



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO DEL EFECTO DEL DIMETIL FUMARATO
SOBRE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA
TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE *Trypanosoma cruzi*”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA

CLAUDIA SALAZAR ORTIZ



CDMX, MÉXICO

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SÓTRES

VOCAL: Q. JUAN GÓMEZ DUEÑAS

SECRETARIO: DR. RUY PÉREZ MONTFORT

1er. SUPLENTE: DR. FELIX MORALES FLORES

2° SUPLENTE: DRA. GUILLERMINA YAZMÍN ARELLANO SALAZAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 201 ORIENTE. DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA ESTRUCTURAL DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

DR. RUY PÉREZ MONTFORT

SUPERVISORA TÉCNICA:

BIOL. NALLELY CABRERA

SUSTENTANTE:

CLAUDIA SALAZAR ORTIZ

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han formado parte importante de mi vida y de esta etapa formativa, ya que sin ellas esto no hubiera sido posible.

En mi primer lugar, quiero agradecerle a mi padre, Roberto, por su gran terquedad en que aprendiera y estudiara alguna ciencia, por tomarse todo el tiempo del mundo (a veces demasiado) en enseñarme las bases de la química antes de que fuera necesario, por sus grandes nemotécnicas para que me aprendiera toda la tabla periódica y sus números de oxidación. Aunque en su momento lo destesté, reconozco que fue una gran labor, que lo disfruté y que encendió mi interés por el tema y por querer aprender las cosas desde las bases más simples. Gracias

$B^5_{10.8}$.

También quiero agradecer a Dulcita, por sus cuidados y atenciones todos estos años. Por su paciencia, cariño y dedicación en mi bienestar y felicidad. Te quiero mucho. Gracias infinitas a Román y Emiliano por todo su apoyo y compañía en estos años.

A mi hermana querida, la mejor Rona del mundo. Gracias por siempre estar ahí, haciéndome reír, apoyándome, motivándome y aconsejándome siempre que lo necesito (o sea, todo el tiempo). Eres mi inspiración y te admiro profundamente.

Gracias a ti, Joaquín, porque sin ti esto no hubiera sido posible. Gracias por 14 años de inspiración, diversión, aprendizajes y mucho amor. Gracias por ser siempre mi admirador número uno, por siempre darme lo mejor de ti y por querer crecer conmigo. Eres demasiado especial para mí que es inefable. Te amo.

Quiero agradecerle a toda mi familia por siempre estar pendientes de mi bienestar y de mi educación. Gracias a mis tíos, Pilar y Alejandro, por todas sus atenciones, a lo largo de estos años. A mi tía Lety, por todo tu apoyo y cuidados, antes y durante la carrera. Gracias a mi prima Ale, por siempre cuidarme y por ser mi otra hermana mayor. A mi prima Marce, gracias por la compañía durante la carrera y los paseos con perritos. Gracias a mi primo Álvaro, a mi tía Ceci y al resto de mi familia que ha formado parte esencial de mi crecimiento personal y profesional.

Gracias a Ximena, Joaquín y Sonia por todo su apoyo y sus palabras de aliento en toda mi trayectoria. Gracias por siempre estar pendientes y motivarme a seguir.

No puedo dejar de mencionar a mis queridos amigos, que sin ellos la carrera hubiera sido infinitamente más tediosa. Gracias Lalo, Koke, Luis, CV, Alex, Fer, Sara, Helen, Franco, Ari, Artemio por compartir su tiempo y energía conmigo.

Gracias por su amistad y por todos los momentos increíbles que hemos pasado dentro y fuera de la facultad, son mi mejor recuerdo.

Por supuesto, quisiera agradecer a mi asesor académico, Dr. Ruy Pérez Montfort, por aceptarme en su laboratorio, por su dedicación y orientación en cada etapa de este proyecto.

Un agradecimiento infinito a mi asesora técnica, Nallely Cabrera González, por acogerme tan cálidamente, por enseñarme todo desde cero y por motivarme a lo largo de este proceso que parecía interminable. Gracias por siempre dedicarme tu tiempo, por tu paciencia y tus consejos.

Adicionalmente, quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que formaron parte de mi proyecto de tesis en el Instituto de Fisiología Celular. Sin su colaboración y disposición, mi estudio no hubiera sido posible.

Gracias especiales al Dr. Alfredo Torres Larios, por todas sus aportaciones y comentarios que enriquecieron mi trabajo. Gracias por todos los consejos y pláticas que ayudaron a mi formación profesional y personal. Siempre estará presente.

También quiero agradecer al Instituto de Química y a mis compañeros y asesores del Laboratorio de Inorgánica 3. Me llevo muchas experiencias y aprendizajes.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecerle a la Universidad Nacional Autónoma de México y a su Facultad de Química, así como a todos los profesores y personal administrativo que han contribuido a mi formación académica. Su dedicación y compromiso con la educación han sido fundamentales en mi desarrollo profesional y personal.

A Joaquín, mi ratita querida

No tengo palabras para agradecerte todo tu inmenso cuidado, apoyo y amor incondicional que me has dado todos estos años.

Este logro no es solo mío, es tuyo y es nuestro.

Te amo.

Índice

Abreviaturas.....	10
Resumen.....	11
Abstract.....	12
1. Introducción.....	14
1.1 Enfermedad de Chagas.....	14
1.2 Parasitología.....	16
1.2.1 Ciclo de Vida.....	16
1.2.2 Metabolismo Energético de <i>T.cruzi</i>	17
1.3 Tratamiento Farmacológico Actual.....	19
2. Antecedentes.....	21
2.1 Triosafosfato Isomerasa.....	21
2.1.1 Actividad Catalítica.....	24
2.2 Importancia de la Cisteína de Interfase.....	26
2.3 Dimetil Fumarato.....	27
3. Objetivos.....	31
3.1 Objetivo General.....	31
3.2 Objetivos Particulares.....	31
4. Métodos y Materiales.....	32
4.1 Extracción de DNA Plasmídico.....	32
4.2 Transformación en <i>E.coli</i> BL21 DE3 con DNA Plasmídico.....	33
4.3 Protocolo de Sobreexpresión de TcTIMs.....	34
4.4 Protocolo de Purificación de TcTIMs.....	34
4.4.1 Columna <i>SP-Sefarosa</i>	35
4.4.2 Columna de <i>HisTrap</i>	36
4.5 Determinación de la Actividad Enzimática de TIMs.....	38

4.5.1 Preparación y Calibración de GAP.....	38
4.5.2 Determinación de la Actividad Específica de TIMs.....	39
4.6 Protocolo de Ensayos de Inhibición del DMF con las TcTIMs.....	40
4.7 Determinación de la IC ₅₀ de TcTIM Silvestre y Mutantes.....	41
5. Resultados y Discusión.....	42
5.1 Actividad Específica de TIMs.....	42
5.2 Efecto del DMF sobre la Actividad Catalítica de TcTIM Silvestre y HsTIM.....	42
5.3 Efecto del DMF sobre la Actividad Catalítica de las Mutantes De TcTIM.....	45
5.4 Otros Experimentos	53
5.4.1 Derivados del DMF: MMF y Na ₂ F.....	53
5.4.2 DMF y Otras TIMs de Parásitos.....	54
6. Conclusiones.....	56
7. Perspectivas.....	57
8. Referencias.....	58

Índice de Figuras y Tablas

<i>Figura 1</i> : Distribución de triatomas en México.....	16
<i>Figura 2</i> : Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
<i>Figura 3</i> : Estructura química de Benznidazol y Nifurtimox.....	19
<i>Figura 4</i> : Mecanismo de acción de Bz y Nfx.....	20
<i>Figura 5</i> : Metabolismo enérgico de <i>T.cruzi</i>	21
<i>Figura 6</i> : Estructuras químicas DHAP y GAP.....	22
<i>Figura 7</i> : Estructura cristalina TcTIM.....	23
<i>Figura 8</i> : Mecanismo de catálisis de TIM.....	24
<i>Figura 9</i> : Estructura cristalina de TbTIM con C15 y Asa 3.....	26
<i>Figura 10</i> : Mecanismo de succinación.....	29
<i>Figura 11</i> : Estructuras químicas de DMF y MMF.....	29
<i>Figura 12</i> : Mecanismo inmunoregulatorio de GAPDH por DMF.....	30
<i>Figura 13</i> : PAGE-SDS de purificación TcTIM C15A.....	36
<i>Figura 14</i> : PAGE-SDS de purificación TcTIM silvestre.....	37
<i>Figura 15</i> : Reacción acoplada para determinar actividad de TIMs.....	39
<i>Figura 16</i> : Gráfica de IC ₅₀ con TcTIM silvestre.....	43
<i>Figura 17</i> : Gráfica de actividad residual de TcTIM silvestre y HsTIM.....	44
<i>Figura 18</i> : Alineación de secuencias de TcTIM y HsTIM.....	45
<i>Figura 19</i> : Gráfica de actividad residual TcTIM silvestre y mutante C126A.....	46
<i>Figura 20</i> : Gráfica de actividad residual TcTIM silvestre y mutante C118A.....	47
<i>Figura 21</i> : Gráfica de actividad residual TcTIM silvestre y mutante C40A.....	48
<i>Figura 22</i> : Gráfica de actividad residual TcTIM silvestre y mutante C15A.....	50
<i>Figura 23</i> : Estructura cristalina de TcTIM con cisteínas y sitio catalítico.....	54

<i>Tabla 1:</i> Compuestos inhibidores de TcTIM por cisteínas	27
<i>Tabla 2 :</i> Protocolo de medición de actividad residual de TIMs.....	40
<i>Tabla 3 :</i> Actividad específica de TIMs	42
<i>Tabla 4 :</i> IC ₅₀ de TcTIM mutantes.....	51
<i>Tabla 5 :</i> Distancias de cisteínas a lisina14 de TcTIM	51
<i>Tabla 6 :</i> Área de cisteínas de TcTIM expuestas al disolvente.....	53
<i>Tabla 7 :</i> Concentraciones evaluadas en TcTIM de MMF y Na ₂ F.....	54
<i>Tabla 8 :</i> Concentraciones de DMF evaluadas TIM de otros parásitos.....	54

Abreviaturas

ATP	Adenosin trifosfato
AA	Aminoácido
BL21 DE3 pLysS	Cepa de <i>Escherichia coli</i>
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
dH ₂ O	Agua destilada, desionizada y esterilizada
DMF	Dimetilfumarato
DTT	Ditiotreitol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EtOH	Alcohol etílico
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas
GAP	Gliceraldehído-3-fosfato
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
G3P	Glicerol-3-fosfato
HsTIM	Triosafofosfato isomerasa de humano
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria-Bertani
M	Concentración molar (mol/L)
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MMF	Monometil fumarato
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducida
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
Na ₂ HPO ₄	Fosfato disódico
Na ₂ HCO ₃	Bicarbonato de sodio
Na ₂ F	Fumarato de sodio
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
rTEV	Enterocinasa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante
SOB	Medio de cultivo microbiano
TEA	Trietanolamina
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletano-1,2-diamina
TE	Amortiguador trietanolamina/EDTA
TIM	Triosafofosfato isomerasa
TcTIM	Triosafofosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
Tris	Trizma®
α-GDH	α-glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
2SC	S-(2-succinil)cisteína

Resumen

La enfermedad de Chagas es una infección causada por el parásito tripanosomátido *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Este parásito es transmitido al humano por medio de la picadura de un insecto hematófago y, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, más de 6 millones de personas alrededor del mundo (principalmente en América Latina) son portadoras de este parásito, causando más de 10,000 muertes al año. La enfermedad de Chagas se clasifica dentro de las enfermedades tropicales desatendidas y aún no existe un tratamiento eficaz, por lo que es de gran interés la búsqueda de blancos terapéuticos específicos para el desarrollo de nuevos y mejores fármacos.

La triosafofato isomerasa (TIM) es una enzima que juega un papel muy importante en la glucólisis. Participa en el 5° paso de esta ruta metabólica en la interconversión entre el gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) para la formación de piruvato y, posteriormente, de ATP. La TIM de *T. cruzi* (TcTIM) es una proteína ampliamente estudiada por su gran capacidad catalítica. En su secuencia de aminoácidos (AA) cuenta con 4 residuos de cisteínas, donde la cisteína de interfase (Cis15) es indispensable para su estructura y actividad catalítica. En nuestro grupo de investigación, se han analizado diversos compuestos derivatizantes de cisteínas que reaccionan con la Cis15, provocando la inactivación de la enzima. El dimetil fumarato (DMF) es un fármaco utilizado para el tratamiento de distintas enfermedades relacionadas con el sistema inmune, como la esclerosis múltiple y la psoriasis. Por otro lado, se va visto que el DMF actúa sobre las cisteínas catalíticas de otras enzimas glucolíticas por medio de una reacción de succinación, provocando un efecto inmunoregulador. Basándonos en esta información previa, en este trabajo se analizó el efecto del DMF sobre la actividad catalítica de la TcTIM. Para esto se sobreexpresó y purificó la enzima TcTIM silvestre, así como sus mutantes TcTIMC15A, TcTIMC40A, TcTIMC118A y TcTIMC127A. Posteriormente, se evaluó la inhibición que provocaba el DMF sobre éstas y se observó que el DMF inhibe la actividad catalítica de la TcTIM silvestre, mientras que no hubo efecto en la TIM de humano. Con la mutante TcTIMC15A no se observó un efecto inhibitorio, mientras

que en las otras mutantes sí. Debido a este comportamiento, se propone un posible mecanismo de inhibición que involucra principalmente a la Cis15, posiblemente provocando un cambio estructural y permitiendo la interacción del compuesto con otra cisteína relevante para actividad catalítica de la enzima (Cis40). Con esta información proponemos que la succinación de ambas cisteínas genera el producto 2SC, que inactiva a la enzima y por lo tanto, la pérdida de su actividad catalítica.

