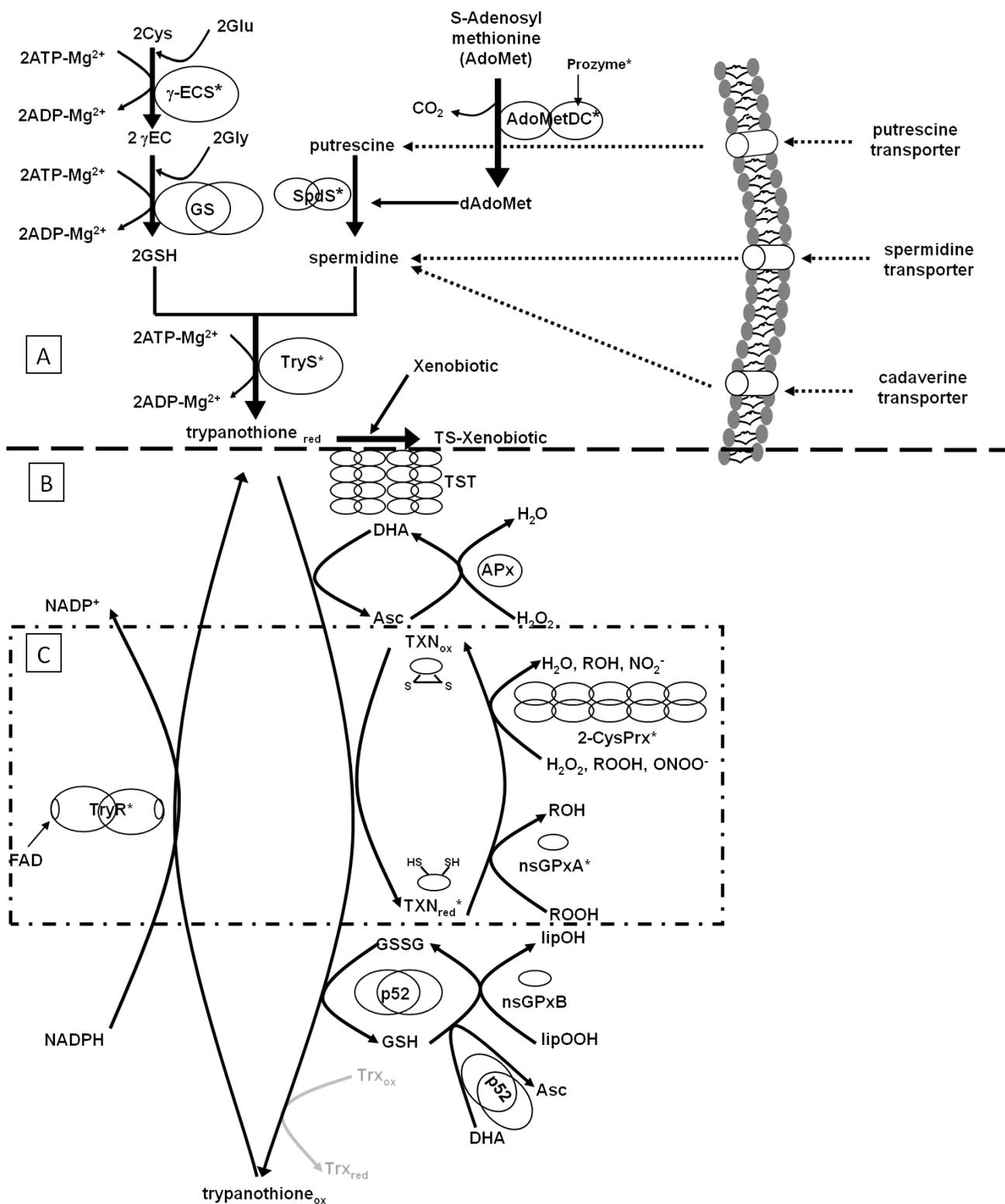
La razón por la cual el sistema antioxidante de los tripanosomátidos recae en el T(SH)<sub>2</sub> es porque cinéticamente se favorece más la oxidación de los tioles intramoleculares del T(SH)<sub>2</sub>, que la oxidación entre dos moléculas de GSH. Asimismo, el pKa del T(SH)<sub>2</sub> (7.4) coincide 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)<sub>2</sub> junto con su enzima la tripanotión reductasa (TryR) reemplazan al sistema GSH/GR de mamíferos (Fairlamb y Cerami, 1992; Krauth-Siegel *et al.* 2007; Irigoín *et al.* 2008).

### 1.9 Metabolismo del tripanotión.

El metabolismo del tripanotión (Fig.7) se puede dividir en dos secciones, la vía de su síntesis (Panel A) y la de su consumo y regeneración (Panel B) (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  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa ( $\gamma$ -ECS) que une cisteína (Cys) y glutamato (Glu) formando  $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ -EC); la segunda reacción es catalizada por la glutatión sintetasa (GS) que une a la  $\gamma$ -EC y glicina (Gly) (Fig. 7). Por otro lado, la Spd se sintetiza a partir de putrescina (Put) y s-adenosilmetionina descarboxilada (dSAM) 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)<sub>2</sub> 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. A diferencia de la enzima de otros tripanosomátidos, la TryS de *T. cruzi* puede unir otras poliaminas como la cadaverina para formar homotripanotión [N<sup>1</sup>,N<sup>9</sup>-bisglutationilaminopropilcadaverina] o espermina, dando lugar a otro homólogo del tripanotión [N<sup>1</sup>, N<sup>12</sup>-bisglutationilespermina].



**Figura 7. Metabolismo del T(SH)<sub>2</sub> 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). Los círculos de las enzimas indican el número de subunidades.

El sistema desintoxicante de hidroperóxidos en *T. cruzi* (Fig. 7B) depende en último grado del T(SH)<sub>2</sub>. Este último transfiere sus equivalentes reductores en una reacción no enzimática al dehidroascorbato (DHA) y al disulfuro de glutatión (GSSG), los cuales en su forma reducida son sustratos de la ascorbato peroxidasa (APx) y la glutatión peroxidasa B (GPxB), respectivamente. Así mismo, el T(SH)<sub>2</sub> reduce a algunas proteínas con grupos tioles reactivos como la Trx y la triparedoxina (TXN). De manera relevante, la TXN es sustrato de la glutatión peroxidasa A (GPxA) y de la 2-cisteín peroxidoredoxina, también conocida como triparedoxina peroxidasa (TXNPx) (Fig. 7B). La TXN junto con la GPxA y TXNPx constituyen el principal sistema antioxidante de los parásitos. Posteriormente, el disulfuro de tripanotión (TS<sub>2</sub>) que se produce por la reducción de los hidroperóxidos es reducido por la TryR, la cual es una flavoproteína que cataliza una reacción dependiente de NADPH (Fig. 7B).

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 y Fairlamb, 1987, Carnieri *et al.* 1993). Posteriormente se determinó que en su lugar se encuentran enzimas antioxidantes específicas de tripanosomátidos como la 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 y Krauth-Siegel, 2002). Actualmente se reconoce que el parásito tiene un sistema antioxidante muy eficiente (Irigoín *et al.* 2008).

Esta tesis se enfocó en el estudio de un segmento del metabolismo del T(SH)<sub>2</sub>, específicamente en la vía de reducción de hidroperóxidos dependiente de TXN, en la cual están involucradas las enzimas citosólicas TXN, TXNPx y GPx (Irigoín *et al.* 2008, Olin-Sandoval *et al.* 2010).

### 1.10 Características generales de la TXN

La TXN es la responsable de transferir los electrones del T(SH)<sub>2</sub> a la TXNPx y a la GPXA (Fig. 7), las cuales solamente pueden ser reducidas por dicha proteína. 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 identidad 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, sino que es reducida directamente por el T(SH)<sub>2</sub> (Castro y Tomás, 2008). Se ha descrito que la reacción de la TXN con el T(SH)<sub>2</sub> ocurre de manera más rápida que con el GSH y que este efecto puede deberse a la mayor cercanía de sus valores de pKa, potencial redox y a una mayor interacción específica entre ambos metabolitos (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 *et al.*, 2007). Otras funciones de la TXN son proveer de electrones a la ribonucleótido reductasa que cataliza la formación de precursores de ADN (Krauth-Siegel *et al.* 2007). Diversos autores reportan que la TXN es abundante en *T. brucei* (Reckenfelderbäumer y Krauth-Siegel, 2002), *T. cruzi* (Wilkinson *et al.* 2002) y *C. fasciculata* (Nogoceke *et al.* 1997), estimándose que su concentración es del 3 – 5% de la proteína total de los parásitos.

### 1.11 Características generales de la TXNPx

En los tripanosomátidos, la TXNPx (Fig. 7) es la principal enzima dependiente de TXN que desintoxica los hidroperóxidos orgánicos de cadena corta, el ONOO<sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nogueira *et al.* 2009). La TXNPx es una 2-Cys peroxiredoxina típica perteneciente a la familia de las peroxiredoxinas (Prxs). Las enzimas pertenecientes a la familia de las Prxs tales como la TXNPx tienen porcentajes altos de identidad; son generalmente ubicuas y muy abundantes en las células y se pueden presentar en diversas isoformas (Castro y Tomás, 2008). 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 Prxs presentan este mismo elemento en el carboxilo-terminal (C-terminal).

La TXNPx de tripanosomátidos está compuesta por un pentámero de dímeros formados por subunidades de 22 kDa. Se ha reportado que la enzima es activa únicamente en su forma decamérica o estado reducido (Alphey *et al.* 2000; Flohé *et al.* 2002; Krauth-Siegel *et al.* 2007); sin embargo, existen algunos reportes donde se sugiere que la enzima puede ser activa en su forma dimérica, pero presenta menor actividad (Yuan *et al.* 2010).

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

### 1.12 Características generales de la GPxA

La GPxA (Fig 7) 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). Otro nombre con el que se le ha denominado a la enzima de *T. cruzi* es triparedoxina peroxidasa tipo glutatión peroxidasa debido a su identidad (~30%) con las SeGPxs de humano (Wilkinson *et al.* 2002; Castro y Tomás, 2008; Wilkinson y Kelly, 2003; Krauth-Siegel, 2007). A causa de la semejanza en la utilización de los sustratos, a la GPx de *T. cruzi* se le compara con la SeGPxIV citosólica y mitocondrial de humanos, la cual reduce hidroperóxidos de fosfolípidos (Wilkinson y Kelly, 2003; Januel *et al.* 2006).

Las diferencias principales entre las GPX de tripanosomátidos y las de humanos son:

1) las primeras tienen una cisteína catalítica en su sitio activo mientras que las segundas tienen una selenocisteína

2) las enzimas de parásitos no pueden ser reducidas por GSH debido a su baja afinidad ( $K_{m_{GSH}}$  6 – 8 mM; Wilkinson *et al.* 2000), lo cual se debe a que los sitios de

unión están mutados o ausentes (Castro y Tomás, 2008); por otro lado, la enzima tiene una alta afinidad y especificidad por la TXN ( $K_m$  2.3  $\mu$ M; González-Chávez, 2011).

3) las SeGPxs son 5-10 veces más eficientes que las no selenocisteínicas (Hillebrand *et al.* 2003, Schlecker *et al.* 2005).

En *T. cruzi* se encuentran dos isoenzimas de GPxs (Fig. 7), la GPxA se encuentra en citosol y glicosoma, mientras que su proteína homóloga GPxB, se encuentra en el retículo endoplásmico y tiene una identidad del 30% con aquella. Ambas pueden metabolizar hidroperóxidos de ácidos grasos y fosfolípidos, pero solamente la GPxA puede metabolizar hidroperóxidos de cadena corta y ninguna de las dos reduce al  $H_2O_2$  (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 o alguna proteína similar a la tioredoxina (Wilkinson *et al.* 2002).

La enzima homóloga de *T. brucei*, conocida como triparedoxina peroxidasa III (*TbPxIII*), tiene el 72% de identidad con la *TcGPx*; sin embargo, la primera también tiene como sustrato fisiológico al  $H_2O_2$  (Krauth-Siegel *et al.* 2007). La proteína homóloga de *Leishmania major* denominada TXNPx tipo II ó TDPX, también ha sido caracterizada (König y Fairlamb, 2007).

### **1.13 Características cinéticas de las enzimas TXN, TXNPx y GPxA de *T. cruzi***

Después de estos antecedentes es claro que la vía reductora de hidroperóxidos en los tripanosomátidos (Fig. 7) difiere drásticamente de la que ocurre en mamíferos (König y Fairlamb, 2007). Debido a su importancia en el metabolismo redox de los tripanosomátidos y a su peculiaridad en estos parásitos, se han propuesto principalmente a la TXN y a la TXNPX como blancos de intervención terapéutica. Al respecto, utilizando estrategias genéticas de knock-down o knock-out se ha determinado que estas enzimas son esenciales para la sobrevivencia o manejo del estrés oxidante en *T. brucei* y *Leishmania* (Wilkinson *et al.*, 2002; revisado en Krauth-Siegel *et al.*, 2007; Irigoín *et al.*, 2008; Romao *et al.*, 2009; Olin-Sandoval *et al.*, 2010). Sin embargo, debido a que estas estrategias genéticas de validación de blancos terapéuticos son limitadas en *T. cruzi*, no se ha podido demostrar la esencialidad o el grado de relevancia de estas enzimas para esta vía metabólica en este parásito.

Para identificar las enzimas que controlan de manera principal el metabolismo antioxidante dependiente del T(SH)<sub>2</sub> en *T. cruzi*, nuestro grupo de trabajo está construyendo un modelo cinético de la vía metabólica (Fig. 7; Olin-Sandoval *et al.*, 2012), para el cual es necesario contar con los parámetros cinéticos de todas las enzimas de la vía determinadas en condiciones cercanas a las fisiológicas y todas evaluadas en las mismas condiciones experimentales, de la misma especie y cepa de tripanosomátido. En dicho modelo solamente se definieron cinéticamente a la  $\gamma$ -ECS, GS, TryS y TryR (Fig. 7). Por lo tanto, se caracterizaron a la TXN, TXNPx y GPXA recombinantes de *T. cruzi* de la cepa mexicana Ninoa en condiciones de pH 7.4 y 37 °C, las cuales son las del pH citosólico y la temperatura a la que crecen las formas infectivas del humano (González-Chávez, 2011). Los datos que obtuve para cada enzima se resumen en las Tablas 1, 2 y 3 y se comparan con los previamente reportados para las enzimas de otros tripanosomátidos.

### **1.13.1 Características cinéticas de la TXN**

En el caso de la TXN, ésta ya se había caracterizado cinéticamente para *T. cruzi* (Wilkinson *et al.*, 2002) y *C. fasciculata* (Gommel *et al.* 1997; Guerrero *et al.* 1999); sin embargo, los análisis se realizaron en condiciones alejadas de las fisiológicas (25 °C, pH 8.0 y 7.6 respectivamente) por lo que no se podían utilizar estos datos para actualizar el modelo cinético. Los datos obtenidos bajo condiciones fisiológicas y aquellos reportados, se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Parámetros cinéticos de la TXN recombinante de *T. cruzi* y *C. fasciculata***

Sustrato	<i>Km</i> ( $\mu\text{M}$ )	<i>Vm</i> (U/mg de TXN)	<i>kcat</i> ( $\text{s}^{-1}$ )	<i>kcat/Km</i> ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	Referencia
<b>T(SH)<sub>2</sub></b>	92 $\pm$ 20	97 $\pm$ 20	26 $\pm$ 6	2.8 X 10 <sup>5</sup>	a
	41 $\pm$ 5	1.2 $\pm$ 0.04	0.31	7.6 X 10 <sup>3</sup>	b
	130	-	6.5	5 X 10 <sup>4</sup>	c
	406	-	26.4	6.5 X 10 <sup>4</sup>	d
<b>GPx</b>	2.3 $\pm$ 0.9*	-	-	-	a
	2.2 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.1	0.31	140	b
	2.2	-	6.5	2.9 X 10 <sup>6</sup>	c
	4.8	-	26.4	5.5 X 10 <sup>6</sup>	d

Datos para *T. cruzi* reportados por <sup>a</sup>González-Chávez (2011) y <sup>b</sup>Wilkinson *et al.* (2002); datos reportados para la enzima de *C. fasciculata* por <sup>c</sup>Gommel *et al.* (1997) y <sup>d</sup>Guerrero *et al.* (1999). \* *Km* de TXN<sub>GPx</sub> no determinada, se determinó *Km* GPx<sub>TXN</sub>.

Los valores de *Km* reportados para la enzima de *T. cruzi* son similares; sin embargo para la enzima de *C. fasciculata* los valores de *Km* por T(SH)<sub>2</sub> son un orden de magnitud mayores. Sin embargo los valores de *Km* por GPx son menores. Por otro lado, la *Vm* de *T. cruzi* reportada por Wilkinson *et al.* (2002), es menor a la que se determinó, debido a que en aquél se realizó en condiciones limitantes del sistema acoplante, por lo que la *Vm* está subestimada.

