

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
LABORATORIO DE ENZIMOLOGÍA DE PARÁSITOS

**Ubicación subcelular de la proteína PER-ARNT-SIM-  
Fosfoglicerato Quinasa-like (PAS-PGK-like) en epimastigotes  
de *Trypanosoma cruzi***

Trabajo especial de grado presentado por  
**Br. Andrea Valentina Delgado Villalobo**  
Como requisito parcial para optar al título de  
**Licenciado en Biología**  
**Tutor:** Dr. Wilfredo Quiñones

Mérida, Marzo 2020

*Para Fabiana,  
A quien amo infinitamente.*

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## AGRADECIMIENTOS

El mayor agradecimiento va expresado a mi tutor, el Dr. Wilfredo Quiñones, por ser mi guía principal en la ejecución de este proyecto y darme la oportunidad de hacer parte del Laboratorio de Enzimología de Parásitos (LEP). Asimismo, manifiesto mi inmensa gratitud a los profesores Héctor Acosta, Ana Cáceres, Amaranta Gómez y Rocío Rondón; quienes hicieron parte de jurado evaluador, contribuyendo con oportunas correcciones, en la elaboración del presente manuscrito y en el diseño experimental.

Gracias al personal del LEP por su valiosa ayuda durante el desarrollo de los procedimientos experimentales; especialmente a Betty Hernández y Silverio Díaz por su colaboración en el cultivo de los parásitos. Deseo agradecer enormemente a mis compañeros de laboratorio, quienes siempre me prestaron su apoyo y la ayuda precisa, en el momento oportuno; sobre todo a Ender Quintero, por su enseñanza con respecto a la elaboración de los inmunoensayos, así como también, por su colaboración y guía en los procedimientos de centrifugación diferencial y tratamiento con digitonina, junto con Andrés León. De igual manera, agradezco a Mairenis Hernández, quien me instruyó en la manipulación y conteo de los parásitos para las curvas de crecimiento.

## RESUMEN

Fosfoglicerato Quinasa (PGK) es una enzima que cataliza la transferencia del grupo fosfato desde 1,3-bifosfoglicerato al complejo ADP-Mg, generando 3-fosfoglicerato y ATP-Mg; la primera fosforilación a nivel de sustrato de la vía glucolítica. Recientemente se identificó en *Trypanosoma cruzi* un gen que codifica para una proteína PGK putativa que correspondería a la cuarta isoenzima en dicho organismo, la cual posee un dominio PAS; por lo que se denominó PAS-PGK-like. Dado que los dominios PAS se encuentran relacionados con la detección de variables fisicoquímicas a nivel celular, la proteína PAS-PGK-like podría tener gran importancia en el proceso de adaptación metabólica del parásito a los distintos ambientes en los cuales se desarrolla su ciclo de vida. Por lo tanto, como un acercamiento al rol fisiológico que cumple la proteína PAS-PGK-like en el parásito, el presente estudio tuvo como objetivo determinar la ubicación subcelular de la misma, en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, empleando las técnicas de centrifugación diferencial y permeabilización selectiva con digitonina; además de evaluar sus niveles de expresión en la curva de crecimiento del parásito, en medio LIT, mediante inmunoensayos. Los resultados obtenidos muestran que la proteína PAS-PGK-like posee una ubicación dual, la misma se encuentra ubicada principalmente en el glicosoma y en la mitocondria, en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Esta proteína se encontró asociada a la membrana de tales organelos; además, se observó que la misma posee mayores niveles de expresión, en la fase estacionaria del crecimiento del parásito. Finalmente, se plantea la posibilidad de que PAS-PGK-like funcione como sensor de la disponibilidad de glucosa siendo modulada por cambios de pH en el glicosoma; mientras que en la mitocondria, el dominio PAS podría detectar variaciones en la disponibilidad de grupos hemo, regulando una cascada de señalización, que conlleva al incremento de las ROS, en el estadio de epimastigote de *Trypanosoma cruzi*.