Abstract

Chagas disease is caused by the parasite called *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). This parasite is transmitted to a mammalian host through the bite of a hematophagous insect. According to the World Health Organization, more than 6 million people in the world (mainly in Latin America) are carriers of this parasite. This Chagas disease causes more than 10,000 deaths per year and is classified as one of the most neglected tropical diseases and so far there's no effective treatment. For this reason, the study of new potential targets is crucial to provide leads in the design of a new anti-chagasic drug. The metabolism of *T. cruzi* depends on the glycolytic pathway as an energy source for its survival. Thus, enzymes in this pathway are excellent targets for the search of small molecules that inhibit them, affecting their metabolic function. Triosephosphate isomerase (TIM) is a dimeric enzyme that catalyzes the isomerization of glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) and dihydroxyacetone phosphate (DHAP) in the fifth step of the glycolytic pathway. TIM has been a widely studied protein due to its high catalytic efficiency. Interestingly, it is only active as a dimer; therefore, the use of small molecules to target its interface may induce structural modifications and alter the dimer. The TIM of *T. cruzi* (TcTIM) has four cysteine residues, and it has been established that the interface cysteine (Cys15) is important for the stability of the dimer. This residue has been shown to react with sulfhydryl reagents, which inactivate the enzyme. Dimethyl fumarate (DMF) is an immunomodulatory drug used in patients with multiple sclerosis (MS) and psoriasis. The reaction of

fumarate with cysteine residues in proteins is termed succination, creating the product S-(2-succino)-cysteine (2SC). For these reasons, in this work we studied the effect that DMF has on the activity of TcTIM. We also tested its effect on four mutants of the cysteine residues of TcTIM (TcTIMC15A, TcTIMC40A, TcTIMC118A and TcTIMC127A) and also with human wild type (WT) TIM. The activity of WT TcTIM was inhibited by DMF, no inhibitory effect was observed with mutant TcTIMC15A or human TIM, but the other three mutants of TcTIM did lose activity. We speculate that the mechanism of inhibition involves mainly the succination of Cys15, which may induce structural modifications and the inactivation of the whole enzyme.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad causada por un parásito protozoario llamado *Trypanosoma cruzi*. Chagas es una enfermedad que se presenta principalmente en América Latina, con mayor incidencia en zonas tropicales y en poblaciones de bajos recursos. Esta enfermedad se transmite a los seres humanos a través de un insecto triatomino, también conocido como chinche besucona, que es portador del parásito y al alimentarse de la sangre de mamíferos se introduce por medio de una picadura en la piel (OMS, 2019).

El insecto se encuentra en grietas y llanuras de viviendas rurales y suele alimentarse por la noche, generando una picadura en el humano y defecando cerca de esta. Los desechos entran en contacto con la picadura o cualquier otra área del cuerpo expuesta como los ojos, boca u otras lesiones. De esta forma, el parásito entra al torrente sanguíneo del humano y comienza su reproducción (OMS, 2019).

La enfermedad de Chagas consiste en tres etapas. La primera etapa es la fase aguda que comienza después de haber sido infectado el hospedero, donde el parásito se encuentra únicamente en el torrente sanguíneo. Esta etapa dura un par de meses y pueden presentarse síntomas poco específicos como fiebre, dolor de cabeza, lesiones cutáneas o hinchazón. Por esta razón, solo un 10% de los casos son detectados (García-Torres *et al.*, 2011).

Durante la segunda etapa o etapa intermedia, los parásitos se concentran en ciertos tejidos como el músculo liso, músculo cardíaco y tejido neuronal. Esta etapa puede durar entre 15 y 20 años sin ser sintomática ni presentar manifestaciones parasitarias (González-Navejas, 2016), únicamente puede detectarse mediante estudios epidemiológicos, sin embargo, el hospedero infectado representa un foco de infección.

Cuando esta etapa evoluciona a la tercera fase o etapa crónica, provoca complicaciones cardíacas, digestivas y/o neurológicas severas.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que hay alrededor de 10 millones de personas en el mundo infectadas por *T. cruzi*. En Latinoamérica, el parásito se encuentra endémicamente en 21 países y se calcula que hay alrededor de 110 millones de personas con riesgo de ser infectadas. Por desgracia, cada vez se encuentra con mayor frecuencia en Estados Unidos, Canadá y otros países de Europa y Asia como consecuencia de la globalización y gentrificación (OMS, 2019).

En México, se calcula que existen 1.1 millones de personas infectadas siendo el principal vector de transmisión el insecto hematófago *Triatoma longipennis*, sin embargo, también se puede transmitir por transfusión de sangre infectada, transmisión de madre a hijo durante el embarazo o parto, trasplantes de órganos infectados, contaminación de alimentos, entre otros (García-Torres *et al.*, 2011). Existen 130 especies distintas de triatomas y en México se encuentran 31 de estas, como se muestra en la *figura 1*. La enfermedad de Chagas se encuentra dentro de las enfermedades tropicales desatendidas, de acuerdo con la OMS, y hasta el momento no se ha desarrollado un tratamiento farmacológico eficaz para su tratamiento, por lo que el principal enfoque radica en la prevención del control vectorial y del control de transfusión (Rojo-Medina *et al.*, 2018).

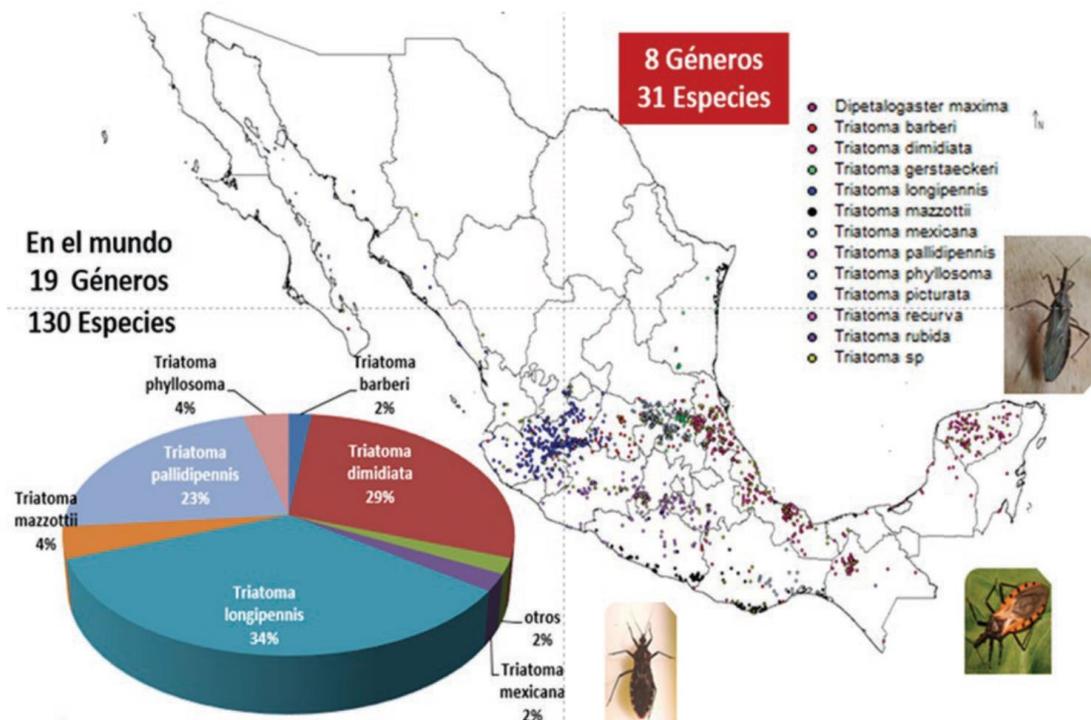


Figura 1 Distribución de triatomas en México (2015). Tomado de Rojo-Medina et al. (2018)

1.2. Parasitología

El *Trypanosoma cruzi* es un protozoario flagelado, miembro de la familia Trypanosomatidae (Orden Kinetoplastida). Este microorganismo fue descubierto por un médico brasileño llamado Carlos Chagas en 1909. Pero no fue hasta 1928, que se determinó el insecto vector y en 1940 se reportaron los primeros casos humanos en México (Rojo-Medina et al., 2018).

1.2.1. Ciclo de Vida de *Trypanosoma cruzi*

El parásito *T. cruzi* presenta un ciclo de vida complejo. Dentro del hospedero se puede encontrar en dos formas: tripomastigotes metacíclicos y amastigotes intracelulares, mientras que en el insecto se encuentra como tripomastigotes metacíclicos y epimastigotes (figura 2); (García-Torres, 2012).

Su forma infecciosa es el tripomastigote metacíclico que se localiza en la sangre. Posteriormente, dichos tripomastigotes se introducen en las células del mamífero y se convierten en amastigotes intracelulares en donde se reproducen rápidamente e infectan a otras células (Kessler *et al.*, 2017).

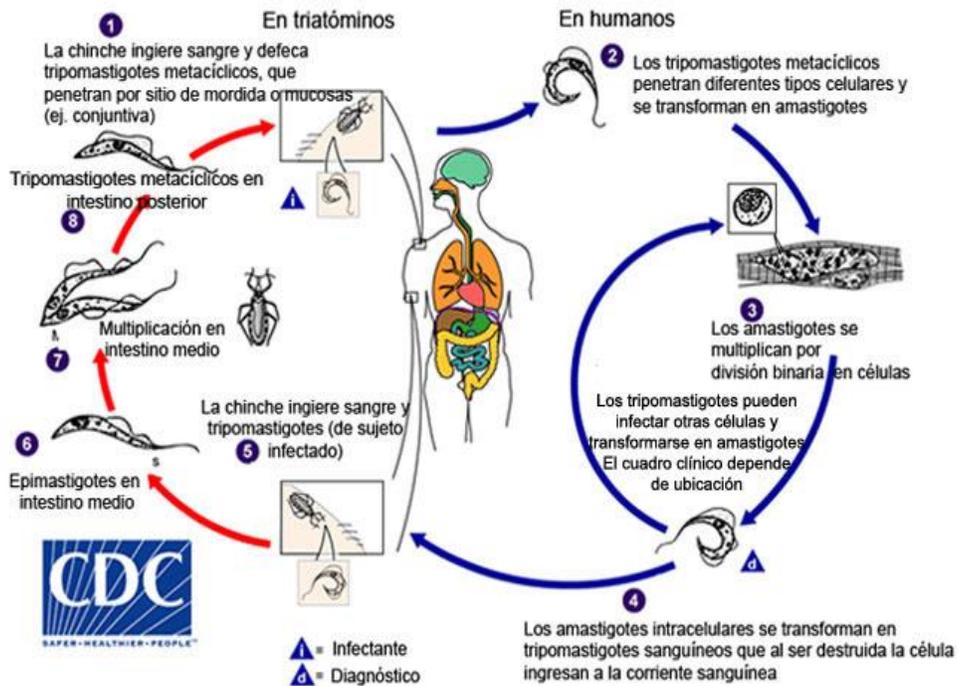


Figura 2 Ciclo de vida del parásito *Trypanosoma cruzi*. Tomado de *facmed.unam.mx*

1.2.2. Metabolismo Energético del *T. cruzi*

El estudio de las distintas etapas de desarrollo del parásito dentro del humano es de suma importancia debido a que cada etapa del ciclo presenta características fundamentales en su metabolismo energético. Esto nos ayuda a investigar un posible blanco terapéutico para el desarrollo de fármacos específicos que puedan tener una mayor eficacia para erradicar la enfermedad de Chagas. Sobre todo, es vital entender las diferencias entre el metabolismo del huésped mamífero y del parásito para el estudio de un blanco terapéutico específico.

Por otro lado, el metabolismo de *T. cruzi* es mucho más complejo que el de otros parásitos tripanosomátidos, debido a que su metabolismo energético no depende

únicamente de la glucosa, sino que también es capaz de utilizar AA, como prolina y glutamina, para producir ATP (Tielens y Van Hellemond, 2009).

Una de las principales diferencias entre el metabolismo de *T. cruzi* y del humano se encuentra en el compartimiento de las enzimas de la ruta glucolítica. En los tripanosomátidos la glucólisis se lleva a cabo en los glicosomas, donde 8 de las 10 enzimas involucradas se encuentran dentro de este organelo (García-Torres *et al.*, 2011), mientras que en el humano, la glucólisis ocurre en el citosol.

Existen otras rutas metabólicas características del *T. cruzi*, que se estudian como blancos terapéuticos, sin embargo, dentro de nuestro grupo de investigación existe un gran interés científico en estudiar la triosafofato isomerasa (TIM), una enzima involucrada en la glucólisis. Aunque en este trabajo también me referiré a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Ambas enzimas están presentes tanto en humano como el parásito, no obstante, estructuralmente presentan diferencias importantes que pueden servir para el desarrollo de fármacos específicos.

La TIM participa en el quinto paso de la glucólisis, en la interconversión de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a gliceraldehído-3-fosfato (GAP), mientras que la GAPDH se encarga del paso subsecuente, catalizando la fosforilación oxidativa del gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-difosfoglicerato (García-Torres *et al.*, 2011).

De acuerdo con los análisis de las estructuras de rayos X de las proteínas de *T. cruzi* y de humano, se han encontrado diferencias significativas en sus estructuras, lo que puede ser útil en la búsqueda de un fármaco específico (Olivares-Illana *et al.* 2017).

1.3. Tratamiento Farmacológico Actual

Los fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el Benznidazol (Bz) y Nifurtimox (Nfx), los cuales son empleados desde los años setentas y se les conoce como profármacos (Ong *et al.*, 2019).

Estos compuestos son moléculas orgánicas N-heterocíclicas (ver *figura 3*) que se consumen de manera oral, metabolizándose en el hígado donde son activados por las enzimas nitroreductasas.

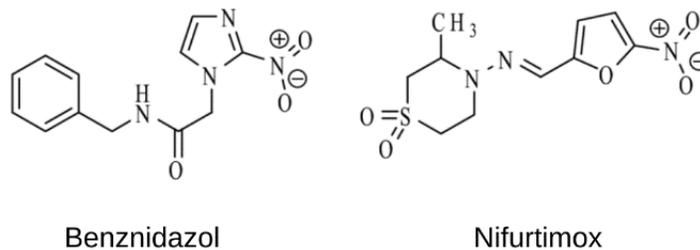


Figura 3. Estructuras químicas de los compuestos Benznidazol y Nifurtimox. Tratamiento farmacológico actual para el tratamiento de Chagas en la fase aguda. Tomado de Maya et al. (2007)

Ambos compuestos solo funcionan durante la etapa aguda de la enfermedad, sin embargo, generan diversos efectos adversos para el paciente. Algunos de los síntomas que pueden presentarse son; náuseas y vómito, migraña, depresión, vértigo, entre otros, así como posible mutagénesis (Maya *et al.*, 2007).

Por otro lado, además de tener grandes efectos secundarios en el paciente y ser útiles únicamente en la primera etapa de la enfermedad, también se ha observado que su efectividad puede depender de la cepa del parásito.

En general, el mecanismo de acción de ambos compuestos involucra la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos (*figura 4*). El grupo nitro de ambos compuestos es reducido a un grupo amino por acción de las nitroreductasas, generando diversos metabolitos y radicales libres como intermediarios y provocando una toxicidad sistémica (Wilkinson *et al.*, 2009).

El Nfx produce el radical nitro, seguido de un ciclo redox que forma otros radicales libres como el anión superóxido y radical hidroxilo, entre otros.

A diferencia del Nfx, el mecanismo de acción de Bz no depende únicamente de los radicales libres. Se han estudiado otros mecanismos como la inducción de fagocitosis, la inhibición de reductasas, síntesis de proteínas y de la cadena respiratoria (García-Torres *et al.*, 2011; Maya *et al.*, 2007).