### 1.13.2 Características cinéticas de la TXNPx

Se reportó que la TXNPx de *T. brucei* presenta inhibición por sustrato, (Diechtierow y Krauth-Siegel, 2011) así como inactivación por dilución a concentraciones menores de 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (a 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la enzima pierde el 50 % de su actividad después de 2 horas) (Flohé *et al.* 2002). Debido a esto, la caracterización cinética de la enzima de *T. cruzi* se realizó en condiciones no saturantes del sistema acoplante (TryR, T(SH)<sub>2</sub>, y TXN) que permitieran utilizar concentraciones de enzima lo

suficientemente altas para poder determinar una velocidad inicial sin que la enzima se afectara por la dilución. Esta misma estrategia la había utilizado Guerrero *et al.* (2000) para caracterizar la enzima de *T. cruzi*. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Parámetros cinéticos de la TXNPx recombinante de *T. cruzi***

Sustrato	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ (mM)	$V_m$ (U/mg)	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	*
TcTXN	$0.6 \pm 0.2$	-	$1.7 \pm 0.5$	$7.0 \pm 2.0$	$1.2 \times 10^7$	a
CumOOH	$11 \pm 4$	$0.9 \pm 0.3$			$6 \times 10^5$	
t-butOOH	$8.6 \pm 2.8$	$1.4 \pm 0.7$	$1.1 \pm 0.2$	$4.4 \pm 0.9$	$5 \times 10^5$	
	52	-	-	1.7	$3.3 \times 10^4$	b
CfTXN2	1.7	-	-		$1 \times 10^6$	

\* Valores reportados por: a) González-Chávez (2011) a 37 °C y pH 7.4 y b) Guerrero *et al.* (2000) a pH 7.6. En ambos estudios se utilizaron concentraciones subsaturantes de TryR, T(SH)<sub>2</sub> y TXN.

Estos datos muestran una estrecha similitud en la afinidad de las enzimas por las TXN de *T. cruzi* y *C. fasciculata*. Las diferencias en la  $k_{cat}$  reportadas en ambos trabajos pueden deberse tanto a la preparación enzimática como a la diferencia de condiciones del ensayo (pH, temperatura). Sin embargo, tal diferencia es irrelevante ya que en ambos estudios se subestimó el valor de  $V_m$  de la enzima al caracterizarlas en condiciones no saturantes del sistema acoplante, debido a la inestabilidad de la enzima a la dilución.

### 1.13.3 Características cinéticas de la GPxA

Realicé la caracterización de la GPxA de la cepa Ninoa de *T. cruzi* en las condiciones fisiológicas que se mencionaron anteriormente y los parámetros que obtuve los comparé con los reportados en la literatura para las enzimas de *T. cruzi* de las Silvio o CL-Brener (Tabla 3).

**Tabla 3. Parámetros cinéticos de la GPxA recombinante de *T. cruzi***

Reductor	<i>Km</i> (mM)	Oxidante	<i>Km</i> (μM)	<i>Vmax</i> (nmol/min·mg)	<i>kcat</i> (s <sup>-1</sup> )	<i>kcat/Km</i> X10 <sup>3</sup> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	*
GSH/ GR	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ND	ND	ND	ND	A
		PCOOH	0.74 ± 0.09	32 ± 0.9	-	-	
	5.9 ± 0.6	LinOOH	0.6 ± 0.05	18.2 ± 0.2	-	-	D
			1 ± 0.2	-	-	-	
	7.9 ± 1.2	t-butOOH	5.6 ± 0.5	34 ± 0.9	-	-	A
			4.6 ± 0.2	-	-	-	D
			52±4	360 ± 20	0.11 ± 0.005	2.2 ± 0.3	C
-	-	-	1.7 ± 0.2	18.2 ± 0.2	-	-	A
TXN/ T(SH) <sub>2</sub> / TryR	Ver Tabla 1	CumOOH	16 ± 1	1899 ± 155	-	35	B
	TXN <sub>GPx</sub> 0.0022 ±0.0003						
	0.0023 ±0.0009	107±16	15±0.8 31±9	5±0.2 10.2±3.1	2.1 X 10 <sup>6</sup> 9.6 X 10 <sup>4</sup>	E	
-	-	t-butOOH	51 ± 10	1300 ± 160	0.4 ± 0.05	8.3 ± 3	F

Datos reportados por: A, D y C Wilkinson *et al.* (2000); B) Wilkinson *et al.* (2002); E) González-Chávez (2011); F) Patel *et al.* (2010). \*Condiciones experimentales usadas: (A y D) pH7.4/ 30°C. (B y F) pH 8.0 / 30°C. (C) pH7.4/ 30°C. (E) pH7.4/ 37°C. ND actividad no detectada.

Es importante notar que la afinidad de la enzima por la TXN en ambos estudios es muy similar; sin embargo la afinidad por los sustratos oxidantes es distinta. Las diferencias pueden deberse a las condiciones de pH y temperatura en que se midieron o a las concentraciones utilizadas para determinar el valor de *Km*, ya que en los estudios de Wilkinson *et al.* (2000, 2002) y Patel *et al.* (2010) no se llegó a la saturación de la enzima por sus sustratos. Las diferencias en la *kcat* se deben a que durante la realización de la tesis de licenciatura, las concentraciones de los componentes del sistema acoplante fueron saturantes, mientras que en el resto de los estudios no se cuidó esta condición.

#### 1.14. Los parámetros cinéticos de las enzimas aisladas como criterio de validación de blanco terapéutico

Los potenciales catalíticos (*kcat/Km*) obtenidos de enzimas purificadas y caracterizadas cinéticamente se han utilizado para comparar las capacidades enzimáticas de diferentes enzimas (para un breve repaso de conceptos básicos de cinética enzimática consultar el anexo 1 de esta tesis). Debido a que la TXN tenía los

menores potenciales catalíticos (Tabla 1), comparada con la TXNPx y GPxA (Tablas 2 y 3), Wilkinson *et al.* (2002) y Guerrero *et al.* (2000) propusieron que la TXN es el paso limitante del sistema antioxidante dependiente de TXN en los tripanosomátidos, y por lo tanto era el blanco terapéutico a considerar en esta vía. Sin embargo, este tipo de análisis simplista puede tener muchos inconvenientes. Por ejemplo, si el ensayo enzimático se realiza en condiciones no saturantes de alguno de los sustratos, el valor de la *k<sub>cat</sub>* se subestima y por lo tanto el potencial catalítico también se subestima. Por otro lado, los valores de *K<sub>m</sub>* para las enzimas reportadas generalmente se determinan al pH óptimo de cada enzima, el cual puede estar alejado del pH citosólico del parásito. Por lo tanto, la comparación de los potenciales catalíticos de las tres enzimas de los datos reportados en la literatura se dificulta porque cada enzima se caracterizó en diferentes amortiguadores, diferentes laboratorios o las enzimas proviene de diferentes especies o cepas.

Los resultados que obtuve en mi tesis de licenciatura en la que las tres enzimas se caracterizaron en las mismas condiciones experimentales, permitieron hacer la comparación de las capacidades catalíticas de cada enzima en condiciones de pH y temperatura que no solamente son las mismas, sino también son cercanas a las fisiológicas y pertenecen a la misma especie y cepa de parásito. Los resultados que obtuve señalan que la reacción menos eficiente es la reducción del ROOH por la GPx (Tabla 3), seguida de la transferencia de electrones del T(SH)<sub>2</sub> a la TXN (Tabla 1).

Sin embargo, para poder predecir qué enzima podría tener un mayor control del flujo de reducción de hidroperóxidos en la célula, no es suficiente con obtener los potenciales catalíticos a partir de enzimas puras, sino que además se debe tener en cuenta la concentración de enzimas y metabolitos en el parásito, ya que un bajo potencial catalítico puede verse compensado con una alta concentración de enzima en la célula, o con una alta concentración de sustrato, lo cual mantendría a la enzima saturada y por lo tanto trabajando cerca de su velocidad máxima (*V<sub>m</sub>*). Asimismo, un alto potencial catalítico de una enzima podría verse afectado por una baja concentración de enzima en la célula o una concentración baja de sustrato, con lo cual la enzima trabajaría a una velocidad baja; en estas condiciones, una enzima catalíticamente muy eficiente podría controlar el flujo de la vía. Por esta razón también

es necesario considerar la concentración de enzima en la célula y las concentraciones de los sustratos.

En la Tabla 4 se muestra las relaciones de la eficiencia catalítica ( $V_m/K_m$ ) para cada enzima (ver anexo 1 para esta definición). El valor de  $V_m$  es el valor de actividad de la enzima determinada en extractos del parásito o la que se puede determinar a partir de la constante de velocidad  $k_{cat}$  y la concentración de enzima determinada en la célula de acuerdo a la ecuación

$$V_m = k_{cat} \cdot [\text{enzima total}] \quad \text{ecuación 1} \quad (\text{ver anexo 1}).$$

La comparación de los datos de la Tabla 4, indican que la enzima catalíticamente menos eficiente es en efecto la TXN. Sin embargo las concentraciones de metabolitos que se encuentran en la misma tabla también indican que la TXN se encuentra saturada por sus tres sustratos  $T(SH)_2$ , TXNPx y GPx y es la más abundante en la célula, por lo que no se puede precisar si la TXN podría limitar el flujo de la vía en la célula.

**Tabla 4 Comparación de parámetros cinéticos de las enzimas pertenecientes a la vía de reducción de hidroperóxidos dependiente de TXN.**

Enzima	$k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	[enzima] (mM)	$V_m$ (mU/mg)	$K_m$ (mM)	$V_m/K_m$ (mL/min-mg)
TryR	$10^6$ - $10^9$	0.0007	264	0.023 – TS <sub>2</sub> 0.009 – NADPH	11 – TS <sub>2</sub> 29 – NADPH
TXN	$10^3$ - $10^5$	0.222	25	0.09 – T(SH) <sub>2</sub>	0.3 – T(SH) <sub>2</sub>
TXNPx	$10^4$ - $10^7$	0.041	2500	0.0006 – TXN 0.01 – ROOH	$4 \times 10^3$ – TXN 250 – ROOH
GPx	$10^4$ - $10^6$	0.022	95	0.0023 – TXN 0.1 – ROOH	41 – TXN 0.9 – ROOH
<b>metabolito</b>		<b>[metabolito] intracelular (mM)</b>			
NADPH		0.12			
NADP <sup>+</sup>		0.04			
T(S) <sub>2</sub>		0.5			
T(SH) <sub>2</sub>		3.8			
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	0.0001	-	-	-

Intervalos de  $k_{cat}/K_m$  reportados: TyrR en Krauth-Siegel *et al.* 1987 y Olin-Sandoval *et al.* (2012); para TXN y GPx en Wilkinson *et al.* (2002) y González-Chávez (2011); para TXNPx en Guerrero *et al.* (2000) y González-Chávez (2011). Concentración de TryR reportada en Olin-Sandoval *et al.* (2012); de TXN se recalculó de Wilkinson *et al.* (2002); la concentración de TXNPx y GPx reportadas en Diechtierow y Krauth-Siegel (2011) en *T. brucei* a partir de un Western blot. Valores de  $V_m$  reportados en: Olin-Sandoval *et al.* (2012) para TryR; Wilkinson *et al.* (2002) para TXN, y recalculados para GPx y TXNPx utilizando la ecuación 1, a partir del valor de  $k_{cat}$  reportado en González-Chávez (2011), suponiendo que la concentración de la columna anterior fuera completamente activa. Concentraciones de metabolitos reportadas en Olin-Sandoval *et al.* (2012); concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reportada por (González-Flecha y Demple, 1997) para células de *E. coli*.

Por lo tanto, para poder determinar cuál o cuáles de las enzimas controlan el flujo del sistema de desintoxicación de peróxidos, se requiere aplicar herramientas de análisis del metabolismo, las cuales evalúen simultáneamente estas y otras variables.

Al respecto, el análisis del control metabólico (MCA por las siglas en inglés de Análisis de Control Metabólico) es un tipo de análisis cuantitativo que permite hacer un análisis multivariable que podría ayudar a determinar el grado de control que cada uno de los componentes de este sistema enzimático tiene sobre el flujo de reducción de hidroperóxidos. A continuación se hace una descripción breve de este marco teórico, pero más información se puede encontrar en el anexo 2 de esta tesis.

### **1.15. Análisis del control metabólico como herramienta para determinar la distribución de control de una vía metabólica.**

El análisis de control metabólico cuantifica el grado de control que una enzima ejerce sobre el flujo o sobre la concentración de un metabolito de la vía a la que pertenece. Los estudios del MCA han demostrado experimentalmente que el control del flujo de una vía metabólica se distribuye entre todos los componentes en diferentes grados; esto es, que hay dos o tres enzimas que controlan más el flujo mientras que otras ejercen control pero en menor grado. Para establecer el grado de control de cada enzima o componente del sistema, se definió el coeficiente de control de flujo ( $C_{ai}^J$ ) el cual es el grado de control que ejerce la actividad (a) de la enzima *i* sobre el flujo (J) de la vía metabólica.

Para determinar el  $C_{ai}^J$ , se requieren variaciones pequeñas de la actividad de la enzima que se desea evaluar en la célula, sin alterar la actividad del resto de las enzimas, y se evalúa su efecto sobre el flujo de la vía. Por lo tanto, la distribución del control de una vía metabólica será el conjunto de coeficientes de control de flujo o de concentración de metabolitos determinados para cada enzima de la vía.

Para realizar el experimento de modulación gradual de la actividad de una enzima en la célula para determinar los coeficientes de control de las enzimas se han desarrollado diversas herramientas que involucran genética clásica, ingeniería genética,

uso de inhibidores específicos, modelado matemático de la vía (conocido como “bottom-up” Systems Biology) y el análisis de elasticidades que mide el efecto sobre una enzima o grupo de enzimas al variar alguno de sus ligandos en la célula. Otra herramienta desarrollada para determinar coeficientes de control de las enzimas de una vía es la reconstitución *in vitro* de la vía metabólica, para lo cual se deben tener los sustratos y las enzimas en su forma purificada, y conocer la proporción fisiológica de las enzimas en la célula para poder hacer la reconstitución de la vía en condiciones lo más cercanas a las fisiológicas (Moreno-Sánchez *et al.* 2008a). En un sistema como éste se tiene el control de la concentración de metabolitos, y basta con variar la concentración de una enzima y mantener las otras enzimas constantes en el sistema reconstituido, para obtener cambios en el flujo de la vía. A partir de la gráfica de flujo contra concentración de enzima se puede calcular el  $C_{ai}^J$ . Al repetir este proceso para los diferentes componentes de la vía se puede obtener la distribución del control de flujo de la vía que se está estudiando. Las enzimas con mayores coeficientes de control de flujo serán aquellas que al variar su actividad ocasionen grandes cambios en el flujo de la vía; por lo tanto, estas enzimas serán las que tengan mayor control sobre el flujo de la vía.

Los resultados de este tipo de enfoque podrían permitir identificar las posibles enzimas que tienen el mayor control del flujo en la vía de desintoxicación de peróxidos de *T. cruzi*, en el cual son muy limitadas las estrategias de modulación de la actividad de una enzima.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Desde el punto de vista metabólico, un blanco con alto potencial terapéutico podría ser aquel que: a) no se encuentra en el hospedero, b) se encuentre en una concentración baja ( $V_m$  baja) y c) tenga un alto coeficiente de control de flujo.

Diversos investigadores han propuesto a la reacción de la TXN con el T(SH)<sub>2</sub> 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 y metabólicos obtenidos por estos mismos investigadores y por nuestro grupo de trabajo analizados con un enfoque diferente, sugieren que las enzimas participantes en la vía de reducción de hidroperóxidos de *T. cruzi* son abundantes y/o muy eficientes en la célula, por lo que resulta complicado predecir cuál de las enzimas tendrá un mayor control del flujo de la vía. Por lo tanto, esta tesis se enfocó en determinar la distribución del control en esta vía aplicando los fundamentos cuantitativos del Análisis del Control Metabólico para poder identificar a la(s) enzimas o proteínas que tienen un mayor control sobre el flujo del sistema desintoxicante de hidroperóxidos de *T. cruzi*. La determinación de la distribución del control de flujo en la vía de reducción de hidroperóxidos puede ayudar a la identificación de la(s) enzima(s) que controla(n) el flujo, y por lo tanto proponerla(s) como blanco(s) de intervención terapéutica.

### 3. HIPÓTESIS

El control del flujo de reducción de peróxidos de *Trypanosoma cruzi* recaerá principalmente sobre la TXN y la GPxA por ser las enzimas catalíticamente menos eficientes de la vía metabólica.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

Determinar la distribución del control de flujo de reducción de peróxidos de *T. cruzi* a través de la reconstitución *in vitro* de la vía.

#### 4.2 Objetivos particulares

- Determinar la actividad ( $V_m$ ) de las enzimas TXN, GPx y TXNPx en extractos del parásito para determinar las proporciones fisiológicas.
- Reconstruir la vía con las enzimas purificadas, utilizando tanto las proporciones fisiológicas de las enzimas, como condiciones de pH y temperatura fisiológicas.
- Calcular los coeficientes de control de flujo de cada componente del sistema de reducción de peróxidos del parásito a través de la reconstitución *in vitro* de la vía.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Clonación de los genes, sobreexpresión y purificación de las proteínas recombinantes *TcTryR*, *TcTXN*, *TcGPxA* y *TcTXNPx*

Los genes que codifican para las enzimas se clonaron a partir de DNA genómico de la cepa Ninoa y se verificó su identidad por secuenciación de DNA como se reportó previamente (González-Chávez, 2011; Olin-Sandoval *et al.*, 2012).