**Palabras clave:** Dominios PAS, Fosfoglicerato Kinasa, Glucólisis, Glicosoma, Mitocondria.

## ABSTRACT

The enzyme phosphoglycerate kinase (PGK) catalyzes the transfer of the phosphate group from 1,3-biphosphoglycerate to the ADP-Mg complex, generating 3-phosphoglycerate and ATP-Mg; that is the first substrate-level phosphorylation reaction in the glycolytic pathway. Recently a gene was identified in *Trypanosoma cruzi*, which encodes for a putative PGK protein corresponding to the fourth isoenzyme in that organism, a PAS domain-containing protein; that was named PAS-PGK-like. Since PAS domains are related to the detection of physicochemical variables at the cellular level, PAS-PGK-like protein could be of great importance in the process of metabolic adaptation of the parasite to the different environments during its life cycle. As an approach to the physiological role that PAS-PGK-like plays in the parasite, this research determines the protein subcellular localization in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*, using digitonin treatment and cell fractionation procedures, and evaluating its expression levels in the growth curve of the parasite. The results indicated that PAS-PGK-like has a dual localization; was found in glycosomes and mitochondria of epimastigotes. The protein was obtained associate with the membrane of such organelles; additionally, this work determined that the protein has higher levels of expression in the stationary phase of the parasite growth. PAS-PGK-like could work as a sensor of glucose availability, modulated by changes in pH inside of glycosome, while in the mitochondria; the PAS domain could detect variations in the availability of heme groups, regulating a signaling pathway, leads to the increase of ROS, in the epimastigote stage of *Trypanosoma cruzi*.

**Keywords:** Pas Domain, Phosphoglycerate kinase, Glycolysis, Glycosome, Mitochondria.

## ABREVIATURAS

ADN	.....	Ácido desoxiribonucleico
ADP	.....	Adenosin difosfato
ARNT	.....	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator</i>
ASCT	.....	Acetato:Succinato CoA-Transferasa
ATP	.....	Adenosin trifosfato
BSA	.....	Albúmina de suero bovino
DAB	.....	Diaminobenzidina
ELISA	.....	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
Fasa	.....	Fumarasa
FC	.....	Fracción citosólica
FGG	.....	Fracción granular gruesa
FM	.....	Fracción microsomal
FN	.....	Fracción nuclear
FRD <sub>g</sub>	.....	Fumarato Reductasa glicosomal
FRG	.....	Fracción rica en glicosomas
G3PDH	.....	Gliceraldehido-3-fosfato Deshidrogenasa
G6PDH	.....	Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa
GTP	.....	Guanosín trifosfato
H	.....	Homogenato
HK	.....	Hexoquinasa
IDH	.....	Isocitrato Deshidrogenasa
IgG	.....	Inmunoglobulina G
ITP	.....	Inosina trifosfato
LIT	.....	<i>Liver infusion triptose</i>
MDH	.....	Malato deshidrogenasa
NAD <sup>+</sup>	.....	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	.....	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP <sup>+</sup>	.....	NAD-fosfato oxidado
NADPH	.....	NAD-fosfato reducido
PAC	.....	<i>PAS-associated C-terminal motif</i>
PAGE	.....	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAS	.....	Per-ARNT-Sim
PEP	.....	fosfoenolpiruvato
PEPCK	.....	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa
Per	.....	<i>Period circadian protein</i>
PFK	.....	Fosfofructoquinasa
PGK	.....	Fosfoglicerato Quinasa
PPDK	.....	Piruvato Fosfato Diquinasa
PPi	.....	Pirofosfato
PTS1	.....	<i>Peroxisomal targeting signal</i> de tipo uno
PYP	.....	<i>Photoactive yellow protein</i>
ROS	.....	Especies Reactivas de Oxígeno
SDS	.....	Dodecilsulfato sódico
Sim	.....	<i>Single-Minded protein</i>

TAO	.....	Oxidasa alternativa de Tripanosomátidos
TCA	.....	Ácido tricloroacético
TEMED	.....	Trietilmetilendiamina