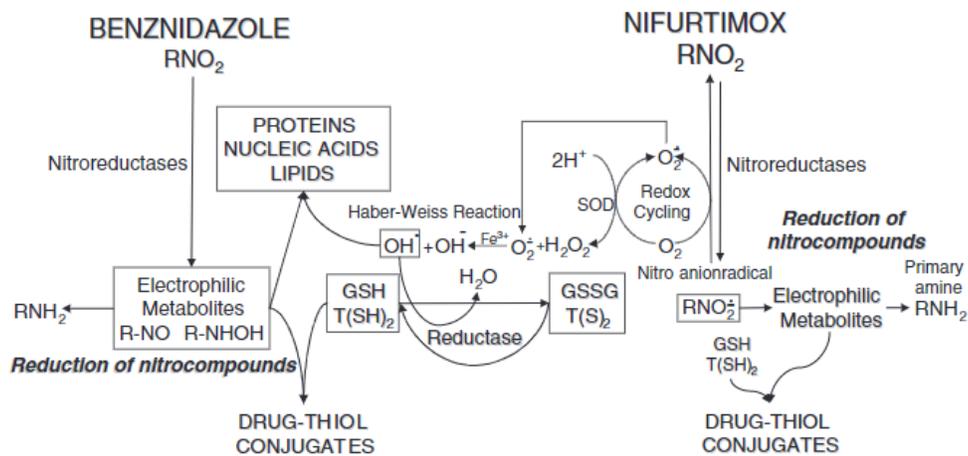


Figura 4 El papel que desempeña el glutatión y tripanotión en el metabolismo de los fármacos antichagásicos, Nifurtimox y Benznidazol, en el parásito *T. cruzi*. Tomado de Maya *et al.* (2007)

La presencia intracelular de estas moléculas provoca su reacción con lípidos, proteínas y DNA, ocasionando daños celulares irreversibles. Dado que el parásito presenta menos mecanismos de defensa frente a estas moléculas, facilita su eliminación; sin embargo, también provocan daños en células sanas del hospedero.

El desarrollo de nuevos fármacos contra Chagas es de gran importancia ya que los tratamientos necesarios para ambos compuestos son por periodos largos de tiempo (2-6 meses), varias dosis al día y constante supervisión médica (Wilkinson *et al.*, 2009).

Por lo tanto, es relevante el desarrollo de un tratamiento más eficiente y con baja (o nula) toxicidad para el paciente y que pueda usarse en cualquier etapa de la enfermedad.

La TIM se encuentra dentro del glicosoma de los tripanosomátidos, a diferencia de los mamíferos, que se encuentra en el citosol, siendo esto una de las principales diferencias para el estudio de la TIM como blanco terapéutico. La función de la TIM es catalizar la interconversión de DHAP y GAP en el quinto paso de la glucólisis (ver *figuras 5 y 6*), posibilitando la creación de 2 ATPs totales por cada molécula de glucosa que se procesa y generando dos moléculas de piruvato. Sin la TIM, el rendimiento energético de la célula y del organismo en cuestión disminuiría en un 50 por ciento ya que solo habría una molécula de piruvato por molécula de glucosa y no habría creación de ATP durante esta misma ruta metabólica. (García-Torres *et al.*, 2011).

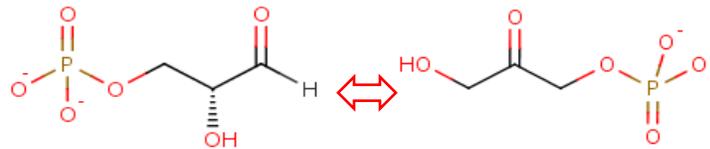


Figura 6 Estructuras químicas de los sustratos de la TIM. El de la izquierda es el D-gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y el de la derecha es dihidroxiacetona fosfato (DHAP)

La TIM es una enzima homodimérica con aproximadamente 250 AA en cada monómero, con una masa molecular de 54kDa (Juana Santiago, 2017). La TIM pertenece a la familia de las proteínas de barril (β/α) debido a que cada monómero está conformado por 8 láminas β , rodeadas por 8 hélices α , unidas entre si por asas, como se muestra en la *figura 7*.

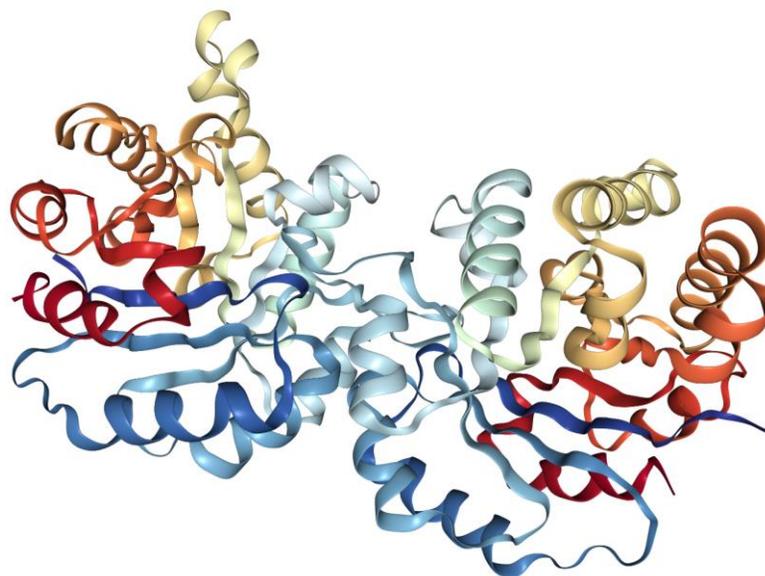


Figura 7 Estructura cristalina de la Triosafosfato Isomerasa de *Trypanosoma cruzi*. (PDB 1TCD)

Es una enzima altamente eficiente y no necesita de ningún cofactor o ion metálico para llevar a cabo su función. A pesar de que cada monómero cuenta con su sitio catalítico, la TIM solo es catalíticamente activa en su forma dimérica.

El sitio de unión entre los dos monómeros de esta proteína está constituido por 32 AA, incluyendo un residuo catalítico; la lisina 14. Sin embargo, durante una alineación de secuencias de AA de la interfase, el grupo de investigación de Olivares-Illana *et al.*, analizó 42 TIMs de especies diferentes, en la cual se mostró que la interfase entre los dos monómeros es una región de la proteína poco conservada (Olivares-Illana *et al.* 2017)

A pesar de que los residuos de AA de la interfase no son muy similares entre diferentes especies, sus sitios catalíticos sí lo son. Además, no se han encontrado diferencias significativas en sus actividades enzimáticas, hasta el momento (Olivares-Illana *et al.*, 2017; García-Torres, 2012).

Estas diferencias y similitudes entre las TIMs de tantas especies diferentes, ha llevado al desarrollo y estudio de distintos compuestos de bajo peso molecular, que logren interactuar con los AA de la interfase y evaluar el efecto que estos pueden tener en la estabilidad y la actividad de la enzima. (Olivares-Illana *et al.*, 2007).

2.1.1. Actividad Catalítica

El sitio catalítico de cada monómero de la TIM está constituido primordialmente por 3 AA que se encuentran en, o cercanos a, la interfase. Estos AA son la lisina 14 (Lys14), la histidina 96 (His96) y el ácido glutámico 168 (Glu168).

Durante el estudio del mecanismo de acción de esta enzima, se encontró que el ácido glutámico (Glu168) actúa como base catalítica para llevar a cabo la reacción de isomerización del DHAP (Wierenga *et al.*, 2010), siendo esta una catálisis ácido-base general.

La reacción inicia cuando el Glu168 sustrae el hidrógeno del C1 del DHAP por parte del carboxilato del mismo AA, generando que el carbonilo del C2 obtenga una carga negativa. El anillo de imidazol de la His96 funciona como ácido, permitiendo que se forme el intermediario *cis*-enediol (ver *figura 8*);(García-Torres, 2012). Posteriormente, el anillo de imidazol de la His96 toma el protón del alcohol del C1 y se regenera el Glu168, formando el G3P. La Lys14 se encarga de la afinidad de la enzima por el sustrato por medio de la formación de puentes de hidrógeno y ayuda al re-acomodo del protón en el paso intermedio (Samanta *et al.*, 2011).

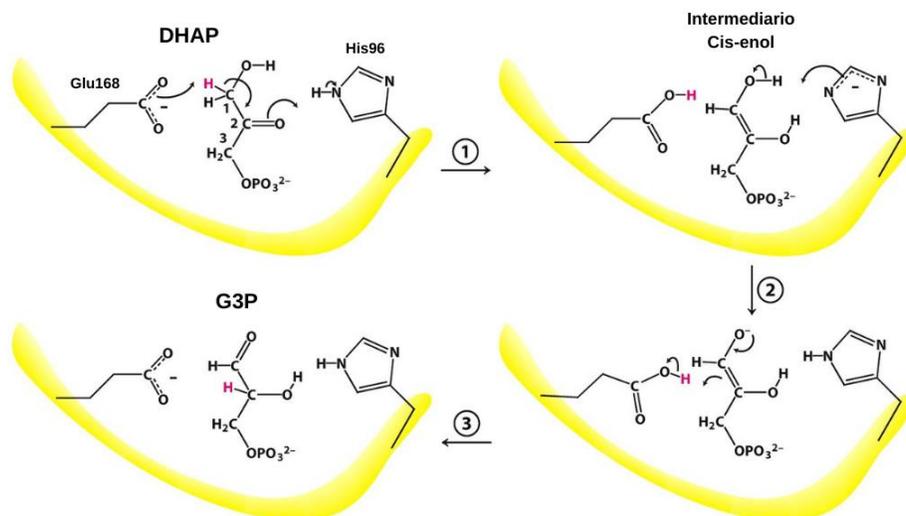


Figura 8 Mecanismo de acción catalítica de la TIM con los residuos involucrados (Lys14, His96 y Glu168 para TcTIM). Conversión de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a gliceraldehído-3-fosfato (GAP) pasando por el intermediario enol. Modificado de OregonState.edu

De acuerdo con diversos análisis estructurales y funcionales de la TIM, se ha encontrado que la interfase y su estructura dimérica tienen como función evitar la eliminación de fosfatos de la molécula DHAP por medio de la formación de puentes de hidrógeno con los AA del sitio activo de la proteína (Wierenga *et al.*, 2010).

En la interfase de la TIM se encuentra la cisteína 15 (C15) que ha sido estudiada por su proximidad al sitio catalítico. Este AA, llamado AA de interfase, se encuentra en la hélice 1 en la posición 15 rodeado por el asa 3, la cual se ha estudiado extensamente debido a que contiene a la mayoría de los AA de la interfase e interactúan con el sitio activo de la otra subunidad, proporcionándole a la enzima su forma homodimérica (Pérez-Montfort *et al.*, 1999). Por otro lado, en estudios cristalográficos de TbTIM se ha encontrado que la C15 (C14 en TbTIM) interactúa con 26 átomos del monómero vecino (García-Torres, 2012).

En la búsqueda de fármacos con alta especificidad, se han realizado alineamientos de las secuencias de AA de TIMs de diversos parásitos, así como la TIM de humano (HsTIM), y se ha observado que esta no contiene la C15, mientras que las TIM de *Trypanosoma brucei* (TbTIM); *Trypanosoma cruzi* (TcTIM); *Entamoeba histolytica* (EhTIM); *Plasmodium falciparum* (PfTIM); *Giardia lamblia* (GITIM) y *Leishmania mexicana* (LmTIM), sí contienen dicho AA (Olivares-Illana *et al.*, 2017).

La TcTIM, además de tener la C15, cuenta con otras 3 cisteínas en las posiciones 40, 118 y 127. La HsTIM no presenta una cisteína en la posición 15, pero cuenta con otras cisteínas: C41, C66, C86, C126 y C217 (secuencia de HsTIM), y presenta una interfase mucho más compacta que la de TcTIM (Maldonado *et al.*, 1998). Estas diferencias estructurales pueden ser útiles en la búsqueda de compuestos específicos que interactúen únicamente con las cisteínas de interfase de la TIM del parásito, pero no con la enzima de humano.

Con base en esto, se han realizado estudios con diferentes compuestos orgánicos derivatizantes de cisteínas (como los tiolatos), cuya interacción provoca un cambio en la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína, produciendo su inactivación

o una disminución significativa en su actividad catalítica (Juana Santiago, 2017; Olivares-Illana *et al.*, 2007).

2.2. La Importancia de la Cisteína de Interfase

Aprovechando las diferencias estructurales que presentan la TcTIM y HsTIM, se han realizado diversos estudios demostrando que la C15 de TcTIM (Ostoa-Saloma *et al.* 1997) (*figura 9*) es de gran relevancia para la funcionalidad de la enzima en el parásito, ya que le proporciona características estructurales al dímero para que realice su actividad biológica (Reyes-Vivas *et al.*, 2001).

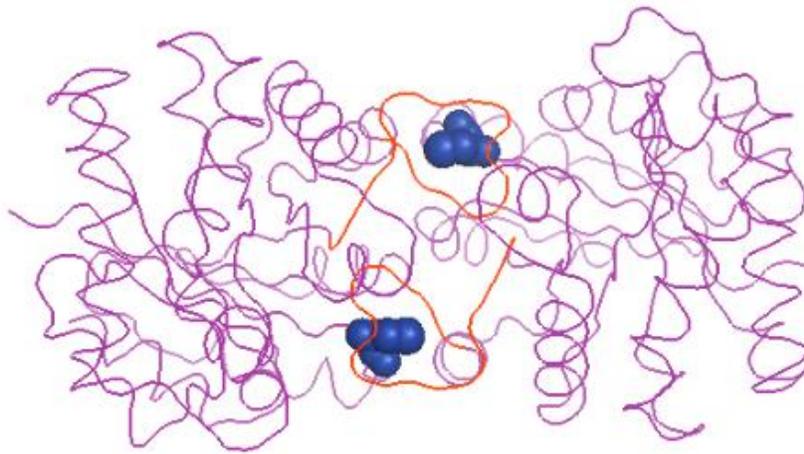


Figura 9 Estructura cristalina de TbTIM (PDB 5TIM) resaltando la cisteína de interfase rodeada por el asa 3 de la otra subunidad.

Se han encontrado compuestos que reaccionan con este AA y logran perturbar la estructura dimérica de la proteína y disminuir su actividad o inactivar por completo a la enzima, lo que provocaría que el parásito no pudiera llevar a cabo eficientemente sus rutas metabólicas (Olivares-Illana *et al.*, 2007; Pérez-Montfort *et al.*, 1999). En estos estudios, se han analizado los compuestos tiolados (derivatizantes de sulfhidrilos) que reaccionan de manera irreversible con las cisteínas de la enzima, particularmente, la cisteína de interfase.