La sobre-expresión de las enzimas en *Escherichia coli* fusionadas a una etiqueta de histidinas en su extremo amino terminal se reportó anteriormente (González-Chávez, 2011; Olin-Sandoval *et al.*, 2012). Brevemente, los genes se clonaron en el plásmido pET28 los cuales se utilizaron para transformar células de *E. coli* BL21(DE3). Las transformantes positivas se cultivaron a 37°C en 500 mL de medio líquido Luria-Bertani + 30 µg/mL kanamicina. Al llegar a una D.O.<sub>600nm</sub> = 0.6, se indujo la sobreexpresión de las proteínas adicionando 0.4 mM isopropiltiogalactósido (IPTG) y se continuó el cultivo toda la noche a 25°C. Las células se cosecharon a 2547 x g durante 10 min, se lisaron por sonicación y se centrifugó a 12000 x g durante 15 min.

Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad a metales con una resina comercial acoplada a cobalto (TALON metal-affinity resin; Clontech) como se describió anteriormente (González-Chávez, 2011; Olin-Sandoval *et al.*, 2012). Brevemente, el SN clarificado de las bacterias se incubó con la resina por 20 min, se centrifugó y se descartó lo que no se pegó a la columna. La resina se vertió en una columna de cromatografía y se realizaron tres lavados con buffer de lisis (100 mM trietanolamina, 300 mM NaCl, 2 mM imidazol), posteriormente se hizo un lavado con buffer con 10 mM imidazol y finalmente las proteínas se eluyeron con buffer con 100 mM imidazol.

Las proteínas se concentraron en filtros tipo Amicon (Millipore) con un corte de 10 y 30 kDa según el caso. Para mantener las enzimas estables durante el almacenamiento (3 semanas como máximo) se les agregó glicerol a una concentración final del 50% y se guardaron a -20 °C.

Las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry como se describió anteriormente (González-Chávez, 2011) en muestras de las proteínas precipitadas con

ácido tricloroacético debido a que el imidazol interfiere en el método. Se utilizó una curva estándar de concentraciones conocidas de albúmina de suero de bovino.

## 5.2 Síntesis *in vitro* de T(SH)<sub>2</sub>

Debido a que en los ensayos para determinar la actividad de las enzimas y para los experimentos de reconstitución se utilizan grandes cantidades de T(SH)<sub>2</sub>, el cual es sumamente caro, se montó la técnica en nuestro laboratorio de síntesis *in vitro* y purificación del metabolito la cual tuvo que modificarse de la descrita por Comini *et al.*, (2009). El protocolo se describe a continuación.

### 5.2.1 Sobreexpresión y purificación de CfTrySC59A

Se transformaron células *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pET19b-CfTrySC59A que contiene el gen mutado de la TryS de *C. fasciculata* la cual tiene la cisteína 59 mutada por una alanina, con el objeto de disminuir su actividad amidasa (la cual podría degradar el T(SH)<sub>2</sub>). La construcción del plásmido fue donado por la Dra. Luise Krauth-Siegel (Biochemiezentrum der Universität Heidelberg, Alemania). Las bacterias se seleccionaron en medio LB sólido con 100 µg/mL de ampicilina. Se seleccionaron algunas clonas, se cultivaron en 3 mL de medio con antibiótico y se indujo la expresión de la proteína con IPTG como se describió anteriormente. A partir de una clona que sobreexpresó la enzima se purificó la proteína como se describió en la sección anterior.

Se determinó la actividad de la enzima a pH 7.2 y 25 °C acoplado el ADP producto de la reacción de la enzima con la síntesis de piruvato en presencia del fosfoenolpiruvato por la piruvato cinasa (PyK); posteriormente el piruvato se reduce a lactato por la lactato deshidrogenasa con oxidación de NADH. El ensayo consistió en buffer 100 mM Hepes, 100 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 160 µM NADH, 1 mM GSH, 1 mM ATP, 2 mM PEP, 10 mM Spd, 10 mM DTT, 0.7/1.1 U PK/LDH, 20 – 60 µg de CfTrySC59A recombinante. La reacción se inicia con la adición de GSH subsaturante debido a que la enzima se inhibe a altas concentraciones y se monitoreó la oxidación del NADH a 340 nm en un espectrofotómetro marca Agilent.

### 5.2.2 Reacción de síntesis de T(SH)<sub>2</sub>

Una vez que se determinó la actividad de la CfTrySC59A, se realizó una reacción de volumen suficiente para llegar a una concentración final de enzima de 0.75 U/mL en el mismo buffer utilizado para medir su actividad y se adicionaron los sustratos en el siguiente orden: 11 mM GSH, 5 mM Spd, 1 mM ATP, 10 mM PEP, 2 U/mL PyK, 20 mM DTT. La mezcla se incubó a 25 °C durante 10 min y la reacción se inició adicionando la CfTrySC59A e incubando por otras 2 h. Al término, se adicionó TCA al 13% para precipitar la proteína, se centrifugó y el TCA se extrajo 3 veces con medio volumen de éter etílico. Al final la muestra se evaporó a temperatura ambiente.

### 5.2.3 Purificación del T(SH)<sub>2</sub>

Para purificar el T(SH)<sub>2</sub> sintetizado se utilizó una resina de intercambio catiónico fuerte SP-Sepharose (high performance) marca GE. La resina se equilibró con agua desionizada, se le agregó la reacción de síntesis de T(SH)<sub>2</sub> descrita en el párrafo anterior. La purificación se monitoreó haciendo reaccionar 100 µL del eluido con 100 µL de una solución 0.1 mM de ácido 5-5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) preparada en buffer 100 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 8.0 (reactivo de Ellman). En un inicio la reacción es incolora, al tornarse amarilla es indicativo de que se eluyeron algunos componentes con tioles libres (GSH y DTT). La elución de estos componentes se lleva a cabo con agua hasta la desaparición del color amarillo en el eluato. El T(SH)<sub>2</sub> que se pegó a la resina se eluyó con una solución 0.1 M de acetato de amonio. Su completa elución se monitorea de la misma manera. La solución de T(SH)<sub>2</sub> purificado se liofilizó hasta sequedad en un liofilizador marca Labocon.

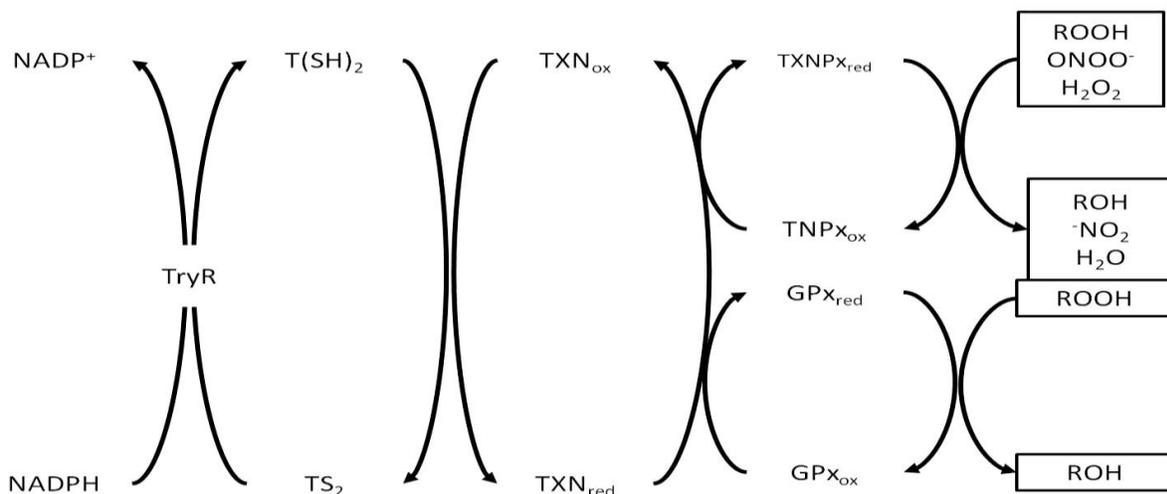
### 5.2.4 Determinación de la pureza del T(SH)<sub>2</sub>

Una muestra de T(SH)<sub>2</sub> purificado se resuspendió en 40 mM buffer HEPES, 20 mM DTT pH 7.4 y se redujo adicionando un exceso de NaBH<sub>4</sub> e incubando durante 10 min en hielo. Posteriormente se precipitó el NaBH<sub>4</sub> adicionando HClO<sub>4</sub> a una concentración final de 3%, se centrifugó a 20817 x g durante 2 min a 4 °C y posteriormente se filtró con un filtro de 22 µm. La separación de las moléculas se llevó a cabo por cromatografía de líquidos de alta resolución en un HPLC marca WATERS,

utilizando una columna Altima HP C18 3  $\mu\text{m}$  de 150 X 4.6 mm. Primeramente la columna se equilibró durante 10 min utilizando un flujo total de 0.5 mL/min, del cual el 90 % es una solución 0.1 % de ácido trifluoroacético (TFA), el 10 % del flujo corresponde a 100% de acetonitrilo. Posteriormente se inyectan 20  $\mu\text{L}$  de la muestra de  $\text{T(SH)}_2$  purificado, reducido y filtrado. La fase móvil se continuó de la manera antes descrita. Posteriormente el porcentaje del flujo se varió de manera gradual hasta alcanzar porcentajes de 20% de acentonitrilo - 80 % de TFA (0.1 %) al término de los siguientes 10 min. Las moléculas con grupos tioles libres (GSH, DTT,  $\text{T(SH)}_2$ ) se detectaron por derivatización post-columna con DTNB preparado como se describió en párrafos anteriores en un espectrofotómetro marca Waters a 412 nm.

### 5.3 Determinación de actividad específica de las enzimas recombinantes

Para determinar las actividades de TryR, TXNPx, TXN y GPx, se utilizó un ensayo reconstituido como se describe en la Fig. 8. Se monitoreó a 340 nm la oxidación del NADPH en un espectrofotómetro utilizando como medio de reacción 0.5 ml de buffer 40 mM Hepes, 1 mM EDTA, pH 7.4 y temperatura de 37°C. Los ensayos se realizaron en condiciones de velocidad inicial (5 min máximo) manteniendo limitante la enzima a medir y asegurándose que la actividad fuera lineal con respecto a la cantidad de enzima utilizada.



**Figura 8. Vía de reducción de hidroperóxidos dependiente de TXN en tripanosomátidos.** Los electrones fluyen del NADPH hacia el hidropéroxido a través de una serie de enzimas. La reconstitución *in vitro* para determinar actividades o flujos involucra únicamente una de las peroxidasas (según se indique), sin embargo se incluyen las dos para fines ilustrativos.

Las concentraciones de los demás componentes de las reacciones se enlistan en la Tabla 5; se utilizaron concentraciones saturantes de todos los sustratos y concentraciones no limitantes de las enzimas acoplantes. En el caso de la TXNPx la reacción se suplementó con 10% DMSO como agente estabilizante de la proteína.

**Tabla 5 Condiciones de los ensayos enzimáticos para medir la  $V_m$  de las enzimas recombinantes.**

	TryR	TXN	GPx	TXNPx
NADPH	160 $\mu$ M			
T(SH) <sub>2</sub>	250 $\mu$ M (TS <sub>2</sub> )	900 $\mu$ M		
TryR	0.01 – 0.1 $\mu$ g	30 U/mL		
TXN		0.2 – 0.5 $\mu$ g	35 U/mL	35 U/mL
GPx		-	0.5 – 1.0 $\mu$ g	-
TXNPx		30 U/mL	-	0.1 – 0.5 $\mu$ g
CumOOH		100 $\mu$ M	1000 $\mu$ M	100 $\mu$ M

#### 5.4 Constantes de afinidad de TXNPx y GPxA por otros hidroperóxidos

Se completó la caracterización cinética de la TXNPx y GPxA por otros sustratos que no se evaluaron en la tesis de licenciatura (González-Chávez 2011) utilizando las condiciones descritas en la sección 5.3 para medir la actividad específica pero variando los sustratos como se describe a continuación.

Se varió la concentración de un sustrato y se saturó el resto de los reactantes. Antes de iniciar la reacción con la enzima, se incubaron el resto de los componentes de la reacción con el hidroperóxido durante 30 – 60 s, con el fin de cuantificar la reacción inespecífica entre el hidroperóxido y el T(SH)<sub>2</sub> y esta basal se restó de la velocidad después de agregar la enzima de interés.

##### 5.4.1 Curva de saturación de GPxA por t-butOOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La mezcla de reacción contenía 160  $\mu$ M NADPH, 30 U/mL TryR, 450  $\mu$ M T(SH)<sub>2</sub>, 35 U/mL TXN, se monitoreó la reacción inespecífica adicionando 0 – 1 mM de t-butOOH

ó  $H_2O_2$ . y la reacción se inició adicionando 0.5 – 1.0 ó 1.5 – 2.5  $\mu g$  de GPx, respectivamente.

#### **5.4.2 Curva de saturación de TXNPx por $H_2O_2$**

La mezcla de reacción contenía 160  $\mu M$  NADPH, 30 U/mL TryR, 450  $\mu M$  T(SH)<sub>2</sub>, 35 U/mL TXN, se monitoreó la reacción inespecífica adicionando 0 – 50  $\mu M$  de  $H_2O_2$  y la reacción se inició adicionando 0.7 – 1.0  $\mu g$  de TXNPx.

#### **5.5 Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi***

Los epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Querétaro se cultivaron en un frasco de vidrio conteniendo medio LIT (0.5 % NaCl, 0.75 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 % triptosa, 0.3 % infusión de hígado, 0.3 % extracto de levadura, 0.04 % KCl, pH 7.2), suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 25  $\mu g/mL$  de hemina. Los epimastigotes se sembraron a una concentración inicial de 4 – 5 X 10<sup>6</sup> parásitos / mL en 2 mL de medio de cultivo, y se incubaron a 26 °C durante 4 días; después de este tiempo se duplica el volumen del cultivo añadiendo medio LIT suplementado.

#### **5.6 Obtención del extracto citosólico de epimastigotes de *T. cruzi***

Los epimastigotes provenientes de un cultivo de tres días se cosecharon centrifugándolos a 2547 x g en tubos de 50 mL. Los parásitos se resuspendieron en 10 mL de buffer PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), se transfirieron a un tubo y se centrifugaron nuevamente; este proceso se realizó dos veces con el fin de lavar los residuos de medio LIT que las células pudieran tener. Las células se resuspendieron en suficiente buffer de lisis (20 mM Hepes, 1 mM EDTA, 0.15 mM KCl, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) para que la proteína citosólica quedara a una concentración cercana a 20 mg/mL sabiendo que 10<sup>8</sup> células tienen 0.25 mg aproximadamente. Las células se lisaron tres veces por congelación a – 70 °C y descongelación a 37 °C y el producto se centrifugó a 20817 x g para separar las proteínas citosólicas de las insolubles. Esta fracción se utilizó inmediatamente para determinar las actividades enzimáticas en parásitos.

## 5.7 Determinación de actividades enzimáticas en extractos

### 5.7.1 Actividad de TXN y TXNPx en extractos de epimastigotes

Para determinar la actividad de TXN y TXNPx en extractos clarificados, los ensayos se realizaron en las mismas condiciones que se utilizaron para la caracterización cinética de las enzimas recombinantes utilizando el sistema reconstituido similar al de la Figura 8 y el medio de reacción enlistado en la Tabla 6.

**Tabla 6. Componentes del ensayo para medir la  $V_m$  de la TXN y TXNPx en extractos clarificados del parásito**

	TXN	TXNPx
NADPH	160 $\mu$ M	
T(SH) <sub>2</sub>	900 $\mu$ M	
TryR	30 U/mL	
Extracto citosólico	0.1 mg	0.2 mg
TXN	-	35 U/mL
TXNPx	30 U/mL	-
CumOOH	100 $\mu$ M	

La reacción se inició con la adición del hidroperóxido ya que era necesario cuantificar la reacción inespecífica que existe entre el extracto y el resto de los componentes del sistema. La pendiente de la basal se resta a la pendiente de la actividad de las enzimas para obtener la actividad específica.

### 5.7.2 Actividad de GPxA en extracto de epimastigotes

Para determinar la actividad de la GPx en extractos de epimastigotes se utilizó el mismo buffer, volumen de reacción, pH y temperatura anteriores pero la reacción se acopló al sistema GSH/GR. La mezcla contenía 160  $\mu$ M NADPH, 35 U GR, 10 mM GSH, 0.1 mM CumOOH. Se monitoreó la reacción inespecífica entre los componentes y se inició la reacción adicionando 0.2 mg de extracto clarificado.

## **5.8 Determinación de los coeficientes de control de flujo por reconstitución *in vitro* de la vía metabólica**

Se determinó el flujo de reducción de CumOOH ó  $H_2O_2$  en el sistema reconstituido *in vitro* de la Fig. 8 y en las mismas condiciones de buffer, pH y temperatura para la medición de la  $V_m$  de las enzimas.

Para determinar el coeficiente de control de flujo, el sistema de la Fig. 8 se debe reconstituir con las proporciones de enzimas que se encuentran en los extractos citosólicos. A partir de las actividades enzimáticas determinadas en extractos citosólicos del parásito, se determinó que la proporción 3 TryR: 1 TXN: 2 TXNPx o, 3 TryR: 1 TXN: 0.08 GPx era la fisiológica. Tomando como inicio esta proporción fisiológica se tituló cada una de las enzimas por separado, por arriba y por debajo de su proporción basal de tal manera que el resto del sistema se mantenía constante. Los componentes de las titulaciones se muestran en la Tabla 7. El flujo de la vía se iniciaba con la adición de la enzima de interés.

**Tabla 7 Condiciones experimentales para determinar los coeficientes de control de flujo**

	Coeficiente de control de flujo a determinar				
	$C^J_{TryR}$	$C^J_{TXN}$	$C^J_{TXNPx}$	$C^J_{GPx}$	$C^J_{ROOHSynt}$
<b>NADPH (mM)</b>	0.16				
<b>T(SH)<sub>2</sub> (mM)</b>	0.45				
<b>TryR (mU)</b>	0 - 944	264	264	264	264
<b>TXN (mU)</b>	88	0 - 352	88	88	88
<b>TXNPx (mU)</b>	176	176	0 - 704	-	176
<b>GPx (mU)</b>	-	-	-	0-245	7
<b>CumOOH (mM)</b>	0.1	0.1	0.1	0.1	-
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mM)</b>					0 – 1

ROOH<sub>Synt</sub>: Sistema generador de hidroperóxidos.

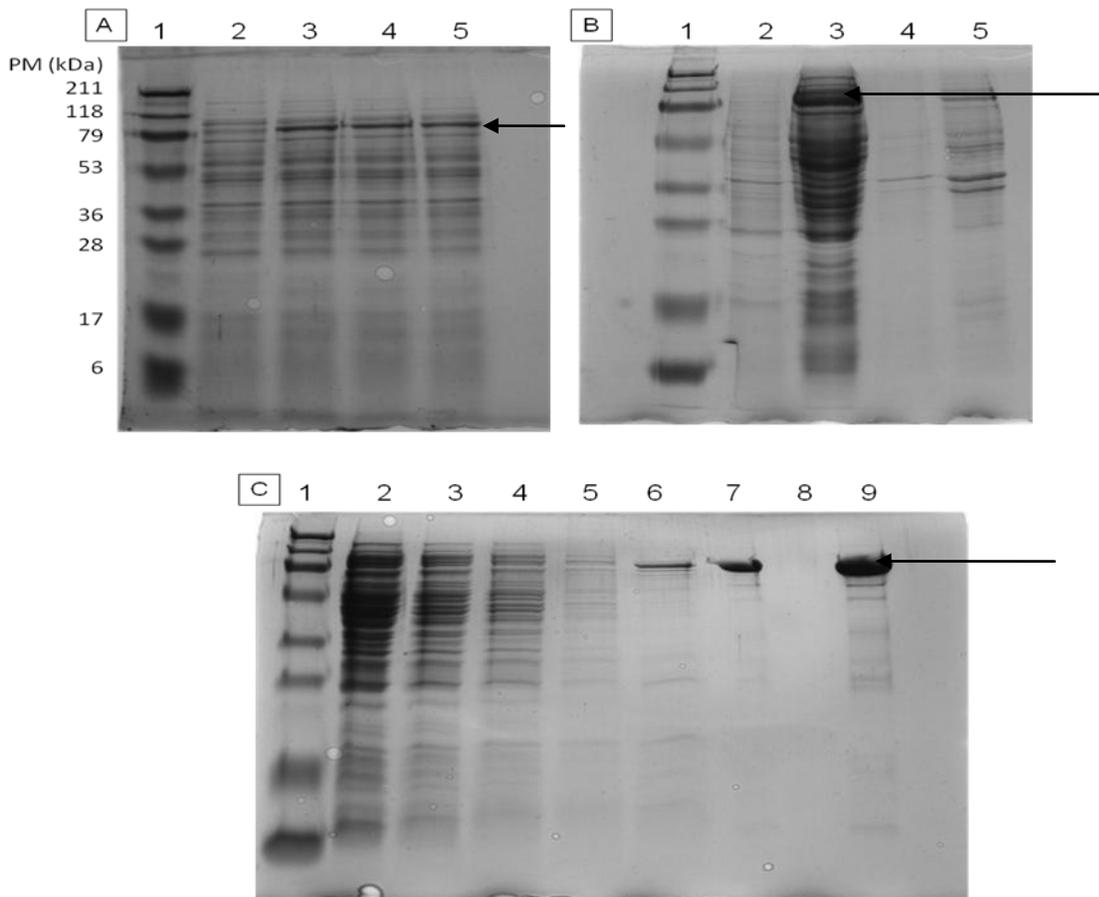
Se determina el flujo de la vía a partir de la oxidación del NADPH, y se grafica este valor con respecto a la actividad enzimática, ambos en su forma normalizada. El coeficiente de control de flujo de la enzima que se está titulando se calcula del valor de la derivada en el 100% de actividad el cual correspondería al coeficiente de control de flujo de la enzima *in vivo*.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Síntesis *in vitro* y purificación de T(SH)<sub>2</sub>

#### 6.1.1 Sobreexpresión y purificación de CfTrySC59A

En la Fig. 9, panel A se puede observar que la CfTryS (la cual migra con un peso molecular de 82 kDa) se sobreexpresa de manera abundante en las bacterias, además de que se encuentra preferencialmente en el sobrenadante (Fig. 9B). La proteína purificada tiene un grado de pureza mayor al 90 % (Fig. 9C)



#### Figura 9. Purificación de la CfTrySC59A.

Geles SDS-PAGE al 12.5 %. Panel A carril: 1 marcador de peso molecular; 2 lisado de células sin inducir; 3, 4 y 5 muestran distintos clones sobreexpresantes de CfTrySC59A. Panel B carril: 1 marcador de peso molecular; 2 y 3 sobrenadante de células antes y después de la inducción respectivamente; 4 y 5 precipitado de células antes y después de la inducción respectivamente. Panel C carril: 1 marcador de peso molecular; 2 lisado de células sobreexpresantes; 3 sobrenadante de lisado celular; 4 eluato que no se pegó a la columna; 5 – 8 lavados con distintas concentraciones de imidazol; 9 enzima purificada.

### 6.1.2 Determinación de la actividad de CfTrySC59A y síntesis *in vitro* de T(SH)<sub>2</sub>

Las condiciones en las que se mide la actividad de CfTrySC59A y en las que se sintetiza el T(SH)<sub>2</sub> corresponden a un protocolo modificado del reportado por Comini *et al.* (2009) y se muestran en la Tabla 8.

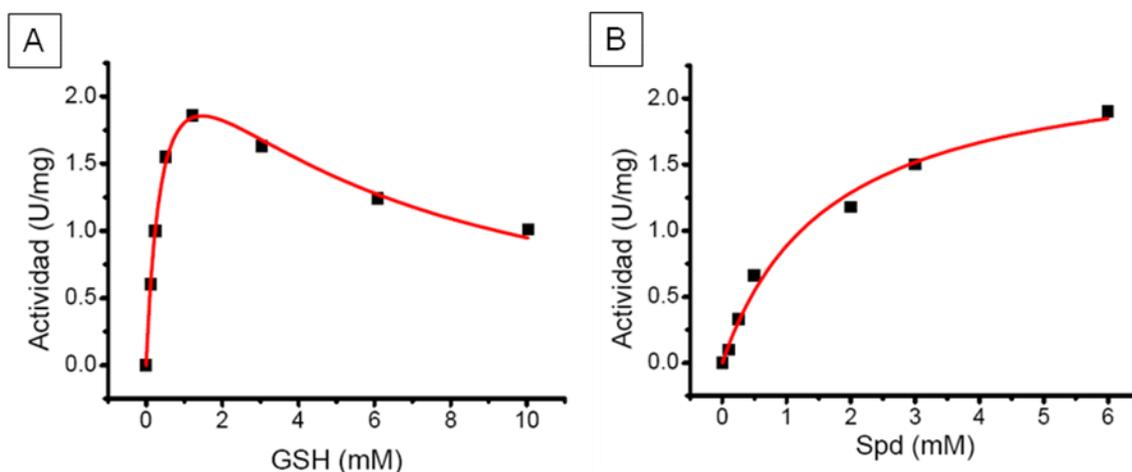
**Tabla 8. Condiciones para medir la actividad de CfTrySC59A y para sintetizar *in vitro* el T(SH)<sub>2</sub>.**

Sustrato	Concentración para medir la actividad (mM)	Concentración para reacción de síntesis de T(SH) <sub>2</sub> (mM)*
NADH	0.16	-
GSH	1	11
ATP	2	1
PEP	1	10
Spd	10	5
DTT	10	20
PK	1.4 U/mL	2 U/mL
LDH	2.2 U/mL	-
CfTrySC59A	20-60 µg	0.75 U/mL

La actividad se determina en 0.5 mL de buffer de reacción \*Modificado de Comini *et al.*, 2009

Se describió que la enzima silvestre de CfTryS tiene una *K<sub>m</sub>* por GSH de 1.1 mM (Henderson *et al.* 1990) por lo que no se explicaba por qué en el ensayo para medir la actividad se utilizaban concentraciones subsaturantes de GSH (Comini *et al.*, 2009).

Para tratar de optimizar el protocolo de síntesis de T(SH)<sub>2</sub> se realizaron curvas de saturación de la enzima hacia GSH y Spd (Fig 10). Se puede observar que el valor de *K<sub>m</sub>* determinado (0.9 mM) es muy cercano al reportado pero que a concentraciones mayores de 1 mM la enzima se inhibe con un valor de *K<sub>i</sub>* de 3.8 mM (n=2) (Fig. 10A) por lo que la actividad de esta enzima se mide a concentraciones subsaturantes de GSH. Variando el sustrato Spd (Fig. 10B), se obtiene un valor de *K<sub>m</sub>*= 1.7 mM que es similar al reportado por Henderson *et al.* (1990).

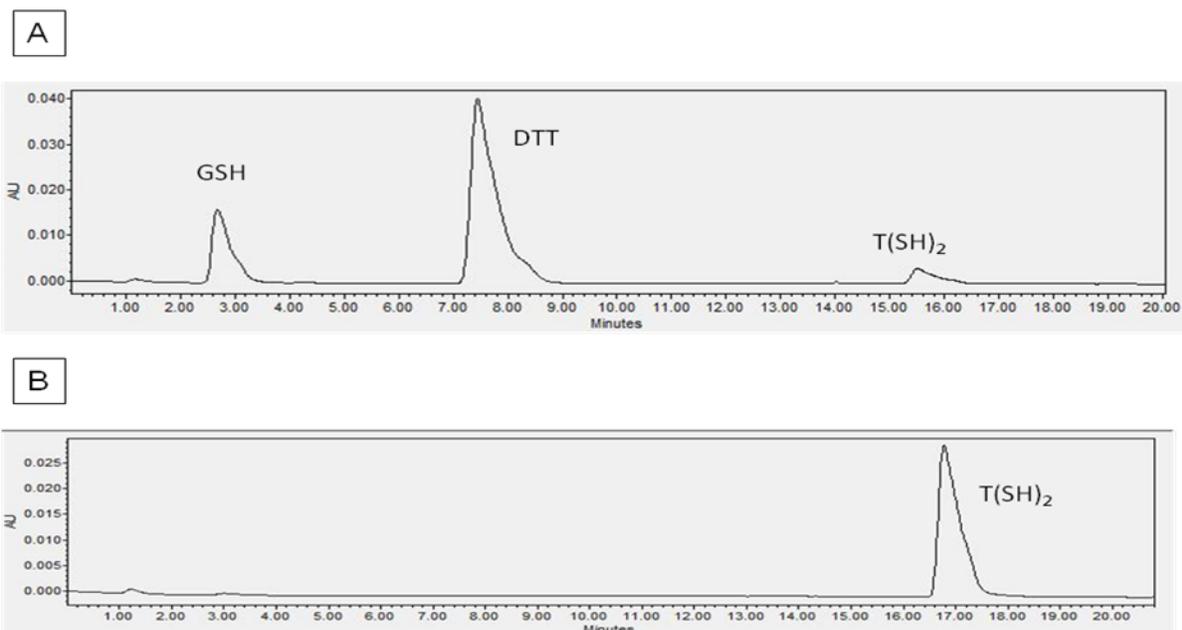


**Figura 10. Curvas de saturación de CfTrySC59A.**

Panel A, curva de saturación por GSH donde se puede observar la inhibición por sustrato. Panel B curva de saturación por Spd.

Por otro lado, la concentración de GSH en la reacción de síntesis de  $T(SH)_2$  es de 11 mM la cual es una concentración inhibitoria y la CfTrySC59A tendrá una actividad mucho menor; sin embargo, el tiempo de incubación de la reacción es suficiente para que la enzima logre transformar esa cantidad de GSH. Además, al tener 11 mM de GSH se asegura que la reacción no esté limitada por este sustrato sino por la Spd la cual se encuentra en condiciones estequiométricas para sintetizar el  $T(SH)_2$ . Por otro lado, la concentración de ATP en la reacción de síntesis es baja para evitar el efecto inhibitorio que pudiera tener el ADP sobre la enzima, pero se utiliza a la PyK y el PEP para mantener la concentración de ATP constante

El  $T(SH)_2$  se sintetizó en volúmenes de reacción necesarios para mantener una concentración de 0.75 U/mL de CfTrySC59A. El  $T(SH)_2$  se purificó por cromatografía de intercambio catiónico fuerte utilizando una resina SP Sepharose High performance y 0.1 mM de acetato de amonio como eluyente. El metabolito purificado se concentró por liofilización. En la Fig. 11 panel A se muestra el cromatograma de la reacción de síntesis, en el cual se identifican los picos de GSH, DTT y  $T(SH)_2$  y se compara con el panel B, donde se observa un cromatograma del  $T(SH)_2$  purificado. La pureza del  $T(SH)_2$  es mayor al 99%.



**Figura 11. Cromatogramas de moléculas con grupos tiol.**

Panel A cromatograma donde se muestran los distintos tiempos de retención para cada molécula.

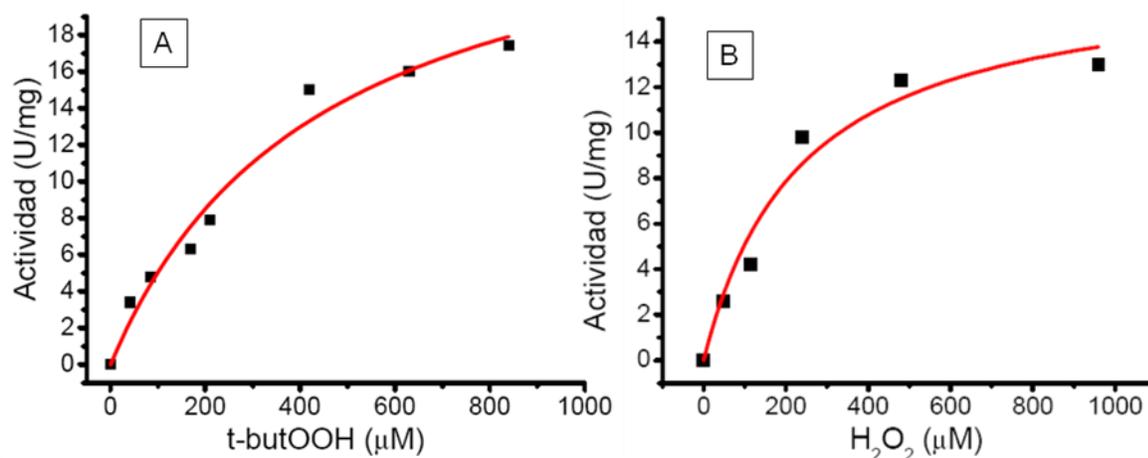
Panel B cromatograma del T(SH)<sub>2</sub> purificado.

Teniendo la posibilidad de sintetizar el T(SH)<sub>2</sub> en cantidades ilimitadas, se procedió a terminar la caracterización de las peroxidasas y a reconstituir *in vitro* el sistema desintoxicante de peróxidos de *T. cruzi* para poder determinar los coeficientes de control de flujo de sus enzimas.

## 6.2 Caracterización cinética de las enzimas recombinantes GPxA y TXNPx

### 6.2.1 Curva de saturación de GPxA por t-butOOH

Recientemente se reportó que la GPxA tiene una baja afinidad por el CumOOH ( $K_m=107 \mu\text{M}$ ) (González-Chávez, 2011), por lo que se evaluó al t-butOOH como sustrato. La figura 12 panel A muestra una curva de saturación representativa de 2 experimentos, cuyos datos se ajustan a la ecuación de Michaelis-Menten.



**Figura 12. Curvas de saturación de GPxA por t-butOOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Panel A curva de saturación por t-butOOH representativa de 2 determinaciones. Panel B curva de saturación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> representativa de 2 determinaciones. Los datos experimentales se ajustan a una cinética de tipo Michaelis-Menten.

Los resultados obtenidos en esta caracterización se resumen en la Tabla 9, y se comparan con los valores reportados por Wilkinson *et al.* (2000) y Patel *et al.* (2010).