Algunos de los compuestos probados que reaccionan con las cisteínas de TcTIM de manera selectiva han sido la 2,2'-ditiodianilina (DTDA); (Olivares-Illana *et al.*, 2007), el metilmetano tiosulfonato (MMTS); (Pérez-Montfort *et al.*, 1999; Díaz-

Mazariegos *et al.*, 2018) y el 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoato) (DTNB); (García-Torres, 2012); (tabla 1).

Tabla 1 Compuestos inhibidores de TcTIM y su IC50

Compuesto	IC ₅₀ (μM)	Referencia
3-(2-benzotiazolil tio)- propanosulfónico	35	Téllez-Valencia <i>et al.</i> , 2004
1,9-di(furan-2-il) nona-1,3,6,8-tetraen-5-ona	3	Aguilera <i>et al.</i> , 2016
3-(furan-2-il)aliliden ciclohexanona	0.086	Aguilera <i>et al.</i> , 2016
7,8-diclorofenazin-2-ol	26	Álvarez <i>et al.</i> , 2010
2,2'-ditiodianilina (DTDA)	0.26	Olivares-Illana V., et al., 2007

También, se ha visto que estos compuestos reaccionan de manera distinta con la TcTIM y la TbTIM, a pesar de ser enzimas con un 73% de identidad en su secuencia de AA, siendo mucho más susceptible la TcTIM que la TbTIM a estos reactivos (Díaz-Mazariegos *et al.*, 2018).

2.3. Dimetil Fumarato

El dimetil fumarato (DMF) es un éster del ácido fumárico, un metabolito generado durante la respiración celular en el ciclo de Krebs a partir de succinato con la enzima succinato deshidrogenasa y después convirtiéndose en malato por medio de la enzima fumarasa. El DMF se utiliza actualmente como tratamiento para algunas enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple y psoriasis (Fox *et al.*, 2014).

La psoriasis es una enfermedad crónica en la cual las células de la piel se reproducen a mayor velocidad y el sistema inmune reacciona o “ataca” a las células sanas de la piel (Clínica Mayo, 2020), generando diversos efectos en el paciente.

La esclerosis múltiple es una enfermedad crónica neurodegenerativa en la que las células de sistema nervioso central se ven afectadas por la falta de producción de mielina debido a que el sistema inmune reacciona con ellas, impidiendo el paso de los impulsos nerviosos y provocando una deterioración irreversible de los nervios

de sistema nervioso central (Clínica Mayo, 2020). Ambas enfermedades se caracterizan por altos índices de inflamación crónica y sistémica.

Desde 1990 se comenzó a utilizar una mezcla de dimetil fumarato y otros fumaratos (conocida como Fumaderm®) como tratamiento para la psoriasis. Durante las pruebas clínicas notaron que también mejoraba los síntomas de pacientes que padecían esclerosis múltiple (EM). En 2013, la FDA (E.U.A. *Food and Drug Administration*) aprobó el DMF como un fármaco para el tratamiento de la esclerosis múltiple remitente y resistente (EMRR); (Blewett *et al.*, 2016). Actualmente, el dimetil fumarato, también conocido como BG-12, se vende bajo el nombre de Tecfidera® y su tratamiento consiste en una dosis oral de 240 mg de DMF dos veces al día, para tratar los síntomas de EMRR (Mills *et al.*, 2018).

En varios grupos de investigación se ha analizado el efecto del DMF sobre diversas enzimas que contienen cisteínas catalíticas para entender el mecanismo de acción y los efectos del fármaco. Algunas de las proteínas estudiadas han sido: la enzima GAPDH, el glutatión (GSH), el factor de transcripción nuclear (Nrf2), y adiponectinas, entre otras (Angiari y O'Neill, 2018; Blatnik *et al.*, 2008; Fox *et al.*, 2014; Kornberg *et al.*, 2018; Schmidt *et al.*, 2007).

La reacción que ocurre entre el fumarato generado durante el ciclo de Krebs y ciertas proteínas con residuos catalíticos de cisteína se denomina succinación. Durante la reacción se genera el producto S-(2-succinil)cisteína (2SC), el puede formarse endógenamente. Esto se ha visto en pacientes con diabetes, donde el 2SC se encuentra presente en sangre debido a una desregularización en la glucólisis por medio de la succinación de la enzima GAPDH con el metabolito fumarato (Lin *et al.*, 2012; Manuel y Frizzell, 2013).

Dada su estructura química, el DMF actúa como un electrófilo sobre los residuos de cisteínas. El grupo tiol de las cisteínas de las proteínas se adiciona nucleofílicamente al carbono número 2 del derivado de fumarato, por medio de una adición de Michael, formando un enlace tioéter covalente entre el DMF y el

azufre de la cisteína. Como producto final, se genera el producto 2SC (ver *figura 10*). De esta forma, ocurre una succinación de la cisteína en cuestión que finalmente modifica la estructura de la proteína y sus capacidades.

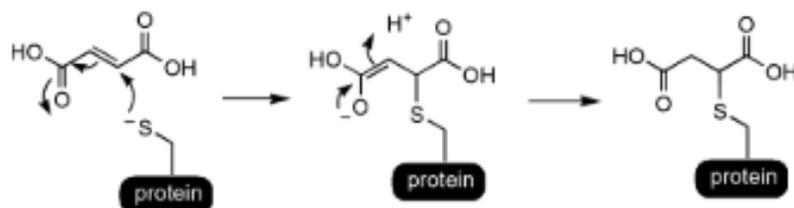


Figura 10 Mecanismo de succinación (o adición de Michael) que ocurre endógenamente en el metabolismo energético humano con el fumarato producido durante el Ciclo de Krebs y los residuos de cisteína de ciertas proteínas. El mecanismo es una adición nucleofílica de la cisteína al fumarato, generando el producto S-(2-succinil)cisteína o 2SC. Tomado de Lin et al. (2012).

A pesar de los ensayos clínicos, el metabolismo del fármaco no es totalmente conocido, sin embargo, se ha visto que genera efectos antiinflamatorios y antioxidantes, mediante la regulación negativa de la producción de citocinas proinflamatorias en distintos tipos de células del sistema inmune.

Por otro lado, también parece activar la vía de transcripción del factor nuclear derivado de eritroide 2-similar-2 acoplado a la proteína Kelch-similar-ECH asociada 1 (Nrf2-Keap1), un complejo proteico regulador de la inducción de genes citoprotectores que ayudan al manejo de agentes oxidantes y reactivos electrofílicos presentes en el medio (Mills *et al.*, 2018; Xidativo y Fainstein, 2007).

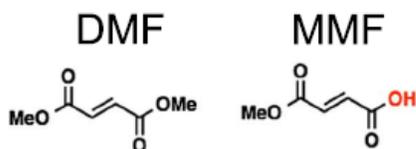


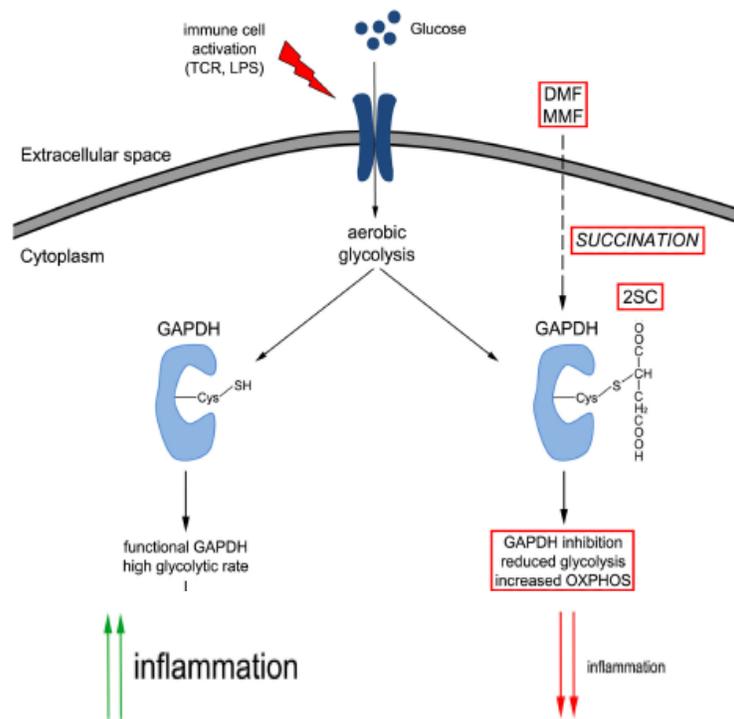
Figura 11 Derivados estructurales del fumarato. 1) dimetil fumarato, 2) monometil fumarato. Tomado de Blewett et al. (2016).

Una de las enzimas con mayor interés de estudio es la GAPDH dado que presenta un mayor número de cisteínas en su estructura. También se ha visto que la incubación de esta enzima con DMF y monometil fumarato (MMF) (*figura 11*) en células mieloides y linfocitos, produce su inactivación *in vivo* e *in vitro*, tanto en humanos, como en ratones (Kornberg *et al.*, 2018). La inhibición de GAPDH a través de la succinación de su cisteína catalítica (Cis152 en humano) en las células

del sistema inmune evita la producción de citocinas proinflamatorias, así como otras vías de regulación, como se muestra en la *figura 12*.

Con base en la relevancia que presentan las cisteínas, en especial la cisteína de interfase, para la estructura de la TcTIM y su actividad catalítica, se propuso analizar el efecto que podría tener el dimetil fumarato sobre las cisteínas de esta proteína. Debido al comportamiento que presenta el DMF sobre las cisteínas de otras proteínas a través de la formación del producto 2SC, se pensó que podría actuar de igual manera sobre las cisteínas de TcTIM y generar un efecto inhibitorio, principalmente por modificación de la C15. Además, el DMF tiene la ventaja de ser un fármaco ya establecido para el tratamiento de la esclerosis múltiple y psoriasis, lo cual podría facilitar su uso como fármaco contra la enfermedad de Chagas.

Figura 12 Esquema del mecanismo de regulación inflamatoria por medio de la inhibición de la enzima glucolítica GAPDH con el DMF y MMF. Tomado de Angiari y O'Neil (2018).



3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Generales

Analizar el efecto del compuesto orgánico dimetil fumarato (DMF) sobre la actividad catalítica de la enzima glucolítica triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi in vitro*, así como determinar la posible cisteína involucrada en el proceso de inhibición de la actividad catalítica.

3.2. Objetivos Particulares

- Sobreexpresar la TcTIM silvestre en un sistema bacteriano de *Escherichia coli* (E.coli)
- Purificar la proteína TcTIM WT y sus respectivas mutantes; TcTIMC15A, TcTIMC40A, TcTIMC118A y TcTIMC127A por medio de cromatografía de afinidad
- Determinar la IC₅₀ del DMF con TcTIM silvestre y mutantes.
- Evaluar el efecto de inhibición del DMF sobre las enzimas mutantes
- Evaluar el efecto de inhibición del DMF sobre HsTIM
- Proponer un posible mecanismo de inhibición con la(s) cisteína(s) involucrada(s)

3. MÉTODOS Y MATERIALES

Con el fin de encontrar la(s) posible(s) cisteína(s) involucrada(s) en el proceso de inactivación de la enzima con el DMF, se sobreexpresaron y purificaron las enzimas de TcTIM silvestre y sus respectivas mutantes de cisteínas; TcTIMC15A, TcTIMC40A, TcTIMC118A y TcTIMC127A para llevar a cabo los ensayos de cinética enzimática. La posición de los AA en estas proteínas está basada en la numeración de la secuencia de la TcTIM.

La construcción de las mutantes de TcTIM ya se había realizado previamente, todas las enzimas se encontraban en el plásmido de sobreexpresión pET3a con una bandera de histidinas y sitio de reconocimiento para enterocinasa (rTEV). La única excepción fue la mutante TcTIMC15A, que no contenía las etiquetas de histidina ni sitios de reconocimiento para rTEV, pero si contaba con sitio de restricción Nde1-BamH.

Como parte de este trabajo experimental, únicamente se purificaron los plásmidos, se transformaron las células de *E. coli* BL21DE3 con el plásmido y se sobreexpresaron y purificaron las proteínas con las columnas correspondientes para cada una, como se describe a continuación.

4.1. Extracción del DNA Plasmídico

El protocolo que se siguió para la extracción del DNA plasmídico fue el de *Wizzard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*.

Se comenzó inoculando un cultivo de *E.coli* en medio Luria-Bertani (LB) con Ampicilina (100 µL/mL). Las bacterias contenían el plásmido pET3a con el gen de interés (TcTIM WT o el gen correspondiente de las mutantes de cisteína). Posteriormente, se incubaron las células a 37 °C por 16 h. Una vez crecidas las células, se centrifugó el cultivo líquido a 4346 x g por 15 min a 4°C.

Al terminar la centrifugación se decantó el medio de cultivo LB y se resuspendió el botón celular con 250 µL del amortiguador de resuspensión (50 mM Tris-HCl pH

7.5 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNasa A) contenido en el Kit Wizzard®. Al tener una mezcla homogénea del botón con el amortiguador, se pasó la solución a un microtubo, en dónde se agregaron 250 µL del amortiguador de lisis (0.2 M NaOH, 1% SDS), mezclando suavemente. Se dejó en reposo 5 min mientras ocurría la ruptura celular y se obtenía una solución viscosa. Posteriormente, para detener la ruptura celular, se agregaron 350 µL del amortiguador neutralizador (4.09 M clorhidrato de guanidina, 0.759 M acetato de potasio, 2.12 M ácido acético glacial, pH 4.2 final) y se centrifugó la muestra por 10 min a 23897 x g a 25 °C. Al terminar la centrifugación, se tomó el sobrenadante con el plásmido y se colocó en una microcolumna (Wizzard®). Se realizaron 2 lavados, por separado, con 400 µL cada uno, con el amortiguador PE (60% etanol, 60 mM acetato de potasio, 8.3 mM Tris-HCl, 0.04 mM EDTA) y cada lavado se centrifugó por 1 min a 23897 x g a 25 °C.

Para la recuperación del plásmido que contenía los genes, se eluyó con H₂O destilada, desionizada (dH₂O) y previamente calentada a 37 °C. Se utilizaron 45 µL de dH₂O y se dejaron adsorbiéndose a la columna por 5-10 min. Posteriormente, se centrifugó por 2 min a 23897 x g a 25 °C, para la recuperación de DNA. Por último, se cuantificó el DNA extraído a 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop® para su posterior transformación en *E.coli*.