**Tabla 9. Caracterización cinética de GPxA y TXNPx con distintos hidroperóxidos.**

	<i>K<sub>m</sub></i> (μM)	<i>V<sub>m</sub></i> (U/mg)	<i>k<sub>cat</sub></i> (s <sup>-1</sup> )	<i>k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub></i> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Referencias
GPX <sub>t-butOOH</sub>	452 (2)	19 (2)	6.3	1.4 X 10 <sup>4</sup>	
	5.64	0.034			A
	51	1.3	0.39	7.6 X 10 <sup>3</sup>	B
GPX <sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub>	313 (2)	29 (2)	9.7	2.9 X 10 <sup>4</sup>	
	ND				A
TXNPx <sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub>	1.5 (1)	6.3 (1)	25	1.7 X 10 <sup>7</sup>	

(A) Wilkinson *et al.* (2000). (B) Patel *et al.* (2010). ND actividad no detectada

La diferencia de un orden de magnitud con respecto a los valores reportados por Patel *et al.* (2010) podría deberse a las condiciones del ensayo ya que ese grupo los realizó a 30 °C y pH de 8.0. También se obtuvieron diferencias sustanciales cuando la enzima la caractericé con CumOOH y los datos se compararon con el grupo de Wilkinson *et al.* (2002) (Tabla 3 de la introducción) por lo que es probable que las diferencias obtenidas en la afinidad por los distintos hidroperóxidos se deban a las

condiciones de ensayo y no a las propiedades de las enzimas. Sin embargo, la caracterización realizada recientemente se llevó a cabo en condiciones saturantes de todos los componentes del sistema y limitando la enzima a medir, mientras que el resto de los grupos lo hicieron en condiciones no saturantes de al menos uno de los componentes del sistema.

### 6.2.2 Curva de saturación de GPxA por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

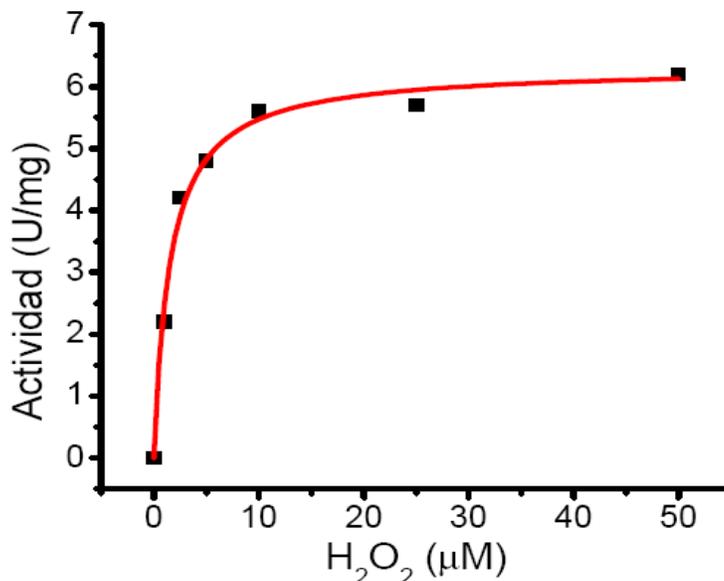
Según lo reportado por Wilkinson *et al.* (2000) la GPxA es incapaz de reducir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lo cual se ha citado en varios artículos (Krauth-Siegel *et al.* 2007; Irigoín *et al.* 2008). Sin embargo, ensayos preliminares de esta tesis indicaron que la GPxA es capaz de reducirlo. Por lo tanto se decidió realizar la caracterización de la enzima utilizando este sustrato. La figura 12B muestra la curva de saturación de la GPxA por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La enzima tiene una cinética tipo Michaelis-Menten y las constantes cinéticas se resumen en la Tabla 9. Una de las posibles razones por las que en dicho reporte no observaron actividad de GPx con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sea que para su caracterización utilizaron como sistema acoplante al GSH/GR; por un lado el GSH al parecer no es el sustrato fisiológico de la GPxA debido a su baja afinidad ( $K_m=5.8 - 7.8$  mM) de acuerdo a lo que ellos mismos reportaron (Wilkinson *et al.*, 2000). Otra razón podría ser una baja concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el ensayo. En Wilkinson *et al.* (2000) no se reporta la concentración utilizada, pero debido a la baja afinidad de esta enzima por dicho sustrato obtenida en esta tesis ( $K_m = 313$   $\mu$ M; Tabla 9), es probable que la concentración que ellos utilizaron no haya sido suficiente para la enzima.

Debido a que el GSH no es un agente reductor eficiente de las peroxidasas de tripanosomátidos, esto puede tener implicaciones fisiológicas importantes, ya que no sería conveniente para la célula oxidar al GSH sin tener una enzima que lo reduzca rápidamente. Por otro lado, al usar GSH como agente reductor la actividad de la GPxA parece verse afectada. Budde *et al.* (2003) reportaron que la TXNPx de *T. brucei brucei* disminuye su actividad específica hasta en un 80% al reemplazar el sistema TryR/T(SH)<sub>2</sub>/TXN por el sistema TrxR/Trx, o hasta en un 100% al reemplazarlo por el sistema GR/GSH. Por otro lado, Diechtierow y Krauth-Siegel (2011) determinaron la  $k_1$  para la reacción de las peroxidasas *TbGPx* y *TbTXNPx* utilizando como sustratos

distintos hidroperóxidos tanto de cadena larga como de cadena corta; observaron que la *TbGPxA* reduce a los peróxidos de ácidos grasos de cadena larga con mayor eficiencia que la *TbTXNPx*, mientras que el  $H_2O_2$  y otros hidroperóxidos de cadena corta son reducidos con mayor eficiencia por la *TbTXNPx*.

### 6.2.3 Curva de saturación de TXNPx por $H_2O_2$ .

La figura 13 muestra una curva de saturación de TXNPx por  $H_2O_2$ . Debido a que la  $K_m$  de esta enzima tiene un valor muy bajo (Tabla 9) fue difícil monitorear la actividad de la enzima a concentraciones bajas de sustrato, por lo que únicamente se logró realizar una determinación. Es importante notar que con este sustrato la enzima no presentó inactivación lo cual concuerda con lo reportado por Diechtierow y Krauth-Siegel (2011); pero no con lo reportado por Flohé *et al.* (2002).



**Figura 13. Curva de saturación de TXNPx por  $H_2O_2$ .** Los datos se ajustan a una curva de tipo Michaelis-Menten

La caracterización de TXNPx y GPxA con  $H_2O_2$  se realizó con el objetivo de utilizar este sustrato en los ensayos de reconstitución por ser un sustrato fisiológico (a diferencia del t-butOOH y el CumOOH). Sin embargo, el valor de  $K_m$  fue tan pequeño para la TXNPx que impidió determinar flujos de reducción del  $H_2O_2$  utilizando concentraciones tan bajas de este sustrato. Por otro lado, el uso de  $H_2O_2$  en los

ensayos de reconstitución donde se usó a la GPxA implicaba usar altas concentraciones de sustrato por su baja afinidad ( $K_m=313 \mu\text{M}$ ), el cual reaccionaba inmediatamente con el  $\text{T(SH)}_2$  de manera no enzimática, por lo que no se logró usarlo para reconstituir la vía y determinar los coeficientes de control de flujo de las enzimas.

#### 6.2.4 Estabilización de la TXNPx con DMSO

Anteriormente se realizó la caracterización de la TXNPx utilizando CumOOH y t-butOOH como sustratos. Durante dicha caracterización se observó que esta enzima presentaba inactivación por dilución debido a que la enzima es un decámero en su forma activa (Alphey *et al.* 2000); al diluir la enzima se pierde la estructura decamérica, y el dímero resultante es inactivo. Para evitar este problema, en dicha caracterización se usó una alta concentración de TXNPx pero algunos componentes del sistema acoplante ( $\text{T(SH)}_2$ , TXN, TryR) se tuvieron que adicionar en condiciones no saturantes para poder medir una velocidad inicial; esto trajo como consecuencia que la *kcat* de esta enzima estuviera subestimada.

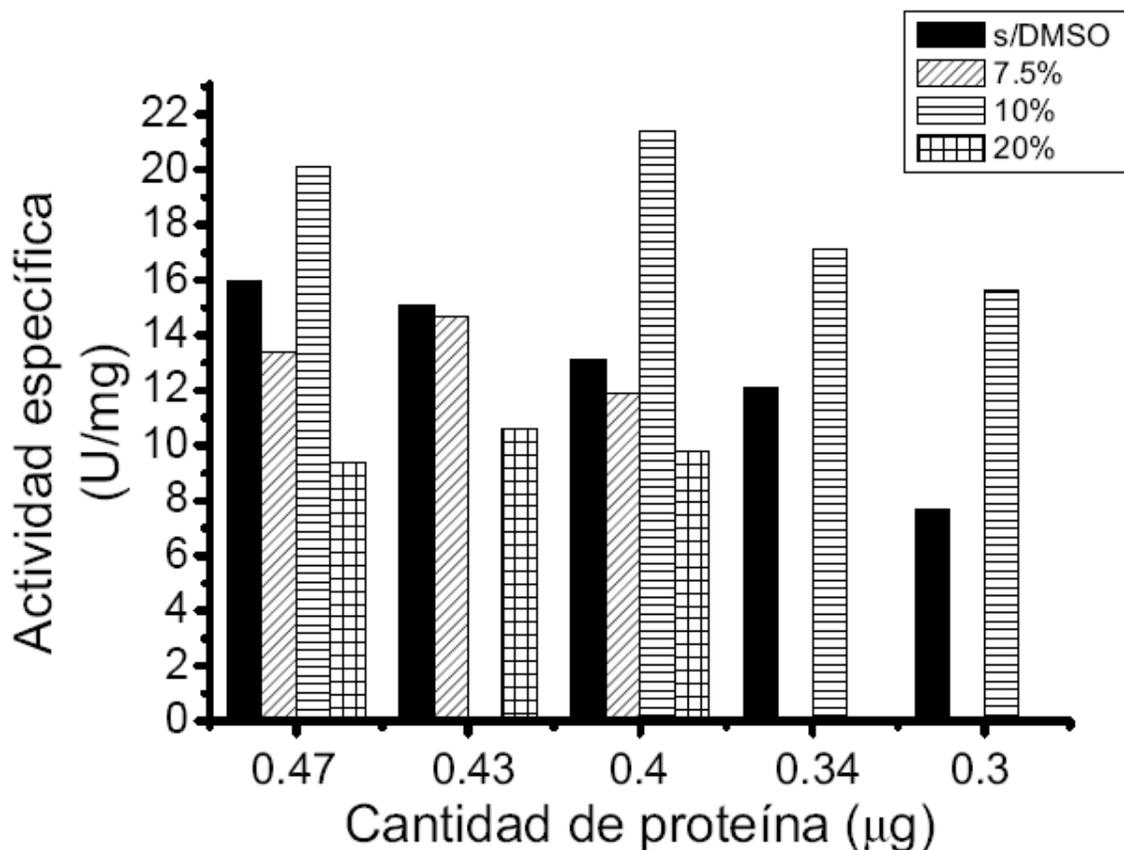
Durante la realización de esta tesis se planteó el objetivo de buscar las condiciones apropiadas para poder medir la *kcat* de la TXNPx en condiciones de *V<sub>m</sub>*, es decir, en condiciones saturantes del sistema acoplante, para lo cual se requirió buscar distintos métodos para estabilizar la proteína:

- 1) Se adicionó 10% de glicerol al buffer de ensayo con el fin de aumentar la viscosidad de la reacción y de esta manera estabilizar la proteína,
- 2) Se aumentó la fuerza iónica con KCl a una concentración 100 mM pensando que la interacción entre dímeros se favorecería.
- 3) Se adicionaron distintas concentraciones de BSA a la reacción (hasta 500  $\mu\text{g/mL}$ ), considerando que su estabilización podría favorecerse a altas concentraciones de proteínas

Todas las condiciones anteriores no promovieron una mayor estabilidad de la enzima a la dilución.

Por último se determinó la actividad de la TXNPx utilizando distintas concentraciones de enzima (0.6 - 1.0  $\mu\text{g/mL}$ ) y distintas concentraciones de dimetilsulfóxido (DMSO; 7.5, 10 y 20%), suponiendo que la interacción dímero-dímero

se vería favorecida bajo condiciones hidrofóbicas. El sistema acoplante se adicionó en condiciones saturantes (160  $\mu\text{M}$  NADPH, 30 U/mL TryR, 450  $\mu\text{M}$  T(SH)<sub>2</sub>, 35 U/mL TXN y 100  $\mu\text{M}$  CumOOH). Los resultados se muestran en la figura 14, donde se observa que la actividad específica disminuye al diluir la enzima en un ensayo en ausencia y presencia de 7.5 % de DMSO, además de que es muy difícil determinar su actividad bajo estas condiciones. Al utilizar 10 % de DMSO se obtiene la mayor actividad específica, además de que la actividad es lineal con respecto a la cantidad de proteína. Al adicionar 20 % de DMSO a la reacción se observa que la actividad específica es aún menor que en la condición sin DMSO, por lo que se decidió que la concentración más adecuada de DMSO es el 10 %, mientras que la proteína no puede diluirse por debajo de 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Figura 14. Efecto estabilizador del DMSO sobre la actividad de TXNPx.**

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 500  $\mu\text{L}$ . La actividad específica es lineal a concentraciones mayores a 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### 6.3 Determinación de actividades de enzimas en extractos de parásitos.

Para poder reconstituir la vía metabólica en condiciones cercanas a las fisiológicas se debía determinar la proporción fisiológica de la actividad de cada una de las enzimas en los parásitos. A partir de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Querétaro se preparó el extracto citosólico y se determinó la actividad a pH 7.4 y 37 °C de la TXN y TXNPx en el ensayo del esquema de la figura 8. Se tuvo cuidado de determinar la actividad en condiciones de  $V_m$ . Los resultados de las determinaciones se resumen en la Tabla 10 y el detalle de los resultados se describe en las siguientes secciones.

**Tabla 10. Actividad de enzimas antioxidantes en extractos de *T. cruzi*.**

Enzima	$V_m$ (mU/mg)	Proporción fisiológica	[Sustrato reductor] ( $\mu$ M)	[Sustrato oxidante] ( $\mu$ M)	$V_m/K_m$ (mL/min·mg)
TryR*	264 $\pm$ 87	3	160 - NADPH	230 - TS <sub>2</sub>	11 - TS <sub>2</sub> 29 NADPH
TXN	88 $\pm$ 14	1	450 - T(SH) <sub>2</sub>	10 - TXNPx	0.9
TXNPx	177 $\pm$ 9	2	10 - TXN	100 - CumOOH ó t-butOOH	295 – TXN 18 – ROOH
GPx	7	0.08	10 mM - GSH	100 - CumOOH	3 – TXN 0.07 – ROOH

\* Datos reportados por Olin-Sandoval *et al.* (2012), determinada bajo las mismas condiciones.

#### 6.3.1 Actividad de TXN en el extracto

Para determinar la actividad de la TXN en el extracto se utilizaron sus sustratos fisiológicos T(SH)<sub>2</sub> y la TXNPx. Sin embargo, cuando se intentó determinar su actividad con GPx se observó que la reacción precipitaba al tener juntos el extracto y la GPx. No se pudo determinar las causas de esta precipitación por lo que la actividad de la TXN en el extracto solamente se determinó con TXNPx.

En la Fig.15 se muestra la marcha de purificación de la TXN en extractos de parásitos reportada por Wilkinson *et al.* (2002).

TABLE I  
*Yields and purification of trypanredoxin*  
 TeTPNI was purified from *T. cruzi* epimastigotes as described under "Experimental Procedures."

	Volume	Total activity	Protein	Specific activity	Yield	Purification
	(ml)	(nmol NADPH oxidized min <sup>-1</sup> )	(mg)	(nmol NADPH oxidized min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	(%)	(fold)
Crude extract	5.00	1630	65.3	25.0	100	1
DEAE-Sepharose	6.00	1559	9.0	173.2	96	6.9
2', 5'-ADP-Sepharose	2.00	743	4.0	185.6	46	7
Mono Q	1.08	481	0.7	686.8	30	27.5

**Figura 15. Marcha de purificación de TXN.** A partir de extractos de parásitos se determinó la actividad en los distintos pasos de la purificación, teniendo un rendimiento final del 30 % de TXN pura. Tomado de Wilkinson *et al.* (2002)

En esta tabla el análisis que se realizó fue el siguiente:

- 1) Considerando que al final de la purificación se tienen 0.7 mg de TXN purificada y que el rendimiento de la purificación fue del 30 % (tomando en cuenta los valores de actividad total) entonces el 100 % de TXN presente en el extracto correspondería a 2.3 mg.
- 2) Tomando en cuenta que la proteína total extraída de los parásitos fueron 65.3 mg, entonces los 2.3 mg de TXN corresponden al 3.5 % de la proteína total.
- 3) Por otro lado, considerando la ecuación 1, a partir de la  $V_m$  y la  $k_{cat}$  de la enzima recombinante se puede obtener la concentración de enzima en nmol de TXN/mg de proteína total; posteriormente con el peso molecular de la enzima, podremos obtener los ng de TXN por mg de proteína total, y con esto la concentración porcentual. Sin embargo cabe mencionar que estos datos dependerán del valor de  $k_{cat}$  obtenido, el cual se debe determinar bajo condiciones saturantes lo cual no se cumplió en el artículo de la Fig. 15.