4.2. Transformación en *E.coli* BL21 DE3 con DNA Plasmídico

Se tomaron alrededor de 100 ng de DNA plasmídico y se colocaron en microtubo con 65 µL de células *E.coli* BL21 (DE3) pLysS competentes en un medio estéril, y se dejó reposando en hielo por 15 min. Posteriormente, se realizó un choque térmico en el ThermoMixer C (previamente equilibrado a 42 °C) por 40 s y, al terminar, se traspasó inmediatamente a hielo para la introducción del plásmido a las células. Se agregaron 200 µL de medio de cultivo rico en nutrientes (SOB) previamente atemperado a 37 °C. Una vez mezcladas las células con el medio de nutrientes, se incubó el cultivo a 37 °C en incubadora NEW BRUNSWICK SC G-25 con agitación de 230 rpm durante 1 h.

Al terminar la incubación se plaquearon las células en una caja Petri con LB, agar y antibiótico (100 µg/mL de Ampicilina) y también se preparó un pre-cultivo líquido con LB y Ampicilina. Ambos fueron incubados a 37 °C, por 16 h.

4.3. Protocolo de Sobreexpresión de TcTIMs

Para la sobreexpresión de las proteínas, se preparó un medio de cultivo LB Broth Miller® a una concentración de 25 g/L con dH₂O en un matraz Erlenmeyer de 2 L de capacidad. Se esterilizaron en la autoclave HIRAYAMA a 121°C, 20 min y se dejaron enfriar a 25°C. Posteriormente, se agregaron 100 µL/L de Ampicilina en medio estéril. A continuación, se agregaron 5 mL del pre-cultivo líquido y se midió su absorbancia a 600 nm hasta llegar a 0.1 de absorbancia.

Se incubaron a 37 °C con 250 rpm por 4 h aproximadamente hasta obtener una absorbancia de 0.8-1.2. Al terminar, se atemperaron los cultivos a 30 °C para llevar a cabo la inducción con isopropil-β-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM. Se dejaron induciendo por aproximadamente 16 h, a 30 °C, con agitación constante de 250 rpm en la incubadora.

Pasado el tiempo de inducción, las células se centrifugaron a 1,062 x g por 20 minutos, a 4 °C. El sobrenadante se decantó, se recolectó el botón y se congeló a -72 °C, para la posterior extracción de la proteína.

4.4. Purificación de Proteínas

En la purificación de las enzimas TcTIM silvestre y mutantes se utilizó el equipo de cromatografía líquida rápida de proteínas *ÅKTA Purifier GE*, utilizando el software UNICORN®. Se usaron dos columnas distintas para la purificación de las proteínas recombinantes, dependiendo de la etiqueta con la que contaban los plásmidos. Una columna fue de SP-Sefarosa de flujo rápido y la otra de HisTrap™. La primera columna utilizada fue de intercambio catiónico que contenía un grupo sulfopropil (-CH₂CH₂CH₂SO₃ -Na⁺) para realizar el intercambio iónico y purificar la proteína de interés.

La segunda columna utilizada fue de afinidad química, donde la proteína de interés contiene etiquetas de histidinas y sitio de reconocimiento para rTEV, los cuales permitieron la purificación por medio de la alta afinidad que presenta los residuos de histidina por el Níquel, que forma parte de la resina de empaquetamiento. Esto utiliza la alta especificidad y se obtuvo un buen rendimiento durante la purificación.

4.4.1. Columna SP-Sefarosa

Para la purificación de la enzima mutante TcTIM C15A, se utilizó la columna de intercambio iónico. Las soluciones amortiguadoras utilizadas para este protocolo de purificación fueron; la solución "A" (MES 100 mM, EDTA 0.5 mM y DTT 1 mM) y la solución "B" (MES 100 mM, EDTA 0.5 mM, DTT 1 mM y NaCl 500 mM). Ambas a pH 6.3.

El precipitado celular obtenido anteriormente se resuspendió en el amortiguador "A" y se realizó la ruptura celular sonicando durante 8 ciclos de 40 seg con 1 min de descanso entre ciclos y en hielo para evitar el calentamiento de la muestra y la posible desnaturalización de la proteína.

El extracto total de células lisadas por sonicación, se centrifugó a 164,756 x g por 20 min, a 4 °C, en ultracentrífuga BECKMAN XL-90. Se separó el sobrenadante, sabiendo que la proteína de interés se encuentra en esta fase y se aplicó al equipo de cromatografía. Una vez introducida la muestra completa con solución "A", se comenzó a eluir la proteína de interés con un gradiente de cloruro de sodio de 0 a 500 mM durante 100 min. La proteína se detectó a partir del 20 % del amortiguador "B" hasta el 50 %, aproximadamente. Se recuperaron fracciones de 4 mL y se realizó un gel desnaturalizante de poliacrilamida PAGE-SDS al 16% para observar la pureza de las fracciones que contenían a la proteína (*figura 13*).

La TcTIM C15A se almacenó en solución amortiguadora de 100 mM de TEA y 10 mM EDTA, a pH 7.4, hasta su utilización

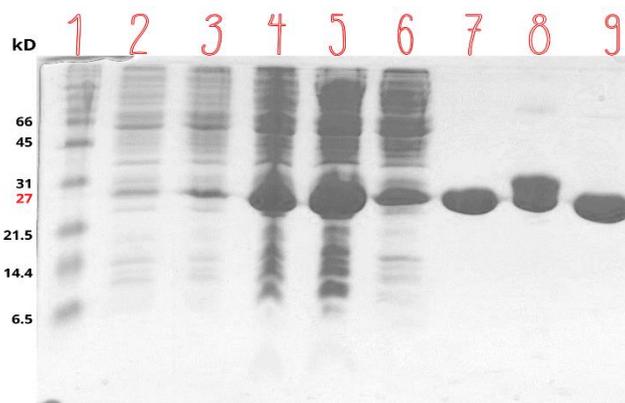


Figura 13. Electroforesis PAGE-SDS 16% para el monitoreo de la purificación de TcTIM C15A con la columna de SP-Sefarosa . 1) Estándares de masa molecular BioRad, 2) células sin inducir, 3) células inducidas, 4) extracto total de células, 5) sobrenadante, 6) lo que no se pegó en columna, 7) fracciones 13-15 8) TcTIM silvestre 9) fracciones 4-6.

4.4.2. Columna HisTrap®

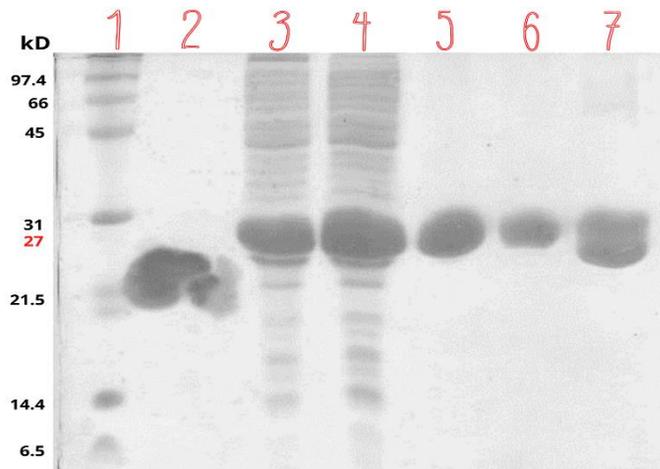
Para el tratamiento de las demás enzimas; TcTIM silvestre, TcTIMC40A, TcTIMC118A y TcTIMC127A, se utilizó la columna de HisTrap®. Las soluciones amortiguadoras fueron de fosfato de sodio e imidazol. La solución “A” contenía 50 mM de Na₂HPO₄, 300 mM NaCl y 10 mM de Imidazol a un pH de 8. La segunda solución amortiguadora, “B”, contenía 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl y 500 mM de Imidazol, también a pH 8.

Una vez introducida la muestra completa con solución “A”, se comenzó a despegar la proteína de interés con un gradiente de concentración de la solución amortiguadora “B” con mayor contenido de imidazol, durante 100 minutos. Se recuperaron fracción de 4mL al redor del 37% del lavado con la solución “B” y se realizó un gel desnaturizante de poliacrilamida PAGE-SDS 16% para confirmar la pureza de las fracciones que contenían a la proteína (*figura 14*).

Las TcTIM silvestre, TcTIMC40A, TcTIMC118A y TcTIMC127A fueron almacenadas en solución amortiguadora de 100 mM de TEA, y 10 mM EDTA a pH 7.4 y cuantificadas con un espectrofotómetro NanoDrop®

Para remover las etiquetas de histidinas, se dializaron las proteínas con una solución amortiguadora de rTEV (Tris 50 mM, EDTA 0.5 mM y DTT 1 mM pH 8) por 16 h.

Al terminar, se agregó 1 μ L de enterocinasa por cada 20 μ g de enzima purificada y se digirieron por 18 h a 30 °C. Después, se centrifugaron a 7,179 x g, por 20 min, a 4°C.



Nuevamente se introdujeron las muestras en el equipo de cromatografía líquida utilizando la solución amortiguadora de rTEV para aplicar la muestra y se recuperó la proteína sin las etiquetas de histidinas con un gradiente de concentración con la solución amortiguadora de “B” con fosfatos de 0-100%.

Las concentraciones de todas las enzimas fueron nuevamente determinadas a 280 nm con el equipo de espectrofotometría NanoDrop® con el coeficiente de extinción molar igual a 36,440 M⁻¹ cm⁻¹. Se almacenaron a 4 °C en solución amortiguadora de TE pH 7.4 durante el curso de los experimentos.

4.5. Determinación de la Actividad Enzimática de HsTIM, TcTIM Silvestre y sus Mutantes

4.5.1. Preparación y Calibración de GAP

Se pesó 1.5 g de la resina de intercambio catiónico DOWEX 50WXZ-100 en un matraz Erlenmeyer. Por otro lado, en un vaso de precipitados se colocaron 400 mL de agua destilada y se llevaron a ebullición.

Se agregaron 10 mL del agua hervida (por cada 1.5 g de resina) al matraz Erlenmeyer, se agitó en un vortex por un minuto y se dejó reposando por dos minutos hasta que se asentara la resina. Se decantó el líquido con una coloración naranja que desprendió la resina. Este procedimiento se repitió 5 veces más, hasta que la resina dejó de soltar coloración y se dejó secar.

Por otro lado, se pesaron 170 mg del gliceraldehído-3-fosfato (GAP) de *Sigma Aldrich*® que se agregaron al matraz con la resina lavada y seca. Para mezclar y disolver el GAP, se sumergió el matraz en el vaso de precipitados con el agua caliente y se agregaron 4 mL de la misma agua para disolverlo junto con la resina. La solución homogénea se filtró al vacío con una membrana de 0.22 μm y se ajustó el pH a 4.5 con Na_2HCO_3 . Se cuantificó por medio de una calibración espectrofotométrica y se almacenaron a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ en alícuotas de 800 μL .

Para determinar la concentración del GAP se preparó una dilución 1:10 de las alícuotas anteriores, con su respectiva concentración. Se prepararon dos mezclas de reacción con el GAP diluido: una a la mitad de la concentración que la otra. La mezcla de reacción final contenía TE, α -GDH, NADH y el GAP a las dos concentraciones distintas. Se midió su absorbancia a 340 nm y posteriormente, se agregaron 2 μL de la enzima TcTIM a 15 mg/mL. Por medio de la técnica de espectrofotometría, se observó un cambio en la absorbancia de la mezcla y usando las diferentes concentraciones se determinó su concentración final para los futuros ensayos.

4.5.2. Determinación de la Actividad Específica de TIMs

La actividad enzimática de la TIM se midió a través de la técnica de espectrofotometría, por medio de una reacción acoplada. Esta reacción consiste en la conversión de GAP a DHAP por la TIM, seguido de la conversión de DHAP a glicerol-3-fosfato donde se utiliza la enzima acoplante α -glicerolfosfato deshidrogenasa (α -GDH) y NADH (ver *figura 15*). Durante la reacción, el NADH se va oxidando a NAD⁺ y su absorbancia disminuye. La concentración de NADH fue monitoreada por la técnica espectroscópica a una longitud de onda de 340 nm, utilizando el software *Kinetics Application*[®].

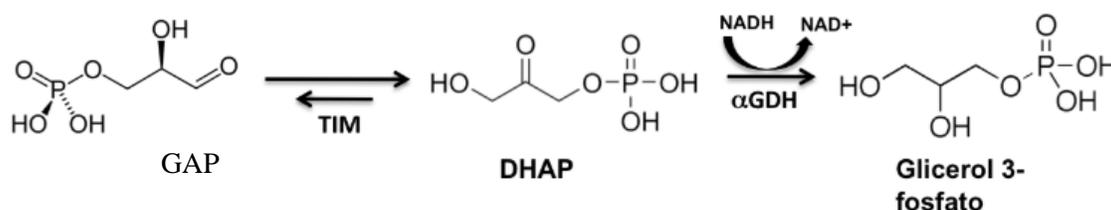


Figura 15 Reacción acoplada para determinar la actividad enzimática de las TIMs in vitro. Tomado de García (2012).

La reacción se llevó a cabo a 25 °C, en el equipo *Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis* con celdas desechables de 12.5 x 12.5 x 45 mm, utilizando una mezcla de reacción con TEA 100 mM pH 7.4, EDTA 10 mM, GAP 1 mM, NADH 0.2 mM y α -GDH 20 μ g/mL y DMSO al 10%. La reacción comenzó con la adición de la enzima TIM a la mezcla de reacción a una concentración final de 5 ng/mL.

Por medio de ajustes por regresión lineal de las pendientes de absorbancia, que refleja el consumo de NADH conforme avanza la reacción, se obtiene la actividad de la enzima con la ecuación 1.

$$V = \frac{mAbs}{\epsilon*[E]} \quad \text{Ecuación 1}$$

V= velocidad de consumo del sustrato (μ mol/min/mg)

mAbs= pendiente del consumo de NADH

ϵ =coeficiente de extinción molar del NADH (6220/M*cm)

[E]= concentración de la enzima (mg/mL)

4.6. Protocolo de Ensayos de Inhibición del DMF sobre la Actividad Enzimática de TcTIM y Mutantes

Para determinar el porcentaje de inhibición que provoca el DMF sobre la enzima TcTIM silvestre se prepararon 8 diluciones con diferentes concentraciones de DMF en amortiguador de TEA pH 7.4. Se agregó 1 μL de TcTIM, a 5 mg/mL en cada microtubo con la mezcla correspondiente (ver *tabla 2*). Se prepararon duplicados de cada concentración y se incubaron todos los tubos a 37 °C, por dos horas. Estos experimentos se realizaron por triplicado.

Tabla 2 Protocolo para medir la actividad residual de TIMs con DMF a partir de una solución stock de DMF de 50 mM.

Tubo	[DMF] (μM)	Vol. DMF (μL)	DMSO (μL)	TEA (μL)	TIM (mg/mL)
Control	-----	-----	100	899	5
1	250	5	95	899	5
2	500	10	90	899	5
3	750	15	85	899	5
4	1000	20	80	899	5
5	1500	30	70	899	5
6	2000	40	60	899	5
7	2500	50	50	899	5

Al terminar las dos horas de incubación, se adicionó 1 μL de cada microtubo con la solución de la enzima incubada a las diferentes concentraciones de DMF en cada celda con la mezcla de reacción (TEA 100 mM pH 7.4, EDTA 10 mM, GAP 1 mM, NADH 0.2 mM y α -GDH 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), midiendo la absorbancia. De esta forma, se obtuvo la actividad residual de la enzima a 5 ng/mL. El 100% de la actividad enzimática correspondió a la actividad de TcTIM después de las 2 h de incubación del control sin DMF.

Con el programa *Kinetics Application*[®] se determinó el porcentaje de actividad residual a partir de la pendiente de la pérdida de actividad enzimática y con las diferentes concentraciones de DMF se realizaron las gráficas del porcentaje de actividad residual TIM vs. concentración de DMF (μM).

De igual manera, este protocolo se utilizó para la determinación de la actividad de las proteínas mutantes de TcTIM; TcTIMC15A, TcTIMC40A, TcTIMC118A, TcTIMC127A, así como la actividad de HsTIM.

4.7. Determinación de la IC_{50} de TcTIM Silvestre y Mutantes con DMF

Para la determinación de la concentración de DMF que inhibía el 50% de actividad de la TcTIM silvestre, se realizó una curva con las diferentes concentraciones del compuesto (*tabla 2*) y la inhibición generada a cada concentración (ecuación 2).

$$\text{Ecuación 2: } \textit{Inhibición} = 100 - \% \textit{Actividad residual}$$

Para obtener la curva logarítmica y poder determinar la IC_{50} , se utilizó el programa *Prism*[®] seleccionando la opción de dosis-respuesta y graficando $\log([\text{DMF}])$ contra el porcentaje de inhibición de la enzima, con la opción de pendiente variable con 4 parámetros.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Actividad Específica de las TIMs

Tabla 3 Actividad específica de las enzimas antes y después de las 2 h de incubación a 37 °C. Se muestra el porcentaje de pérdida de actividad con ese tiempo de incubación.

Enzima	Actividad Específica t=0 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	Actividad Específica t=2 h ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	Pérdida de Actividad (%)
TcTIM silvestre	3694.94	2550.72	36.4
HsTIM	4980.65	4826.48	3.1
TcTIM C15A	3668.39	1685.76	54.0
TcTIM C40A	2264.62	1369.95	39.5
TcTIM C118A	2772.27	1752.44	36.8
TcTIM C127A	2261.70	1057.12	53.3

En la *tabla 3* se muestran las actividades específicas de las enzimas, antes y después de la incubación, las cuales sufrieron una pérdida de actividad inicial al terminar las 2 h de incubación. La HsTIM fue la que sufrió una menor pérdida de actividad durante la incubación, siendo la más estable de todas. La TcTIM silvestre perdió un 36% de su actividad, al igual que la mutante TcTIM C118A. Estos resultados, concuerdan con los reportados en la literatura (García-Torres, 2012).

5.2. Efecto del DMF sobre la Actividad Catalítica de TcTIM Silvestre y HsTIM.

El efecto que provoca el dimetil fumarato sobre el decaimiento en la actividad enzimática de TcTIM silvestre se determinó de acuerdo con el protocolo antes descrito (*tabla 2*).

En la *figura 16*, se muestra la gráfica en la que se puede observar el efecto del DMF sobre la actividad catalítica de la TcTIM silvestre. La gráfica describe el porcentaje

de la actividad residual en función de la concentración del DMF. Ahí podemos ver como la actividad catalítica de la TcTIM silvestre disminuyó de manera dependiente de la concentración del compuesto, aunque la curva no es una curva de inhibición clásica.

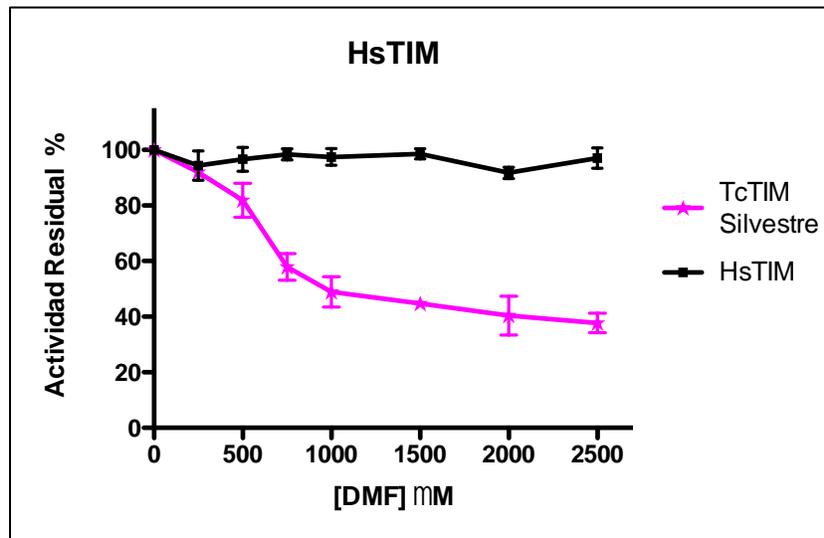


Figura 16 Gráfica del efecto que genera el DMF sobre la actividad enzimática de la HsTIM a diferentes concentraciones del compuesto y su comparación con la actividad residual de la TcTIM silvestre

La inhibición es la diferencia entre el 100% de actividad y la actividad residual (%) medida, por lo que podemos decir que el compuesto comenzó a inhibir la actividad enzimática a partir de 500 μM y no mostró mayor inhibición con concentraciones mayores a 1000 μM . Nunca se logró un 100% de inhibición (ó 0% de actividad) en ese rango de concentraciones y fueron necesarias las dos horas de incubación para poder observar este efecto inhibitorio. Por otro lado, en la *tabla 3* podemos ver como la actividad de la enzima silvestre disminuyó un 36% con 2 h de incubación a 37 °C.

Con la gráfica anterior se obtuvieron los datos para la determinación de la concentración media de inhibición de la enzima silvestre con el compuesto, mostrada en la *figura 17*. La IC_{50} obtenida fue de 630.2 μM , lo que nos puede indicar que la sensibilidad de esta enzima ante este compuesto es relativamente

baja, comparada con otros compuestos derivatizantes de cisteínas que inhiben a concentraciones aún más bajas (ver *tabla 1*); (Olivares-Illana *et al.*, 2007; Pérez-Montfort *et al.*, 1999; Reyes-Vivas *et al.*, 2001). Por otro lado, una de las grandes ventajas del DMF es que ya es un fármaco aprobado por la FDA como tratamiento para la EMRR (Fox *et al.* 2014; Mills *et al.* 2018) y que ha demostrado resultados favorables para esta misma enfermedad, sin mayores efectos citotóxicos reportados hasta el momento.

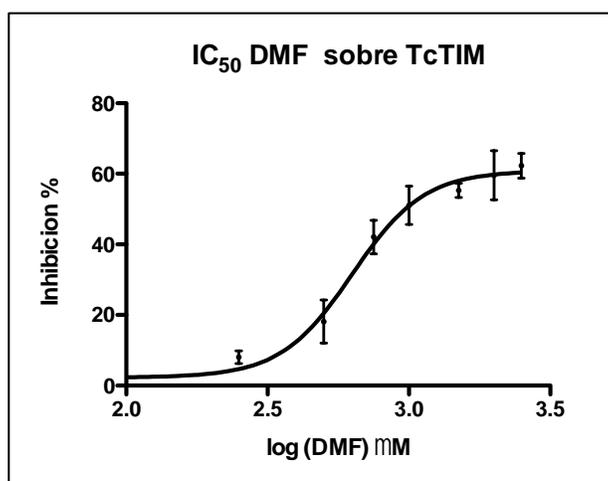


Figura 17. Gráfica de la determinación de la IC₅₀ del DMF con la enzima silvestre TcTIM. La IC₅₀ es de 630.2 μ M. Para su determinación se utilizó el programa GraphPad Prism con la opción de dosis-respuesta con pendiente variable de 4 parámetros.

Una vez establecida la efectividad del DMF sobre la enzima nativa, se realizó el estudio sobre la HsTIM para determinar si el compuesto era específico para la enzima de *T. cruzi*. Nuevamente, se realizaron los ensayos de incubación y la medición de la actividad residual de la HsTIM con el DMF. La *figura 16* muestra el comportamiento de la HsTIM en comparación con la TcTIM silvestre. En esta gráfica podemos ver como la HsTIM no presentó un efecto inhibitorio ante el DMF, es decir, no se vio afectada su actividad en el rango de concentración probado.

Esta información resultó relevante debido a que una de las características más importantes en la búsqueda de fármacos para la enfermedad de Chagas es que sea un compuesto selectivo. En esta gráfica (*figura 16*) podemos ver que el DMF sí muestra dicha selectividad por la enzima del parásito *T. cruzi*, lo que nos llevó a

pertenecen al mismo grupo de acuerdo con sus características fisicoquímicas (misma carga o mismo grado de hidrofobicidad). Una sustitución no conservativa se refiere a cuando dos AA no comparten las mismas características, pero pueden pertenecer al mismo grupo. Los colores indican lo siguiente: rojo AA pequeños y/o hidrofóbicos; azul AA ácidos; rosa AA básicos y verde AA con grupos hidroxilo, amino, o sulfhidrido.

5.3. Efecto del DMF sobre la Actividad Catalítica de las Mutantes de TcTIM

Como vimos anteriormente, sí se observó una inhibición específica de la actividad de la TcTIM silvestre por el DMF, sin embargo, el mecanismo de acción de este compuesto aún no estaba completamente definido, por lo que se realizaron los experimentos con las mutantes de TcTIM en sus respectivas cisteínas, TcTIMC127A, TcTIMC118A, TcTIMC40A y TcTIMC15A.

De acuerdo con diversos análisis con 42 especies y 200 estructuras tridimensionales de TIMs reportadas en *Protein Data Bank* (Olivares-Illana *et al.*, 2017) hasta la fecha, se ha encontrado que la cisteína 127 es un residuo muy conservado en todas estas proteínas analizadas (Samanta *et al.*, 2011).

Como podemos ver en la *figura 19*, la mutante C127A presentó una menor actividad residual en presencia del DMF en comparación con la enzima silvestre. Su actividad comenzó a decaer hasta el 50% desde la concentración más baja de 250 μM , logrando casi un 0% de actividad con 750 μM .

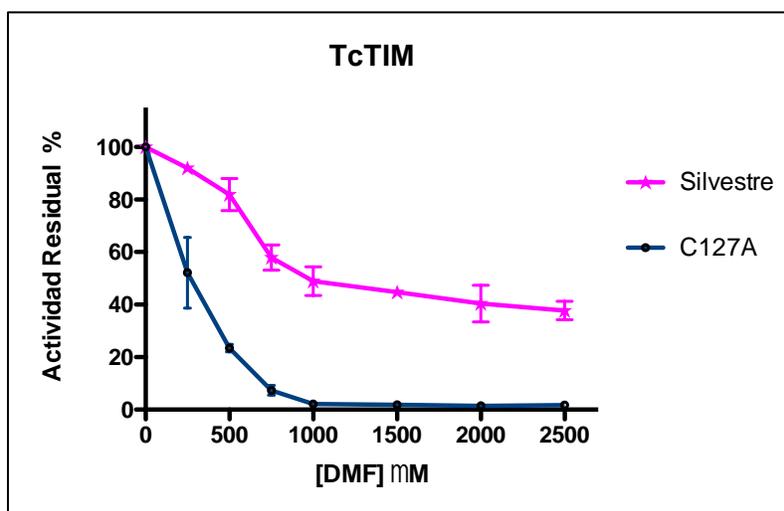


Figura 19 Gráfica de la actividad residual de la mutante TcTIMC127A después de la incubación de 2 h con el DMF a diferentes concentraciones y su comparación con la enzima nativa.

Se ha visto que la relevancia de la C127 puede deberse a su cercanía a los AA catalíticos: His96, Lys14 y Glu168 (*tabla 5*). A pesar de esa cercanía, no parece participar en la reacción catalítica, sin embargo, sí juega un papel significativo en la estabilidad del dímero por medio de las interacciones que tiene con otros residuos conservados del otro monómero (Samanta *et al.*, 2011).

Este experimento nos confirmó la importancia de la C127 para la actividad enzimática de la TcTIM y su estabilidad estructural. Cabe mencionar que la enzima mutante TcTIMC127A perdió alrededor del 53% de su actividad durante la incubación a 37 °C, como se muestra en la *tabla 3*, lo que pudo haber contribuido al decaimiento tan pronunciado que presentó esta mutante en presencia del DMF

Podemos suponer que una de las razones por las cuales decae tanto la actividad enzimática de la enzima mutante de C127A, es debida al cambio estructural generado con la sustitución de cisteína por alanina en esta posición es lo que logra la disminución tan drástica en la actividad catalítica de esta enzima.

Por otra parte, como ya se mencionó, la HsTIM sí cuenta con la C127, pero esto no parece afectar su actividad enzimática al interactuar con el DMF, por lo que puede ser que esta cisteína no sea succinada en la TcTIM silvestre, y por lo tanto, no forme parte del mecanismo de inhibición de la misma.

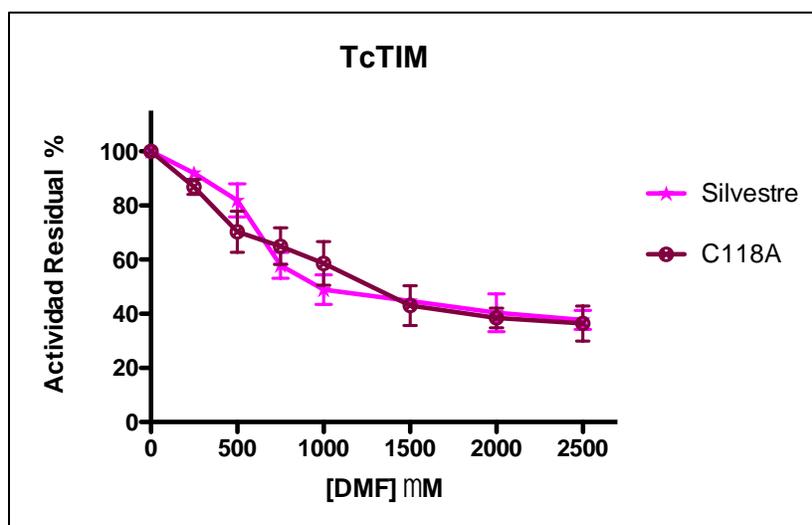


Figura 20 Gráfica de la actividad residual de la mutante TcTIMC118A después la incubación de 2 h con el DMF a diferentes concentraciones y su comparación con la enzima nativa

En la *figura 20* podemos ver la actividad residual que mostró la mutante TcTIMC118A, donde la TcTIM silvestre y esta mutante se comportaron de la misma forma bajo el efecto del DMF. Esto sugiere que, probablemente, no sea una cisteína muy relevante para la estructura y estabilidad de la enzima, ya que su intercambio por alanina no logró que la enzima se comportara de forma distinta a la enzima nativa. De igual manera, su actividad residual decayó en función de la concentración del DMF de forma muy gradual, logrando casi un máximo de inhibición a partir de 1500 μM y al aumentar la concentración de DMF hasta 2500 μM , no se observaron mayores cambios en su actividad catalítica.