La tabla 11 muestra una comparación del cálculo de la concentración de enzima total, a partir de los datos reportados (Wilkinson *et al.* 2002) y los datos determinados durante la licenciatura y en este trabajo.

**Tabla 11. Análisis del contenido de TXN en *T. cruzi***

	$V_m$ (nmol/min·mg)	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	Et (nmol/mg)	PM (Da)	Et (ng/mg)	%	Conc. ( $\mu\text{M}$ )
Reportado	25	18.7	1.34	16000	21.4	2.14	222
		1560	0.016		0.256	0.03	2.7*
Obtenido	88				0.9	0.09	9.4

\*La fila del centro corresponde al análisis de concentración utilizando la  $V_m$  reportada por Wilkinson *et al.* (2002) y la  $k_{cat}$  determinada en este trabajo.

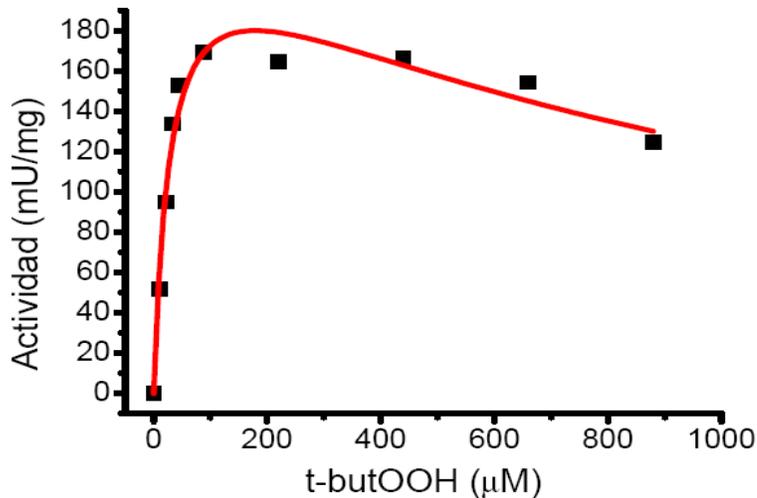
Este análisis demuestra que la  $k_{cat}$  determinada por Wilkinson *et al.* (2002) está subestimada porque el ensayo no se determinó en condiciones de  $V_m$ , además la diferencia podría deberse al cambio de condiciones (pH 8.0, 30 °C vs. pH 7.4, 37 °C). La concentración de TXN implica una condición saturante para la TXNPx ( $K_m=0.6 \mu\text{M}$ ), pero no para la GPx ( $K_m=2.3 \mu\text{M}$ ), sin embargo no es limitante para ninguna de las dos peroxidasas.

### 6.3.2 Actividad de peroxidasas en el extracto

Para determinar la  $V_m$  de estas enzimas se utilizaron condiciones saturantes de TryR, TXN, T(SH)<sub>2</sub> y NADPH. En cuanto al uso del ROOH, se debe tener en cuenta que debido a que no se conoce con exactitud la concentración a la cual se da el cambio entre la saturación y la inactivación de la TXNPx (cerca a 100  $\mu\text{M}$ , González-Chávez, 2011) se decidió determinar la  $V_m$  realizando curvas de actividad de peroxidasas en el extracto vs [CumOOH o t-butOOH] a concentraciones de 0 – 1.1 mM. Con esta estrategia se esperaba obtener un máximo cerca de 100  $\mu\text{M}$  el cual correspondería al máximo de actividad obtenido para la TXNPx recombinante (ver valores de  $K_m$  en tabla 2). El resto de la curva de saturación no era predecible en virtud de que la  $K_m$  de GPxA por CumOOH y t-butOOH son de 107  $\mu\text{M}$  y 452  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Debido a esto, la actividad de peroxidasas en ese intervalo estaría determinada por la inhibición de la TXNPx y el aumento en la actividad de la GPx.

La Fig. 16 muestra las curvas de saturación de la actividad de peroxidasas en el extracto. No se observaron dos comportamientos en la actividad de peroxidasas al variar la concentración del peróxido sino que se obtuvo un máximo de  $177 \pm 9$  mU/mg de proteína soluble ( $n=4$ ) a una concentración cercana a 100  $\mu\text{M}$  del hidroperóxido y

posteriormente la inhibición (Fig16). De estos resultados se puede inferir que la enzima más abundante es la TXNPx debido a que el comportamiento de la actividad de peroxidasa en el extracto es similar al que presenta la TXNPx recombinante. Además, parecería que la  $K_m$  en el extracto es menor a la de la enzima recombinante ya que en algunas curvas se observa una saturación a concentraciones menores a  $6 \mu\text{M}$ , concentración por debajo de la cual es muy difícil determinar la velocidad.



**Figura 16. Curva de actividad de peroxidasas en extracto con respecto a la concentración del hidroperóxido.**

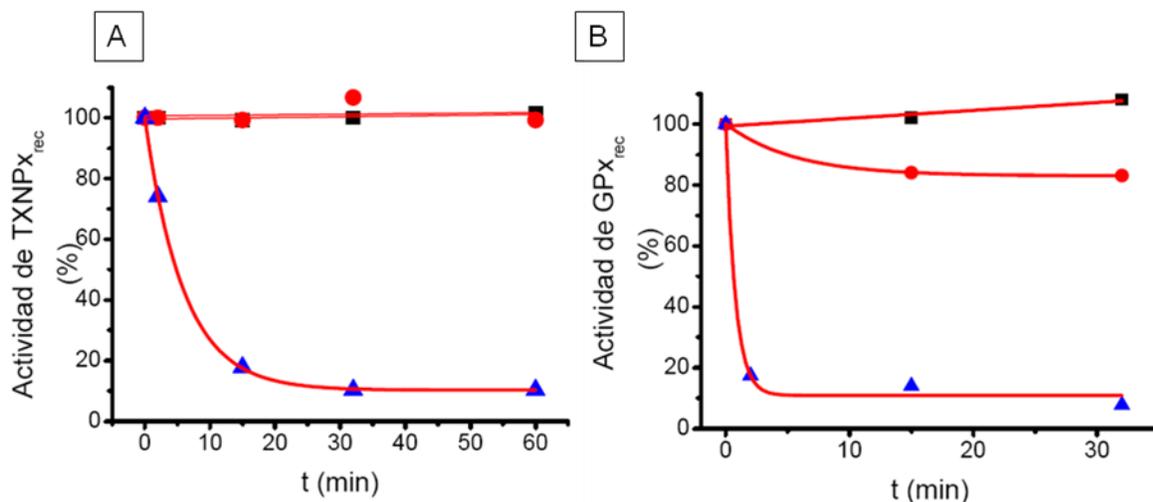
Las características cinéticas de las peroxidasas en el extracto indican que la enzima más abundante es la TXNPx, debido a la similitud en el comportamiento de la enzima recombinante; el máximo de actividad se observa a concentraciones cercanas a  $100 \mu\text{M}$ , después de esta concentración se observa la inhibición por sustrato.

Nogoceke *et al.* (1997) determinaron que la TXNPx era el 6% de la proteína soluble en *C. fasciculata*, mientras que Diechtierow y Krauth-Siegel (2011) determinaron por Western blot que la TXNPx en *T. brucei* correspondía al 0.32-0.37 %. Para poder realizar la comparación del valor que obtuve con estos valores reportados se hizo la suposición que el 100% de la actividad de peroxidasa determinada en este trabajo corresponde solamente a la TXNPx, y se tomó el valor de  $k_{cat}$  que obtuve para la TXNPx ( $k_{cat} = 420 \text{ min}^{-1}$ ) aunque esté subestimado. La concentración intracelular de la TXNPx calculada fue de 0.9 % ( $70 \mu\text{M}$ ). Aunque el valor está sobreestimado, el valor es comparable con lo que se reportó en *T. brucei* y está muy alejado del valor de *C. fasciculata*.

Es importante señalar que se realizaron esfuerzos para diferenciar la actividad de cada una de las peroxidasa (GPx y TXNPx) en el extracto.

Una de las técnicas usadas para este fin consideró que la inactivación de la TXNPx por altas concentraciones de sustrato podría inactivar a la enzima del extracto, mientras que la GPx quedaría en su forma activa. Para ello se diseñaron experimentos con las enzimas recombinantes, donde se incubaron por distintos tiempos 5 mg/mL de TXNPx ó 0.17 mg/mL de GPx en buffer 40 mM Hepes (pH 7.4) a 4°C y 37°C en ausencia de CumOOH y a 37 °C en presencia de 8 mM de CumOOH (10 veces el valor de  $K_i$ , tabla 2); de cada preincubación se tomaron 25 µg de TXNPx ó 1 µg de GPx y se midió la actividad específica bajo las condiciones estándar.

La figura 17 muestra las curvas de inactivación, en el panel A se muestra que la TXNPx no se inactiva al incubarla en hielo o a 37 °C en ausencia del hidroperóxido; al incubarla con el CumOOH la enzima se inactiva con una  $k$  de inactivación=0.07 min<sup>-1</sup>. Por otro lado, el panel B muestra que en ausencia del hidroperóxido la GPx no se inactiva al incubarla en hielo pero pierde actividad al incubarla a 37 °C; la inactivación fue tan rápida que no se logró calcular una  $k$  de inactivación. En conclusión, no fue posible diferenciar las actividades de TXNPx y GPxA en el extracto citosólico de los parásitos.



**Figura 17. Curvas de inactivación de peroxidasa por CumOOH.** Los cuadros indican la incubación en hielo, los círculos y los triángulos indican la incubación a 37 °C en ausencia y presencia de 8 mM de CumOOH respectivamente.

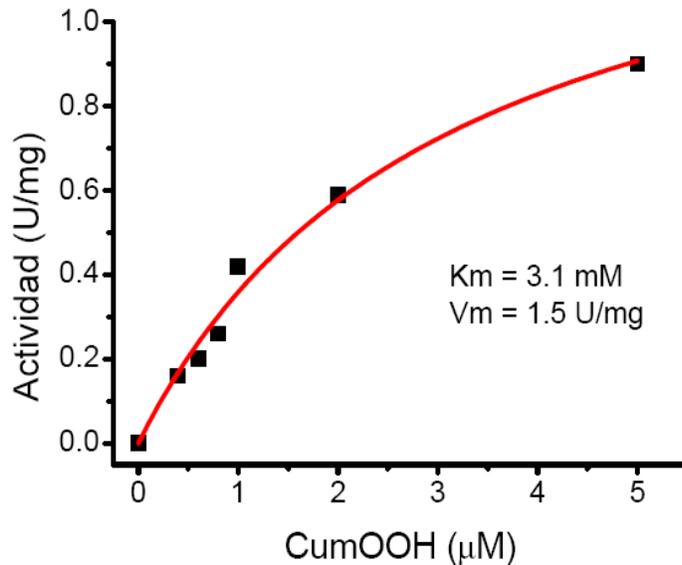
Otro de los diseños experimentales con los cuales se intentó diferenciar estas actividades en el extracto hizo la suposición que el uso de  $H_2O_2$  como sustrato oxidante revelaría la actividad de TXNPx pero no la de GPx de acuerdo a lo reportado por Wilkinson *et al.* (2000). Por lo tanto, se monitoreó la reducción de 35 ó 70  $\mu M$  de  $H_2O_2$  en el sistema reconstituido utilizando TXNPx o GPx recombinantes, en condiciones saturantes del resto del sistema. Con estos experimentos se observó que la GPx de *T. cruzi* también es capaz de reducir al  $H_2O_2$ , lo que dio pie a la caracterización de esta enzima con este sustrato descrito en la sección 6.2.2.

Por último, otra de las propuestas para diferenciar la actividad de las peroxidasas en el extracto fue utilizando GR/GSH como sistema reductor, el cual puede ser utilizado de manera poco eficiente por la GPx pero no por la TXNPx (Wilkinson *et al.* 2000b). Para ello se realizaron algunos ensayos utilizando las proteínas recombinantes. El resultado fue que la TXNPx es incapaz de reducir al CumOOH en presencia de GSH, mientras que la GPx sí puede reducirlo. Para medir la  $V_m$  de la GPx en el extracto era necesario utilizar una concentración saturante de GSH; sin embargo no se logró obtener una curva de saturación debido a que la GR presenta inhibición por GSH probablemente con una  $K_i$  similar al intervalo de concentración de la  $K_m$  de GPxA por GSH (5.8 – 7.8 mM, Wilkinson *et al.*, 2000).

Por otro lado, con el fin de evaluar la afinidad de la GPx por el CumOOH en el sistema GSH/GR, se realizó una curva de saturación (Fig.18). La gráfica muestra un comportamiento distinto al observado en la Tabla 3 en el que se utilizó TryR/T(SH)<sub>2</sub>/TXN como sistema reductor. La  $V_m$  y la afinidad de la GPx por CumOOH disminuyeron ( $V_m=1.5$  U/mg,  $K_m=3.1$  mM). La concentración máxima de CumOOH que se utilizó fue solamente de 5 mM debido a que la reacción directa entre el GSH y el CumOOH era muy rápida y no permitió cuantificar la velocidad inicial. De esta manera se decidió que las mejores condiciones para medir la  $V_m$  de la GPx en el extracto era utilizando 10 mM de GSH y 100  $\mu M$  de CumOOH.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones se determinó que la  $V_m$  de la GPxA en extractos celulares es de 7 mU/mg (n=2). Sin embargo este valor está subestimado ya que el par GR/GSH no es el mejor sistema reductor y disminuye la actividad de la GPxA hasta en un 90 %, tal como se puede observar en la  $V_m$  de la

enzima recombinante de la tabla 3 y de la figura 18, obtenidas con los distintos sistemas reductores.



**Figura 18. Curva de saturación de GPx por CumOOH con el sistema GSH/GR.**

Los datos se ajustan a la ecuación de Michaelis-Menten y muestran un comportamiento distinto al observado utilizando el sistema TryR/T(SH)<sub>2</sub>/TXN.

### 6.3.3. Comparación de las eficiencias catalíticas de las enzimas en el parásito

A partir de los valores de actividad obtenidos en extractos del parásito se puede tener una aproximación sobre cuál de las enzimas TryR, TXN, TXNPx es cinéticamente menos eficiente comparando los valores de eficiencia catalítica ( $V_m/K_m$ ) que se mostraron en la Tabla 10. Se puede observar que las enzimas menos eficientes son la TXN y la GPxA mientras que la TryR es la más eficiente. Sin embargo hay que tomar en cuenta las concentraciones de los metabolitos intracelulares ya que ello determinará si las enzimas estarán trabajando cerca de su valor de  $V_m$ .

Aunque estos valores son informativos en cuanto a la eficiencia de las enzimas en los parásitos, dichos valores no dan un valor cuantitativo del grado de control de cada una de las enzimas en el flujo de la vía. Por lo tanto, se determinaron los coeficientes de control de flujo reconstituyendo *in vitro* la vía metabólica, usando la proporción fisiológica de la TryR, TXN y la actividad conjunta de TXNPx+GPx de acuerdo a los valores de actividad en la célula que se mostraron en la Tabla 10.

#### 6.4 Determinación de los coeficientes de control de flujo

Para determinar los coeficientes de control de flujo de cada una de las enzimas, se debe realizar la reconstitución de la vía de reducción de hidroperóxidos utilizando la concentración de las enzimas de la vía en proporción similar al extracto celular.

Debido a que la concentración de GPx en la célula no se determinó con precisión, por los inconvenientes descritos en párrafos anteriores, se trabajó únicamente con la TXNPx apoyado en que el comportamiento de las peroxidasas en el extracto fue más parecido al de la TXNPx recombinante que al de la GPx.

Primeramente fue necesario analizar el comportamiento del sistema variando una de las enzimas a distintas concentraciones de otra de las enzimas en diferentes combinaciones (TryR vs. TXN, TryR vs. TXNPx, TXN vs. TXNPx). Esto se hizo con la finalidad de determinar la concentración de cada una de las enzimas en la cuales se cubrieran las siguientes condiciones: 1) obtener valores reproducibles de flujos, 2) que estuvieran en intervalos confiables de detección del sistema y 3) que se obtuviera un estado estacionario estable en corto tiempo.

Se logró determinar que a concentraciones menores a 100 mU de las enzimas los flujos eran muy bajos y poco reproducibles, mientras que el uso de concentraciones mayores a 300 mU sobrepasaban la capacidad de detección del sistema espectrofotométrico. Finalmente se determinó que las concentraciones basales de TryR, TXN y TXNPx deberían ser 264, 88, 177 mU por cubeta de ensayo, las cuales casualmente coincidieron con las  $V_m$  de las enzimas determinadas en el extracto (Tabla 10). En estas condiciones el flujo de la vía reconstituida *in vitro* fue de 5 – 8 nmol/min.