En otros estudios realizados con TcTIM y TbTIM y agentes derivatizantes de cisteínas (Olivares-Illana et al. 2007; Pérez-Montfort et al. 1999), tampoco se observaron efectos en la inhibición de TcTIM silvestre y con una mutación C118V ni hubo efecto en la actividad de TbTIM al cambiar la valina 118 por cisteína. Esto apoya la idea antes mencionada.

El comportamiento de la mutante TcTIMC118A y la enzima silvestre también es muy similar en su actividad específica durante la incubación, en donde ambas perdieron un 36% de su actividad catalítica. Esto también puede sugerir que este residuo tiene poca relevancia para la actividad y estructura de la enzima silvestre.

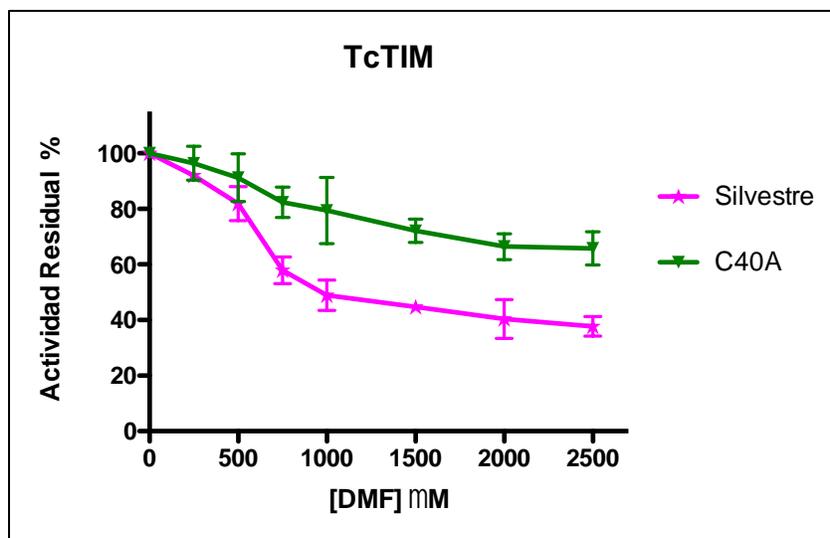


Figura 21 Gráfica de la actividad residual de la mutante TcTIM C40A después de la incubación de 2 h con DMF a diferentes concentraciones y su comparación con la enzima nativa.

La mutante TcTIMC40A presentó una mayor actividad catalítica residual que la TcTIM silvestre, donde el compuesto logró una menor inhibición en esta enzima mutante que en la enzima nativa, como se observa en la *figura 21*. La C40 es otra cisteína cercana al sitio catalítico (ver *tabla 5* y *figura 23*), pero no forma parte de los AA de interfase, a diferencia de la C15. Al intercambiarse esta cisteína, pudo haberse generado un cambio en la conformación y/o interacciones del sitio catalítico. Con estos cambios, pudo haberse afectado la unión del sustrato al sitio activo, ya que la actividad específica después de la incubación inicial ya había disminuído 40%. La sustitución de esta cisteína logró que el compuesto inhibiera menos a la mutante que a la TcTIM silvestre, lo que puede sugerir que este residuo está involucrado en el mecanismo de inhibición por DMF en la TcTIM silvestre.

Por último, en la *figura 22* se muestra el comportamiento que tuvo la TcTIM con la mutación de C15A en presencia del DMF. Aquí podemos observar que la enzima mutante mantuvo su actividad sin importar la presencia del compuesto en ninguna de sus concentraciones analizadas. Este comportamiento fue muy similar al de la HsTIM, que también carece de la cisteína 15, a pesar de que esta mutante pierde un 50% de su actividad específica al incubarla (ver *tabla 3*).

Esto nos indicó que para que el DMF logre tener un efecto inhibitorio en la enzima silvestre, la cisteína 15 juega un papel fundamental. Estos resultados coinciden con lo que se ha visto en otros estudios publicados usando las enzimas de TbTIM y TcTIM con compuestos derivatizantes de la cisteína 15 (Maldonado *et al.*, 1998; Pérez-Montfort *et al.*, 1999; Díaz-Mazariegos *et al.*, 2018).

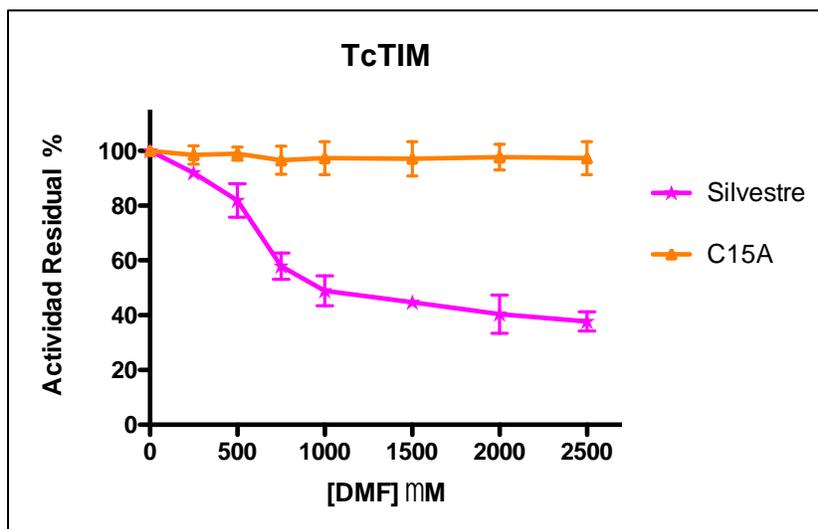


Figura 22 Gráfica de la actividad residual de la mutante TcTIM C15A después de la incubación de 2 h con el DMF a diferentes concentraciones y su comparación con la enzima nativa. Aquí vemos que esta mutante no fue inhibida por el compuesto en ninguna concentración analizada.

Para recapitular los resultados de todos los experimentos, en la *tabla 4* se muestra la IC_{50} de la TcTIM silvestre y las mutantes TcTIMC127A, TcTIMC118A y TcTIMC40 con el fin de observar el efecto que el DMF provocó en cada una de las enzimas.

En esta misma tabla, podemos identificar que la enzima que menos concentración de DMF necesitó para observar el mismo efecto fue la mutante TcTIMC127A. Dado que la C127 es importante para la estabilidad de la enzima silvestre, su intercambio por alanina provocó una disminución en su actividad específica y, por lo tanto, una menor cantidad de compuesto fue requerida para inhibirla.

Posiblemente, las interacciones que mantiene esta cisteína con otros AA y el sitio catalítico en la enzima nativa, previene la entrada a agentes externos (como el

DMF) a la interfase, evitando así su perturbación y cambios conformacionales. Pero más estudios se requieren para confirmar esto.

Por otro lado, la enzima que mayor cantidad de DMF necesitó para lograr el mismo efecto fue la mutante TcTIMC40A, haciendo notar que la C40 puede estar involucrada en el mecanismo de inhibición que genera el DMF en la enzima silvestre, sin ser el residuo más relevante.

La IC₅₀ de la mutante TcTIMC15A y de HsTIM no fue determinada debido a que no mostraron inhibición frente al compuesto y la pendiente de su actividad residual es prácticamente cero.

Tabla 4 Comparación de las IC₅₀ de la TcTIM silvestre, TcTIM C127A, TcTIM C118A y TcTIM C40A.

Enzima	IC₅₀ (μM)
TcTIM silvestre	630.2
TcTIMC127A	266.3
TcTIMC118A	653.5
TcTIMC40A	946.6
TcTIMC15A	ND
HsTIM	ND

Con base en los resultados presentados se puede pensar que el mecanismo de inhibición del DMF no está determinado únicamente por una cisteína, sino que, posiblemente, participan principalmente C15 y la C40 en conjunto, ya que son las únicas dos enzimas que presentaron menor inhibición que la enzima silvestre, y su comportamiento fue similar a la HsTIM, mientras que las otras mutantes (C118A y C127A) perdieron actividad actividad sin la presencia de estos residuos.

Tabla 5 Distancia de las cisteínas de TcTIM silvestre al AA catalítico del mismo monómero, empezando por el más cercano hasta el más lejano. Calculado con PyMOL (PDB 1TCD)

Residuo de cisteína de TcTIM silvestre	Distancia (Å) al residuo catalítico lisina 14
15	5.4
127	13.0
40	16.9
118	23.1

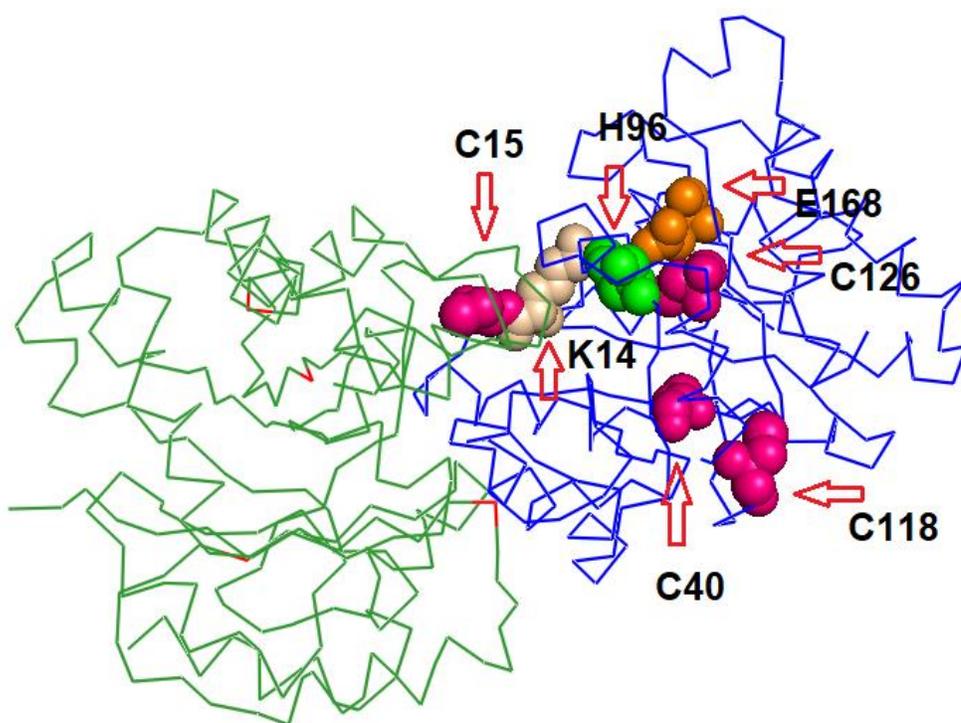


Figura 23 Estructura cristalina de TcTIM silvestre (PDB 1TCD) con las cisteínas de un monómero resaltadas en rosa y los AA que participan en la reacción de catálisis. Aquí se observa mejor la ubicación de cada residuo y su cercanía al sitio catalítico. En la Tabla 6 se pueden ver las distancias de las cisteínas (rosas) de un monómero a la lisina 14 (K14) del mismo monómero.

La C15 se encuentra a lado del AA catalítico Lys14 (ver *tabla 5 y figura 23*), así como en la interfase, generando interacciones con átomos de la otra subunidad, por lo cual, su presencia es crítica para la función y su ataque por parte del DMF. Por otro lado, la C40 también está cercana al sitio catalítico y su perturbación también genera cambios en éste. La C118 es la cisteína más lejana al sitio catalítico, pudiendo ser esta la razón por la cual no afectó mucho la actividad de la mutante TcTIMC118A frente al DMF.

Al observar la *tabla 6* podemos ver que ninguna cisteína está realmente expuesta al disolvente, por lo que podemos decir que este no es un factor determinante en el comportamiento del DMF con la enzima.

Por lo mismo, es posible que deba ocurrir un cambio conformacional en la proteína para permitir la difusión del compuesto dentro de la estructura de la enzima y de esta forma el DMF pueda reaccionar con la cisteína de interfase y la C40, como se ha mostrado en ocasiones anteriores frente a compuestos derivatizantes de la cisteína de interfase (Pérez-Montfort *et al.*, 1999 ; Reyes-Vivas *et al.* 2001).

La falta de exposición de las cisteínas al disolvente podría ser una adaptación evolutiva para evitar que otros compuestos perturben su la estructura, preservando su forma dimérica y, por lo tanto, su actividad.

Tabla 6 Relación total de área/energía de superficie de los residuos de cisteínas de TcTIM silvestre (PDB 1TCD) expuestos al solvente (agua) con un radio de prueba de 1.4 Å. Calculado con GETAREA (sin unidades)

Residuo de Cisteína	Cociente Área/energía del residuo expuesto al solvente
15	0.00
40	0.00
118	3.62
127	0.09

Lo cierto es que, para poder determinar el mecanismo de reacción del DMF con la TcTIM silvestre, otros estudios son necesarios. Por ahora, podemos indicar que dicho mecanismo si parece involucrar a la cisteína de interfase y posiblemente a la C40 también, mientras que los otros residuos de cisteína no parecen estar involucrados directamente.

5.4. Otros Experimentos

5.4.1. Derivados del Fumarato: MMF y Sal Na₂F

Durante el trabajo de investigación también se realizaron otros ensayos de inhibición con el monometil fumarato (MMF) y fumarato de sodio (Na₂F) con la enzima de TcTIM silvestre con el fin de determinar las diferentes reactividades de los derivados del fumarato, sin embargo, con ninguno se observó una inhibición en la enzima TcTIM silvestre a las concentraciones analizadas (*tabla 7*).

Tabla 6 Concentraciones de prueba de MMF y Na₂F sobre TcTIM silvestre. Ninguna mostró efectos inhibitorios.