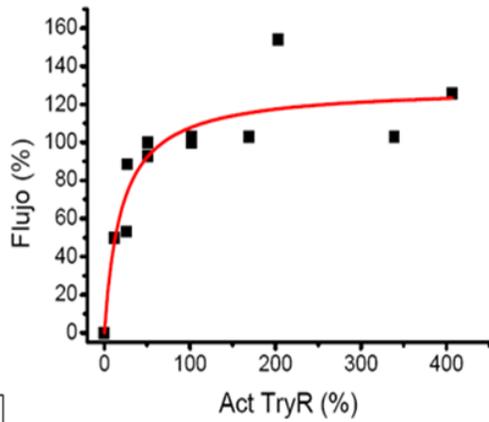
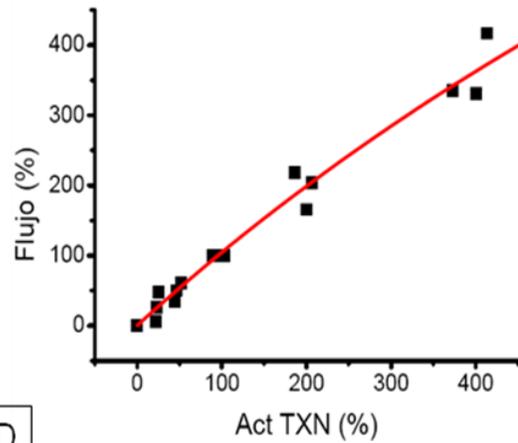
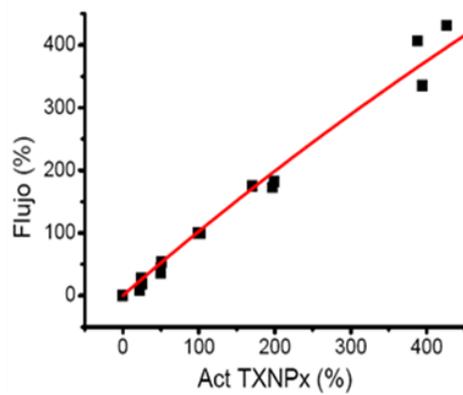
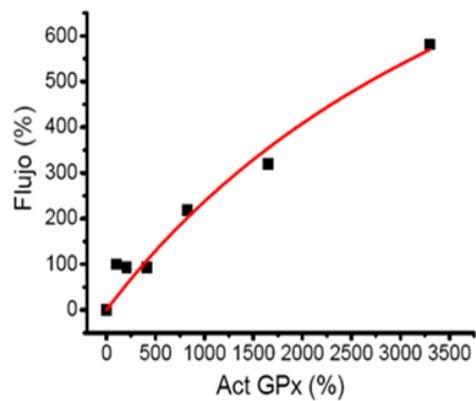
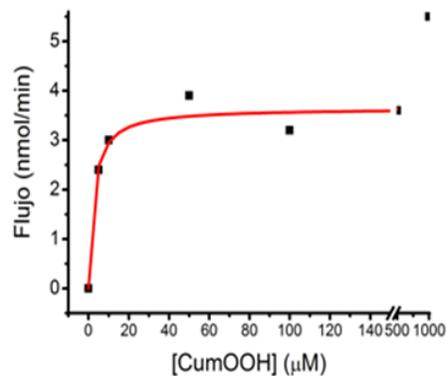
Se tituló la actividad de una de las enzimas por arriba y por debajo de la concentración basal y todo el resto del sistema se mantuvo constante tal como se describió en la Tabla 7 de la sección de metodología. Se midió el flujo de reducción del peróxido monitoreado como la oxidación de NADPH. De la gráfica de flujo contra actividad enzimática se calculó el coeficiente de control a partir de la derivada en el punto del 100% de flujo. La Fig. 19 muestra la nube de puntos de 3 determinaciones independientes para calcular el  $C_{TryR}^J$  (panel A),  $C_{TXN}^J$  (panel B) y  $C_{TXNPx}^J$  (panel C). Así

mismo, se calculó el  $C_{GPx}^J$  utilizando como 100 % el valor subestimado de 7 mU/mg; sin embargo se puede observar en el panel D que el flujo es muy bajo y poco reproducible por lo que únicamente se puede decir que el  $C_{GPxA}^J$  es < 0.3.

En el panel E se muestra la curva de la variación del flujo con respecto a la variación de la concentración de CumOOH que trata de simular el coeficiente de control de flujo del sistema generador del hidroperóxido ( $ROOH_{Syn}$ ), suponiendo que dicho sistema generador tenga un flujo tal que sintetice las distintas concentraciones ensayadas. Debido a que no se tiene reportada una concentración intracelular de hidroperóxidos en *T. cruzi*, se determinó el  $C_{ROOHSyn}^J$  suponiendo que las distintas concentraciones de ROOH corresponden a distintas velocidades de síntesis del peróxidos ( $a_{i0}$ ) (Tabla 12). Basándose en que una célula de *E. coli* puede tener concentraciones de  $H_2O_2$  entre 0.1 y 1  $\mu M$  (González-Flecha y Demple, 1997), el  $C_{ROOHSyn}^J$  es de alrededor de 1.

**Tabla 12. Determinación del coeficiente de control de flujo del sistema generador de hidroperóxidos.**

[ROOH]	$C_{ROOHSyn}^J$
0.01	1.01
0.1	0.99
1	0.96
2.5	0.9
5	0.8
10	0.6

**A****B****C****D****E**

**Figura 19. Curvas para la determinación del coeficiente de control de flujo del sistema reductor de hidroperóxidos dependiente de TXN.**

Se variaron la actividades de (A) TryR (n=2), (B) TXN (n=3), (C) TXNPx (n=3), (D) GPx (n=1), (E) ROOH<sub>Syn</sub> (n=1). Los coeficientes de control se calculan de la derivada en el 100% de cada titulación que corresponde a la proporción fisiológica de cada enzima.

Los resultados de la distribución de control de flujo de la vía se resumen en la Tabla 13.

**Tabla 13. Distribución del control de flujo del sistema reductor de hidroperóxidos dependiente de TXN en *T. cruzi***

Enzima	$C_{ai}^J$
TryR	0.18
TXN	0.99
TXNPx	0.99
GPx	<0.3
ROOH	1

Estos resultados demuestran de manera cuantitativa que el control del flujo de reducción de peróxidos recae sobre la TXN y la TXNPx con el mismo grado de control, mientras que la TryR y la GPxA tienen poco control en la vía. Por otro lado, el  $C_{ROOHSyn}^J$  determinado en este trabajo no se puede comparar con los coeficientes del resto del sistema, ya que implica otras condiciones, pero su valor sugiere que en ciertas condiciones el control de la vía también podría recaer en el sistema generador de hidroperóxidos.

A partir de estos resultados podría proponerse que la inhibición de las enzimas que controlan el flujo hacia la síntesis de T(SH)<sub>2</sub> ( $\gamma$ -ECS y/o TryS, Olin-Sandoval *et al.*, 2012), y la inhibición de la(s) enzima(s) con los  $C_{ai}^J$  más altos del flujo de reducción de peróxidos (TXN y TXNPx), podría tener dos efectos: 1) disminuir el flujo de reducción de hidroperóxidos, por lo que se generarán más ERO y 2) disminuir la concentración de T(SH)<sub>2</sub>, de manera que al parásito le será cada vez más difícil contender contra el estrés oxidante y le provocaría la muerte. Sin embargo aún falta evaluar la estructura tridimensional de estas enzimas para proponer algún fármaco que las inhiba de manera eficiente, sin afectar a las enzimas del hospedero y cuyo mecanismo de inhibición no sea competitivo.

## 7 DISCUSIÓN GENERAL

El teorema de la sumatoria de la teoría del MCA indica que la suma de los coeficientes de control de flujo negativos y positivos de las enzimas de una vía metabólica debe de sumar 1 (ver anexo 2). En algunos casos experimentales, aparentemente este teorema no se cumple porque la sumatoria es menor o mayor a uno. En los casos en que la sumatoria es menor a 1 quiere decir que existen enzimas o procesos sobre los cuales debe recaer parte del control de flujo de la vía pero que no se han evaluado en el análisis experimental. Por otro lado, cuando la sumatoria es mayor a 1, podría sugerir que existe por lo menos una enzima o proceso que permite la salida de alguno de los metabolitos intermediarios en una ramificación de la vía y el cual tiene un  $C_{ai}^J$  negativo (ver anexo 2) por lo que la suma neta sería 1. Además, no existen reportes experimentales en el MCA que indiquen que una enzima tiene un  $C_{ai}^J = 1$ , ya que esto se interpreta como que el flujo está controlando por un único paso limitante. Sin embargo, existen casos bien documentados en la literatura en las que se han reportado sumatorias de coeficientes de control con valores mayores a 1. Brand *et al.* (1994) indican que esto puede ocurrir en los siguientes casos:

- 1) existe un encadenamiento (channeling) entre las enzimas, donde una enzima entrega su producto a la siguiente enzima de la vía de manera directa (sin que exista un intermediario difundible). En dichas vías, la suma puede ser tan alta como el número de enzimas participantes (Kholodenko *et al.*, 1993)
- 2) existe transferencia de algún grupo entre las enzimas de la vía, por ejemplo los mecanismos de fosforilación-defosforilación, lo cual podría verse como un tipo de encadenamiento dinámico, o en vías de transferencia de electrones (van Dam *et al.* (1993).

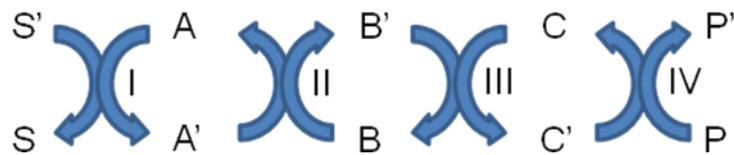
Los resultados obtenidos de la distribución del control de la vía de desintoxicación de peróxidos sugieren que existe encadenamiento entre la TXN y TXNPx ya que ambas enzimas tienen un coeficiente de control de flujo de 1. Estos resultados se pueden analizar de la manera propuesta por van Dam *et al.* (1993) y Brand *et al.* (1994).

Considerando la vía metabólica lineal hipotética de la Fig. 20 (panel A) en la que no hay encadenamiento, el número de enzimas (A, B, C, D) participantes es igual al número de procesos (I, II, III, IV) de transformación de los metabolitos. Sin embargo, en una vía de transferencia de algún grupo químico tales como en las vías de transferencia de electrones o de fosforilación-desfosforilación (Fig. 20 panel B), el número de enzimas involucradas (A, B, C) es distinto al número de procesos químicos que ocurren en la vía (I, II, III, IV), debido a que cada enzima está involucrada en dos procesos distintos; esto es, la enzima A está involucrada en el proceso "I" que es la transformación de S' a S, con su consecuente transformación a un estado modificado A' pero a su vez también está involucrada en el proceso "II", que es la transformación de la enzima B a B', con la consecuente regeneración de A.

Panel A



Panel B



**Figura 20. Esquema de distintas vías metabólicas.**

(A) Vía metabólica línea en el que el número de procesos I, II, III y IV es igual al número de enzimas involucradas; esto es, cada enzima está involucrada en un solo proceso. (B) Vía de transferencia de un grupo químico. El número de procesos es distinto al número de enzimas involucradas; en este caso, cada enzima está involucrada en dos procesos distintos.

Cuando en el experimento se hace variar la concentración de una de las enzimas, ya sea A, B o C, se están variando dos procesos simultáneos en la vía ("I y II", "II y III" o "III y IV" respectivamente). Visto de otra manera más práctica, en una vía metabólica de transferencia de algún grupo químico, dos enzimas están involucradas en un mismo proceso (por ejemplo, las enzimas A y B en el proceso "II"), por lo tanto cada proceso

es una reacción de segundo orden; esto explicaría por qué la suma de los coeficientes de control para el par TXN/TXNPx es igual a 2 (Brand *et al.* 1994).

Por otro lado, si en los experimentos de reconstitución de la vía de la Fig. 8 se variara la actividad de una de las enzimas y se pudiera medir las velocidades de los procesos de manera independiente, teóricamente la suma de los coeficientes de control de flujo de todas las enzimas de la vía sería de 1 y se cumpliría el teorema de la sumatoria (Brand *et al.* 1994).

En la vía de reducción de hidroperóxidos dependiente de TXN de *T. cruzi* (Fig. 8) la distribución del control de flujo (Tabla 12) recae principalmente sobre la TXN ( $C_{TXN}^J = 1$ ) y la TXNPx ( $C_{TXNPx}^J = 1$ ). De acuerdo al teorema de la sumatoria

$$\sum_{i=1}^n C_{ai}^J = C_{TryR}^J + C_{TXN}^J + C_{TXNPx}^J = 2.18 \quad \text{Ecuación 2}$$

la suma no da estrictamente 2.0 lo cual podría explicarse por el error inherente a la variación experimental como se ha visto en otros sistemas de reconstitución *in vitro* de una vía metabólica (Moreno-Sánchez *et al.*, 2008b). En cualquier caso, la TryR tendría un control bajo sobre este sistema de reducción de peróxidos. Considerando los valores de  $Km$  para cada una de las enzimas ( $Km_{NADPH}^{TryR} = 9 \mu\text{M}$ ,  $Km_{T(SH)_2}^{TXN} = 92 \mu\text{M}$ ,  $Km_{CumOOH}^{TXNPx} = 11 \mu\text{M}$ ) (Olin-Sandoval *et al.* 2012), el resto de los componentes del sistema reconstituido (NADPH, T(SH)<sub>2</sub>, ROOH) se adicionaron en concentraciones saturantes (160, 450, 100  $\mu\text{M}$  respectivamente), por lo que se espera que las enzimas no controlen por limitación de los sustratos externos de la vía metabólica.

Por otro lado, aunque la vía comprende tanto a la TXNPx como a la GPx, no se evaluaron los  $C_{ai}^J$  de las enzimas en presencia de las dos peroxidasas, ya que cada una de ellas tiene preferencia por sustratos distintos (como se discutió en la sección 6.2.2) por lo que podría sobrestimarse el control de la que tiene menor afinidad por el sustrato presente en la mezcla de reacción. Así mismo, al hacerlo con uno de los sustratos con los que se trabajó en esta tesis (CumOOH, t-butOOH o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se requieren altas concentraciones para saturar a la GPx, las cuales son inhibitorias para la TXNPx (ver  $Km$  y  $Ki$  en Tablas 2 y 3).

Considerando la reconstitución realizada para determinar el  $C_{GPx}^J$  y tomando los valores de  $C_{TryR}^J$  y  $C_{TXN}^J$  determinados en el sistema reconstituido con la TXNPx, se puede definir el siguiente teorema de la sumatoria:

$$\sum_{i=1}^n C_{ai}^J = C_{TryR}^J + C_{TXN}^J + C_{GPx}^J = 1.5 \quad \text{Ec. 3}$$

en el cual al parecer no se cumple que la suma se igual a 2.0 como cuando se tituló con la TXNPx. Los resultados sugieren fuertemente que puede existir un encadenamiento selectivo de la TXN con la TXNPx pero no de la TXN con la GPxA. Sin embargo, para evaluar esta hipótesis se tendrían que determinar los coeficientes de control de la TryR y de la TXN utilizando a la GPxA como la reductora del peróxido.

Existe cada vez mayor número de reportes que indican la interacción física de la TXN con la TXNPx (Piñeyro *et al.*, 2011; Fiorillo *et al.*, 2012;). Por lo tanto, se puede pensar que además del acoplamiento físico entre estas dos proteínas, existe un acoplamiento funcional tal como se demostró por medio de esta reconstitución fisiológica de la vía metabólica.

## **8 CONCLUSIONES**

En este trabajo se determinó por primera vez la distribución del control del flujo de reducción de hidroperóxidos dependiente de TXN de *T. cruzi*. Este enfoque cuantitativo es el primero de su tipo en parásitos tripanosomátidos para identificar cuál enzima limita el flujo en esta vía metabólica. Se demostró experimentalmente que existe encadenamiento funcional entre la TXN y TXNPx debido a que la suma de sus coeficientes de control es igual a 2. Esto sugiere que para afectar el sistema enzimático de desintoxicación de peróxidos de estos parásitos se puede intervenir a nivel de la TXN o TXNPx con la posibilidad de obtener el mismo resultado. Por otro lado, el bajo control que tienen la TryR y la GPxA dificulta el considerarlas como blancos terapéuticos debido a que se necesitarían inhibidores muy potentes y/o específicos para afectar el flujo de esta vía inhibiendo dichas enzimas .

## 9 PERSPECTIVAS

El contar con las enzimas recombinantes del metabolismo del T(SH)<sub>2</sub> abre la posibilidad de realizar la reconstitución *in vitro* de una vía donde se incluyan otras enzimas, tanto de la síntesis de tripanotión, síntesis de GSH, síntesis de Spd y/o abastecimiento de NADPH con el fin de evaluar la distribución de control de flujo y concentración de algunos intermediarios de interés.

Con los datos que generé en la tesis de licenciatura, en conjunto con los datos generados en este trabajo de maestría, se podrá realizar un modelo cinético de la vía de reducción de hidroperóxidos utilizando el programa de modelado metabólico Copasi, en el cual se puede evaluar la distribución de control del flujo de los procesos y no de las enzimas como se realizó en esta tesis.

Adicionalmente se podrá completar el modelo de la vía de síntesis de tripanotión (Olín-Sandoval *et al.*, 2012), y evaluar el efecto que tiene la variación de la actividad de estas enzimas (o de los procesos) sobre el flujo y la concentración de T(SH)<sub>2</sub>, y no sobre el flujo de reducción de hidroperóxidos.

La investigación integral del grupo de trabajo deja el panorama abierto para la investigación de inhibidores de las enzimas que controlan el flujo de reducción de hidroperóxidos y de la síntesis de tripanotión. La inhibición en diversos puntos del metabolismo antioxidante de los tripanosomátidos podría proponerse como una estrategia terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de Chagas

## 10 REFERENCIAS

- 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.
- Alphey M. S., Bond C.S., Tetaud E., Farilamb A., Hunter W. The structure of reduced Tryparedoxin peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2-cys peroxiredoxins. *J Mol Biol*; **300**: 903-916; 2000
- 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.
- Brand M. D., Vallis B., Kessler A. The sum of flux control coefficients in the electron-transport chain of mitochondria. *Eur J Biochem*; **226**: 819-829;1994.
- Budde H., Flohé L., Hecht H-J., Hofmann B., Stehr M., Wissing J., Lündorf H. Kinetics and redox-sensitive oligomerisation reveal negative subunit cooperativity in Tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biol Chem*; **384**: 619-633; 2003.
- 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 tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **1**:159-218; 1909.
- Comini M., Dirdjaja N., Kaschel M., Krauth-Siegel L. Preparative enzymatic synthesis of trypanpanothione and trypanothione analysis. *Int J Parasitol*; **39**: 1059-1062; 2009.
- Coura J, de Castro S. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; **91**: 3-24; 2002.
- 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.
- 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.
- Diechtierow M. y Krauth-Siegel L. A tryparedoxin-dependent peroxidase protects African trypanosomes from membrane damage. *Free Radic Biol Med*. **51**: 856-868; 2011.
- Eisenthal R., Danson M., Hough D. Catalytic efficiency and kcat/Km: a useful comparator? *Trends Biotechnol*; **25**: 247-249; 2007.
- Fairlamb A. H., Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol*; **46**: 695-729; 1992.
- Fell D. Metabolic control analysis. En Fell D. Understanding the control of metabolism. *Portland Press Ltd*. London; 1997.

- Fiorillo A., Colotti G., Boffi A., Baiocco P., Ilari A. The crystal structures of the tryparedoxin-tryparedoxin peroxidase couple unveil the structural determinants of leishmania detoxification pathway. *PLoS Negl Trop Dis.* **6(8)**: e1781; 2012.
- 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; 2002.
- 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.
- González-Chávez Zabdi. Tesis de licenciatura. Análisis cinético del sistema de desintoxicación de peróxidos de *Trypanosoma cruzi*. UNAM, 2011.
- González-Flecha B. y Demple B. Homeostatic regulation of intracelular hydrogen peroxide concentration in arobically cgrowing *Escherichia coli*. *J Bacteriol*; **179(2)**: 382-388; 1997.
- Guerrero S. A., Flohé L., Kalisz H., Montemartini N., Nogocoke 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. y Fairlamb A. H., Trypanothione metabolism: a chemotherapeutic target in trypanosomatids. *Parasitol today*; **3**: 312-315; 1987.

- 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., Yamaguchi M., Novoa L., Fairlamb A. H., Cerami A. Biosynthesis of the trypanosomatid metabolite trypanothione: purification and characterization of trypanothione synthetase from *Crithidia fasciculata*. *Biochem*; **29(16)**: 3924-3929; 1990.
- 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.
- 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.
- Juarez-Tobias S., Vaughan G., Torres-Montoya A., Escobar-Gutierrez A. Short report: Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* among Teenek Amerindian residents of the Huasteca region in San Luis Potosi, Mexico. *Am J Trop Med Hyg*; **81(2)**: 219-222; 2009.
- Kholodenko B. N., Cascante M., Westerhoff H. V., Dramatic changes in control properties that accompany channelling and metabolite sequestration. *FEBS Lett*; **336(3)**: 381-384; 1993.
- 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., Enders B., Genderson G. B., Fairlamb A. H., Schirmer H. Trypanothione reductasa from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme. *Eur J Biochem*; **164**: 123-128; 1987.
- 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.

- 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.
- Moreno-Sanchez R., Saavedra E., Rodríguez-Enríquez S., Olín-Sandoval V. Metabolic control analysis: A tool for designing strategies to manipulate metabolic pathways. *J Biomed Biotechnol*; 2008: 597913; 2008.
- Moreno-Sánchez R., Encalada R., Marín-Hernández A., Saavedra E. Experimental validation of metabolic pathway modeling. An illustration with glycolytic segments from *Entamoeba histolytica*. *FEBS J*; **275**: 3454-3469; 2008.
- 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 Nothrop D. (editores). *Enzymatic Mechanisms. Biomedical and Health Research*; **27**: 250-263; 1999.
- Olin-Sandoval V., Moreno R., Saavedra E. Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites. *Curr Drug Targ*; **11**: 1614-1630; 2010.

- Olin-Sandoval V., González-Chávez Z., Berzunza-Cruz M., Martínez I., Jasso-Chávez R., Becker I., Espinoza B., Moreno-Sánchez R., Saavedra E. Drug validation of the trypanothione enzymes through metabolic modelling. *FEBS J*; **279(10)**: 1811-1833; 2012.
- 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, Parodi-Talice A., Portela M., Arias D. G., Guerrero S. A., Robello C. Molecular characterization and interactome analysis of *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin 1. *J Proteomics*. **74(9)**: 1683-1692; 2011.
- Ramos-Ligonio A., López-Monteon A., Guzmán-Gómez D., Rosales-Encina J., Limón-Flores Y., Dumonteil E. Identification of a hyperendemic area for *Trypanosoma cruzi* infection in central Veracruz, Mexico. *Am Trop Med Hyg*; **83(19)**: 164-170; 2010.
- 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.
- Romao S., Castro H., Sousa C., Carvalho S., Tomás A M. The cytosolic tryparedoxin of *Leishmania infantum* is essential for parasite survival. *Int J Parasitol*; **39(6)**: 703-711; 2009.
- 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.

- Sauro H. M., Kacser H., Acerenza L. Enzyme-enzyme interactions and control analysis 1. The case of non-additivity: monomer-oligomer associations. *Eur J Biochem*; **187**: 481-491; 1990a.
- Sauro H. M., Kacser H. Enzyme-enzyme interactions and control analysis 1. The case of non-independence: heterologous associations. *Eur J Biochem*; **187**: 493-500; 1990b.
- Segel I. H. Enzyme Kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. John Wiley and Sons. California, 1993.
- Schlecker T., Schmidt A., Dirdjaja N., Vondcken F., Clayton C., Krauth-Siegel RL. Substrate specificity, localization and essential role of the glutathione peroxidase-like trypanothione peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*; **280**: 14388-14394; 2005.
- 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.
- van Dam K., van der Vlag J., Kholodenko B. N., Westerhoff H. V. The sum of the control coefficients of all enzymes on the flux through a group-transfer pathway can be as high as two. *Eur J Biochem*; **212**: 791-799; 1993.
- 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., Temperton N. J., Mondragon A., Kelly J. M. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*; **275(11)**: 8220-8225; 2000b.
- Wilkinson S. R., Meyer D. J., Taylor M. C., Bromley E. V., Miles M. A., Kelly J. M. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPxI 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.
- Yuan Y., Knaggs M., Poole L., Fetrow J., Salsbury F Jr. Conformational and oligomeric effects on the cysteine pK(a) of tryparedoxin peroxidase. *J Biomol Struct Dyn*; **28(1)**: 51-70; 2010.

## Anexo. 1 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:



La velocidad de las enzimas se comporta de manera hiperbólica al incrementar la concentración de sus sustratos. Este comportamiento se representa por la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 4)

$$v_0 = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ecuación 4}$$

en donde  $v_0$  es la velocidad inicial de la reacción,  $V_m$  la velocidad máxima,  $K_m$  la constante de Michaelis-Menten que representa la afinidad de la enzima por el sustrato y  $[S]$  la concentración de sustrato (Segel, 1993).

El valor de  $K_m$  representa la concentración de sustrato a la cual una enzima alcanza la mitad de su  $V_m$ . 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  $V_m$  estará definida por la Ecuación 5.

$$V_m = k_{cat}[ES] = k_{cat}[E]_T \quad \text{Ecuación 5}$$

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 5 y se obtiene experimentalmente usando las enzimas purificadas.

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  $V_m/K_m$  (eficiencia catalítica), conjuntan la velocidad de captura del sustrato y la liberación de producto (Northrop, 1999). La diferencia entre ambas relaciones 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  $V_m/K_m$  es útil para enzimas no puras o que se encuentran en un extracto celular, y por lo tanto el valor dependerá de la cantidad de enzima contenida en la muestra (de acuerdo a la Ec. 5). 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.

## Anexo 2. Breve repaso al análisis de control metabólico

Es común encontrar en los libros de Bioquímica o en los artículos científicos el concepto de que una vía metabólica está regulada por una enzima y que de ellas depende el comportamiento del flujo de la vía. A dichas enzimas se les ha dado el nombre de “cuello de botella”, “enzima limitante” o “rate-limiting step”. Este concepto tiene varias implicaciones: si en una vía metabólica existiera una sola enzima limitante, al variar la actividad de cualquiera del resto de las enzimas no habría un efecto en el flujo de la vía. Por otro lado, incrementos en la actividad de la “enzima limitante” corresponderían incrementos lineales en los flujos de la vía metabólica. Ninguno de los dos resultados se han podido obtener experimentalmente (Fell, 1997) por lo que el concepto de la enzima limitante parece no ser el apropiado para entender los mecanismo que controlan una vía metabólica.

Desde finales de la década de 1970 en que se empezó a desarrollar la teoría del control metabólico (MCA), se ha demostrado experimentalmente que el concepto de un único paso limitante es incorrecto. Los estudios experimentales en los que se ha aplicado el análisis cuantitativo del MCA han demostrado que el control del flujo de una vía metabólica se reparte en diferentes grados entre todas las enzimas de la vía (Fell, 1997; revisado en Moreno-Sánchez *et al*, 2008a).

Para entender cómo se controla una vía metabólica se debe determinar su estructura de control a través de la determinación de los coeficientes de control de flujo ( $C_{ai}^J$ ), coeficientes de control de concentración ( $C_{Ei}^X$ ) y coeficientes de elasticidad ( $\varepsilon_X^{Ei}$ ) de cada una de las enzimas de la vía (Moreno-Sanchez *et al*. 2008a).

El coeficiente de control de una enzima es el grado de control que una enzima tiene sobre el flujo de la vía ( $C_{ai}^J$ ) o sobre la concentración de un metabolito intermediario de la vía ( $C_{Ei}^X$ ). Matemáticamente el coeficiente de control de flujo se define por la ecuación 6:

$$C_{ai}^J = \frac{dJ}{da_i} \cdot \frac{a_{i0}}{J_0}$$

Ecuación 6.

donde  $\frac{dJ}{da_i}$  es el cambio en el flujo de la vía cuando se realiza un cambio infinitesimal en la actividad de la enzima  $i$ ,  $a_{i0}$  es la actividad de la enzima  $i$  en condiciones basales, y  $J_0$  es el flujo de la vía en condiciones basales.

De acuerdo a la teoría del MCA cada una de las enzimas aporta cierto grado de control al flujo de la vía; habrá enzimas cuyo grado de control sea alto, las cuales tendrán un valor de  $C_{ai}^J$  “alto”, mientras que habrá enzimas cuyo aporte al control del flujo de la vía sea bajo, las cuales tendrán valores “bajos” de  $C^J$ . Sin embargo para contextualizar cuánto es un  $C^J$  “bajo” o “alto”, existe el teorema de la sumatoria en el MCA, el cual se expresa en la ecuación 7:

$$\sum_{i=1}^n C_{ai}^J = 1 \quad \text{ecuación 7}$$

por lo que un  $C_{ai}^J$  cercano a 1 se considera alto y un  $C_{ai}^J \ll 1$  o cercano a cero, se considera bajo. Por otro lado, cuando dos enzimas tienen  $C_{ai}^J$  con un valor cercano a 0.5 cada una, entonces las dos compartirán de manera similar el control del flujo de la vía.

Además, en una vía metabólica existen ramificaciones en las que un metabolito puede drenarse por la primera enzima de la otra vía metabólica la cual tendrá un coeficiente de control negativo sobre el flujo principal que se está evaluando. Así mismo, existirán vías metabólicas que pueden aportar intermediarios a la vía, por lo tanto estas vías tendrán coeficientes de control positivos sobre el flujo de la vía.

Para determinar dicho coeficiente, se requieren variaciones pequeñas en la actividad de la enzima a evaluar, sin alterar el resto de las enzimas, y se evalúa su efecto sobre el flujo de la vía.

Existen distintas aproximaciones experimentales para variar la actividad de la enzima en las células para poder determinar los  $C_{ai}^J$ , de las enzimas de una vía (revisado en Moreno-Sánchez *et al.*, 2008a)

- 1) a través de la formación de heterocigotos o heterocariontes,
- 2) titulando la actividad de una enzima con un inhibidor específico,
- 3) por medio de el análisis de elasticidades, donde también se requieren inhibidores,
- 4) a través del modelado cinético en programas computacionales,

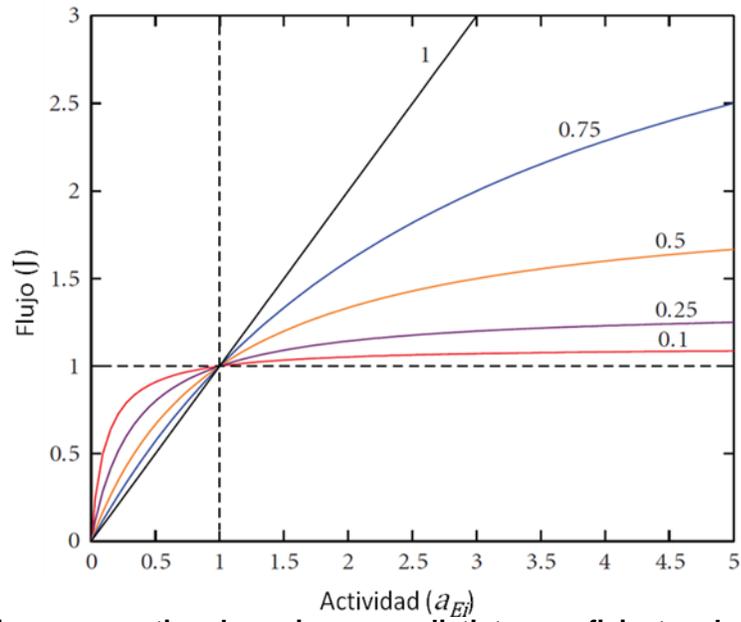
5) manipulando genéticamente un organismo para controlar la concentración de enzima activa en la célula y

6) reconstituyendo la vía *in vitro*

Para hacer la reconstitución *in vitro* de la vía se requiere que las enzimas participantes estén en forma purificada, el uso de metabolitos puros, y una técnica para determinar el flujo de la vía (medir concentración del metabolito final a través del tiempo), así como la determinación de las actividades de cada una de las enzimas en la célula para obtener la proporción fisiológica de cada enzima.

Para determinar los  $C_{ai}^J$  con dicho enfoque se realiza la reconstitución *in vitro* de la vía utilizando las proteínas purificadas en la proporción fisiológica. Se varía la actividad de una de las enzimas por arriba y debajo de la proporción fisiológica y se mantiene fija la actividad del resto de las enzimas y se determina el flujo de la vía en cada punto. Se grafican los valores normalizados de flujo contra actividad enzimática y se calcula la derivada en el 100% de flujo el cual corresponde al coeficiente de control de flujo.

En la figura 21 se representan las curvas que tendrían diferentes enzimas con coeficientes de control de flujo distintos. La línea roja correspondería a una enzima con un  $C_{ai}^J = 0.1$ , la cual controlaría solamente el 10% el flujo de la vía. Se puede apreciar que al variar su actividad (en un intervalo pequeño) por arriba y por debajo de su  $a_{i0}$  ( $a_{i0}=1$ ), la variación en el flujo es de menor magnitud (es decir, el flujo varía el 10% con respecto a la variación de la actividad de la enzima  $i$ ), por lo tanto esta enzima controlaría “poco”. En el otro extremo, la curva negra muestra una enzima con un  $C_{ai}^J = 1$ , la cual controlaría al 100% el flujo de la vía, por lo tanto al variar su actividad por debajo y por arriba de su  $a_{i0}$  ( $a_{i0}=1$ ), se observa una variación en el flujo de la misma magnitud (es decir, el flujo varía el 100% con respecto a la variación de la actividad de la enzima  $i$ ), por lo tanto esta enzima significaría que es un verdadero paso limitante en la vía.



**Figura 21. Gráfico comparativo de enzimas con distintos coeficientes de control de flujo.** En este gráfico se muestra cómo serían los gráficos de Flujo vs. actividad de enzimas con distintos coeficientes de control de flujo. Los datos de  $a_{i0}$  y  $J_0$  están normalizados, de manera que el  $C_{\alpha_i}^J$  se calcula en el punto 1,1. Tomado e Moreno-Sánchez *et al.*, 2008a.