Enzima	MMF	Na ₂ F
TcTIM silvestre	500 µM	250 y 500 µM

En otros estudios se ha observado que el MMF tiene una cinética más lenta que el DMF (Kornberg *et al.*, 2018; Schmidt *et al.*, 2007), tanto *in vivo* (*linfocitos T de ratón*) como *in vitro*. Por otro lado, el DMF es más electrófilo que el MMF y que el fumarato (DMF>MMF>F²⁻); (Blatnik *et al.*, 2008; Blewett *et al.*, 2016), lo que podría explicar porque reaccionó mejor el DMF con la TcTIM. Además, el MMF parece depender más del pKa de la cisteínas que el DMF (Lin *et al.*, 2012; Blewett *et al.*, 2016), explicando las distintas reactividades entre los compuestos.

5.4.2. DMF y Otras TIMs de Parásitos

Una vez establecida la acción del DMF sobre la TcTIM silvestre, se probó el compuesto con otras enzimas TIM de diversos parásitos para ver si el compuesto podía inhibirlas de igual o mejor manera, debido a que también contienen a la

cisteína de interfase, C15. Las TIMs que se probaron fueron de *Entamoeba histolítica* (Eh), *Plasmodium falciparum* (Pf), *Leishmania mexicana* (Lm), *Trypanosoma brucei* (Tb) y *Giardia lamblia* (Gl). Con ninguna de estas enzimas se observó una inhibición considerable del DMF a las concentraciones evaluadas (tabla 8).

Tabla 7 Concentraciones analizadas del DMF con las distintas TIMs. No se observaron efectos inhibitorios con dos horas de incubación a 37°C.

Enzima	DMF(μM)	Inhibición %
TbTIM	250, 500, 1000, 3000 μM	< 10%
EhTIM	500 μM	No presentó
PfTIM	500 μM	No presentó
LmTIM	500 μM	No presentó
GITIM	500 μM	No presentó

Como ya se ha visto en otros estudios (Díaz-Mazariegos *et al.*, 2018; Olivares-Illana *et al.*, 2007; Reyes-Vivas *et al.*, 2001), la TcTIM y la TbTIM se comportan distinto con los compuestos derivatizantes de cisteínas. La TcTIM ha mostrado ser aproximadamente 100 veces más reactiva frente al MMTS que la TbTIM (Garza-Ramos *et al.* 1998). A pesar de que todas estas proteínas cuentan con la C15, se ha estudiado que la flexibilidad de estas proteínas y el comportamiento de su interfase es distinto. Por otro lado, también se ha visto que el pKa de las cisteínas afecta la reactividad frente a los compuestos sulfhidrilos, lo que podría explicar la falta de efectividad del DMF para inactivar a la TbTIM. El pKa de la C15 de TcTIM es de 9.27, mientras que para la C14 de TbTIM es de 10.53 (Díaz-Mazariegos *et al.*, 2018).

6. CONCLUSIONES

Por medio de los estudios de inhibición de la TcTIM frente al fármaco DMF se obtuvo una IC_{50} de 630.2 μ M y se demostró que el compuesto es especie-selectivo al no alterar significativamente la actividad de la TIM de humano.

Por medio de la enzima TcTIM mutada en sus 4 cisteínas se logró identificar a las principales cisteínas involucradas en el proceso de inhibición del DMF, siendo la C15 la más relevante, seguido de la C40. Por otro lado, la C118 y C127 no parecen ser residuos por el cual el DMF logra inhibir la actividad de la TcTIM, ya que las sustituciones por alanina mostraron mayor inhibición que la enzima silvestre, mostrando ser esenciales para la estabilidad de la enzima, pero aparentemente no para la inhibición del compuesto, lo cual concuerda con otros estudios realizados con agentes derivatizantes de cisteínas.

Existe la ventaja de que el DMF ya es un tratamiento establecido para tratar los síntomas de la EMRR y la psoriasis, por lo que este compuesto puede servir como un posible tratamiento contra la enfermedad de Chagas. Sin embargo, aún se necesita investigar con mayor detalle los efectos de este fármaco en la parasitosis y el mecanismo por el cual actúa.

7. PERSPECTIVAS

Como trabajo a futuro se propone evaluar el efecto de este fármaco en las enzimas mutantes con dos cisteínas conservadas y dos cisteínas mutadas. Con esto se podría comprobar la acción de las cisteínas en pares y así, observar cuales actúan con mayor efectividad juntas. Para eso es necesario realizar el trabajo de mutagénesis de la proteína silvestre, su sobreexpresión en el sistema bacteriano de *E.coli* y la purificación correspondiente.

Por otro lado, también es importante realizar las pruebas de inhibición en el sistema biológico del parásito *T.cruzi* (en sus distintas etapas de vida) y determinar *in vivo* la concentración a la cual inhibe a la mitad de la población (DL_{50}). Posiblemente, vía la inhibición de la triosafosfato isomerasa o de alguna otra enzima que contenga cisteínas, como GAPDH o GSH.

Poder dar una conclusión más asertiva al respecto, se propone, en un futuro, realizar ensayos con concentraciones más altas, dado que, como ya se mencionó, este compuesto no tuvo efectos inhibitorios sobre las TIMs de los otros parásitos, en las concentraciones evaluadas. También se propone realizar una comparación de las diferencias estructurales que presentan las TIMs de los distintos parásitos, así como de sus características fisicoquímicas, además de que sería relevante realizar el estudio de pKa de las cisteínas de LmTIM y GITIM para explicar sus comportamientos.

8. REFERENCIAS

- Aguilera, E; Varela, J; Birriel, E; Serna, E; Torres, S; Yaluff, G; Vera de Bilbao, B; Aguirre-López, B; Cabrera, N; Díaz Mazariegos, S; Tuena de Gómez-Puyou, M; Gómez-Puyou, A; Pérez-Montfort, R; Minini, L; Merlino, A; Cerecetto, H; González, M; Alvarez, G. (2016) "Potent and selective inhibitors of *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase with concomitant inhibition of cruzipain: inhibition of parasite growth through multitarget activity." *ChemMedChem*. 11: 1328–1338.
- Álvarez, G; Aguirre-López, B; Varela, J; Cabrera, M; Merlino, A; López, G; Lavaggi, ML; Porcal, W; Di Maio, R; González, M; Cerecetto, H; Cabrera, N; Pérez-Montfort, R; Tuena De Gómez-Puyou, M; Gómez-Puyou, A. (2010) "Massive screening yields novel and selective *Trypanosoma cruzi* Triosephosphate Isomerase dimer-interface-irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity." *European Journal of Medicinal Chemistry*. 45(12):5767–5772.
- Angiari, S; O'Neill, LA. (2018) "Dimethyl Fumarate: targeting glycolysis to treat MS." *Cell Research*. 28(6):613–615.
- Blatnik, M; Thorpe, SR; Baynes, JW. (2008) "Succination of proteins by fumarate: mechanism of inactivation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase in diabetes." *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1126: 272–275.
- Blewett, MM; Xie, J; Zaro, BW; Backus, KM; Altman, A; Teijaro, JR; Cravatt, BF. (2016) "Chemical proteomic map of dimethyl fumarate-sensitive cysteines in primary human T Cells." *Science Signaling*. 9(445):1–11.
- Díaz-Mazariegos, S; Cabrera, N; Perez-Montfort, R. (2018) "Three unrelated and unexpected amino acids determine the susceptibility of the interface cysteine to a sulfhydryl reagent in the Triosephosphate Isomerases of two trypanosomes." *PLoS ONE*. 13(1):1–14.

- Fox, RJ; Kita, M; Cohan, SL; Jung Henson, L; Zambrano, J; Scannevin, RH; O'Gorman, J; Novas, M; Dawson, KT; Phillips, JT. (2014) "BG-12 (Dimethyl Fumarate): A review of mechanism of action, efficacy and safety." *Current Medical Research and Opinion*. 30(2):251–262.
- García-Torres, I. (2012) "Quimeras de la Triosafosfato Isomerasa: transformación progresiva de la Triosafosfato Isomerasa de *Trypanosoma cruzi* en la Triosafosfato Isomerasa de *Trypanosoma brucei*." Tesis de Grado (Ciencias Bioquímicas). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- García-Torres, I; Pérez-Montfort, R. (2011) "Avances en la identificación de blancos terapéuticos y el diseño racional de fármacos contra la enfermedad de Chagas." *Revista de Educación Bioquímica*. 30(2):68–81.
- Garza-Ramos G, Cabrera N, Saavedra-Lira E, Tuena de Gomez-Puyou M, Ostoa-Saloma P, Perez- Montfort R. (1998) "Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity: trio- sephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi*, and *Leishmania mexicana*". *Eur J Biochem* 253(3): 684–691.
- González Navejas, AJ. (2016) "Estudio calorimétrico de las Interacciones entre las proteínas Triosa Fosfato Isomerasa de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y dos de sus quimeras con liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina." Tesis Licenciatura (Químico). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Juana Santiago, A. (2017) "Expresión, purificación y caracterización de la enzima recombinante Triosa Fosfato Isomerasa C232A del parásito intracelular *Encephalitozoon intestinalis*." Tesis Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Kessler, RL; Contreras, VT; Newmar Pinto Marlière, Guarneri, AA; Villamizar-Silva, LH; Camacho, JA; Batista, M; Soccol, VT; Krieger, MA; Macagnan Probst, C. (2017) "Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are

- infective to the mammalian host." *Molecular Microbiology*. 104(5):712–736.
- Kornberg, MD; Bhargava, P; Kim, PM; Putluri, V; Snowman, A; Putluri, N; Calabresi, PA; Snyder, SH. (2018) "Dimethyl Fumarate targets GAPDH and aerobic glycolysis to modulate immunity." *Nature*. 453(4):449–453.
- Lin, H; Su, X; He, B. (2012) "Protein lysine acylation and cysteine succination by intermediates of energy metabolism." *ACS Chemical Biology*. 7(6):947–960.
- Maldonado, E; Soriano-García, M; Moreno, A; Cabrera, N; Garza-Ramos, G; Gómez-Puyou, MT; Gómez-Puyou, A; Perez-Montfort, R. (1998) "Differences in the intersubunit contacts in Triosephosphate Isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes." *Journal of Molecular Biology*. 283(1):193–203.
- Manuel, AM; Frizzell, N. (2013) "Adipocyte protein modification by Krebs Cycle intermediates and fumarate ester-derived succination." *Amino Acids*. 45(5):1243–1247.
- Maya, JD; Cassels, BK; Iturriaga-Vásquez, P; Ferreira, J; Faúndez, M; Galanti, N; Ferreira, A; Morello, A. (2007) "Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma Cruzi* and their interaction with the mammalian host." *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 146(4):601–620.
- Mills, E; Ogrodnik, MA; Plave, A; Mao-Draayer, Y. (2018) "Emerging understanding of the mechanism of action for dimethyl fumarate in the treatment of multiple sclerosis." *Frontiers in Neurology* 9(1):1–8.
- Olivares-Illana, V; Riveros-Rosas, H; Cabrera, N; Gómez-Puyou, MT; Pérez-Montfort, R; Costas, M; Gómez-Puyou, A. (2017) "A guide to the effects of a large portion of the residues of Triosephosphate Isomerase on catalysis, stability, druggability, and human disease." *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 85(7):1190–1211.
- Olivares-Illana, V; Rodríguez-Romero, A; Becker, I; Berzunza, M; García, J;

- Pérez-Montfort, R; Cabrera, N; López-Calahorra, F; Gómez-Puyou, MT; Gómez-Puyou, A. (2007) "Perturbation of the dimer interface of Triosephosphate Isomerase and its effect on *Trypanosoma Cruzi*." *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 1(1): 1-8.
- Ong, YC; Roy, S; Andrews, PC; Gasser, G. (2019) "Metal compounds against neglected tropical diseases." *Chemical Reviews*. 119(2):730–796.
- Ostoa-Saloma P, Garza-Ramos G, Ramirez J, Becker I, Berzunza M, Landa A, et al. (1997) "Cloning, expression and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*". *Eur J Biochem* 244 (3): 700–705.
- Pérez-Montfort, R; Garza-Ramos, G; Hernández Alcántara, G; Reyes-Vivas, H; Gong Gao, X; Maldonado, E; Gómez-Puyou, MT; Gómez-Puyou, A. (1999) "Derivatization of the interface cysteine of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface." *Biochemistry*. 38(13):4114–4120.
- Reyes-Vivas, H; Hernández-Alcantara, G; López-Velazquez, G; Cabrera, N; Pérez-Montfort, R; Gómez-Puyou, MT; Gómez-Puyou, A. (2001). "Factors that control the reactivity of the interface cysteine of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*." *Biochemistry*. 40(10):3134–3140.
- Rodríguez-Almazán, C; Arreola, R; Rodríguez-Larrea, D; Aguirre-López, B; Gómez-Puyou, MT; Pérez-Montfort, R; Costas, M; Gómez-Puyou, A; Torres-Larios, A. (2008) "Structural basis of human Triosephosphate Isomerase deficiency: mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface." *Journal of Biological Chemistry*. 283(34):23254–23263.
- Rojo-Medina, J; Ruiz-Matus, C; Salazar-Schettino, PM; González-Roldán, JF. (2018). "Enfermedad de Chagas en México." *Gaceta Médica de México*. 154:605-612

- Samanta, M; Banerjee, M; Murthy, MRN; Balaram, H; Balaram, P. (2011) "Probing the role of the fully conserved Cys126 in Triosephosphate Isomerase by site-specific mutagenesis - distal effects on dimer stability." *FEBS Journal*. 278(11):1932–1943.
- Schmidt, TJ; Ak, M; Mrowietz, U. (2007) "Reactivity of Dimethyl Fumarate and methylhydrogen fumarate towards glutathione and N-acetyl-L-cysteine-preparation of S-substituted thiosuccinic acid esters." *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 15(1):333–342.
- Télliez-Valencia, A; Olivares-Illana, V; Hernández-Santoyo, A; Pérez-Montfort, R; Costas, M; Rodríguez-Romero, A; López-Calahorra, F; De Gómez-Puyou, MT; y Gómez-Puyou, A. (2004) "Inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface." *Journal of Molecular Biology*. 341(5):1355–1365.
- Tielens, Aloysius G. M. and Jaap J. van Hellemond.(2009). "Surprising variety in energy metabolism within trypanosomatidae." *Trends in Parasitology*. 25(10):482–490.
- Wierenga, RK; Kapetaniou, EG; Venkatesan, R. (2010) "Triosephosphate Isomerase: a highly evolved biocatalyst." *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67(23):3961–3982.
- Wilkinson, SR; Kelly, JM.(2009) "Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets." *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 11(11):1–24.
- Xidativo, O; Königsberg-Fainstein, M. (2007) "Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo." *Revista de Educación Bioquímica*. 26(1):18–25.
- Clínica Mayo. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/psoriasis/symptoms-causes/syc-20355840>. Consultado en febrero 2020.

Clínica Mayo. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/multiple-sclerosis/symptoms-causes/syc-20350269>. Consultado en febrero 2020.

Organización Mundial de la Salud. Disponible en : [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Consultado en noviembre 2019.