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

# ÍNDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>Enfermedad de Chagas .....</b>	<b>1</b>
<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
<b>Metabolismo energético de <i>Trypanosoma cruzi</i>.....</b>	<b>6</b>
<i>Proteína Fosfoglicerato Quinasa</i> .....	12
<b>Dominios PAS .....</b>	<b>14</b>
<i>Proteína PAS-PGK-like en Trypanosoma cruzi</i> .....	17
<b>II. HIPÓTESIS .....</b>	<b>19</b>
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>Objetivo General.....</b>	<b>19</b>
<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>19</b>
<b>IV. METODOLOGÍA .....</b>	<b>20</b>
Material biológico .....	20
Material químico.....	20
<b>Determinación de la concentración de proteínas .....</b>	<b>22</b>
<b>Determinación de la actividad enzimática.....</b>	<b>22</b>
<i>Hexoquinasa</i> .....	23
<i>Enolasa</i> .....	23
<i>Isocitrato Deshidrogenasa</i> .....	24
<b>Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....</b>	<b>24</b>
<b><i>Western Blot</i> y <i>Dot Blot</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) .....</b>	<b>26</b>
<b>Centrifugación diferencial .....</b>	<b>26</b>
<b>Permeabilización selectiva de epimastigotes por tratamiento con digitonina .....</b>	<b>28</b>
<b>Evaluación de la expresión de PAS-PGK-like durante el crecimiento de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
<b>Centrifugación diferencial .....</b>	<b>31</b>

Permeabilización selectiva de epimastigotes por tratamiento con digitonina .....	36
Expresión de PAS-PGK-like en la curva de crecimiento de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	39
<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	<b>42</b>
Ubicación subcelular de la proteína PAS-PGK-like en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	43
Expresión de la proteína PAS-PGK-like en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	47
Papel fisiológico de PAS-PGK-like en el metabolismo intermediario de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	48
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	<b>53</b>
<b>VIII. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>54</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>55</b>
<b>APÉNDICE</b> .....	<b>64</b>

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas .....	1
<b>Figura 2.</b> Enfermedad de Chagas en Venezuela.....	3
<b>Figura 3.</b> Estructuras y organelos de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
<b>Figura 4.</b> Estadios morfológicos de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
<b>Figura 5.</b> Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	6
<b>Figura 6.</b> Modelo de metabolismo intermediario en el glicosoma de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	8
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática del metabolismo de la glucosa y prolina, en <i>Trypanosoma brucei</i> estadio procíclico.....	10
<b>Figura 8.</b> Modelo de metabolismo intermediario en la mitocondria de <i>Trypanosoma brucei</i> estadio procíclico .....	11
<b>Figura 9.</b> Vías de producción de succinato, acetato, lactato y alanina enriquecidos con Carbono-13 ( <sup>13</sup> C); en <i>Trypanosoma brucei</i> procíclico incubado con D-(1- <sup>13</sup> C)-Glucosa .....	11
<b>Figura 10.</b> Modelo estructural de la enzima Fosfoglicerato Quinasa.....	12
<b>Figura 11.</b> Modelo de un dominio PAS perteneciente a una proteína de <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	15
<b>Figura 12.</b> Mecanismo de funcionamiento de un dominio PAS.....	16
<b>Figura 13.</b> Distribución de la actividad específica de las enzimas marcadoras; en fracciones obtenidas mediante centrifugación diferencial de un homogenato celular de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	32
<b>Figura 14.</b> Inmunodetección de la proteína PAS-PGK-like en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial y evaluadas mediante <i>Western Blot</i> . Revelado con diaminobenzidina.....	33
<b>Figura 15.</b> Inmunodetección de la proteína PAS-PGK-like en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial y evaluadas mediante <i>Western Blot</i> . Revelado con luminol.....	34
<b>Figura 16.</b> Inmunodetección de la proteína PAS-PGK-like en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial, evaluadas mediante <i>Dot Blot</i> .....	35
<b>Figura 17.</b> Perfil de liberación de la actividad enzimática de las proteínas marcadoras; en sobrenadantes obtenidos por tratamiento con digitonina de células de <i>Trypanosoma cruzi</i> . .....	37
<b>Figura 18.</b> Inmunodetección de las proteínas marcadoras y PAS-PGK-like, en sobrenadantes y sedimentos de las fracciones obtenidas por permeabilización selectiva con digitonina, evaluadas mediante <i>Western Blot</i> .....	38
<b>Figura 19.</b> Expresión de la proteína PAS-PGK-like, en muestras obtenidas diariamente de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> cultivados en medio LIT .....	40

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Soluciones para determinación de la concentración de proteínas con el método de Lowry ..	20
<b>Tabla 2.</b> Soluciones amortiguadoras para los ensayos enzimáticos .	20
<b>Tabla 3.</b> Soluciones y tampones empleados para electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	20
<b>Tabla 4.</b> Soluciones y tampones empleados para <i>Western Blot</i> y <i>Dot Blot</i> , en membrana de nitrocelulosa.	21
<b>Tabla 5.</b> Soluciones y tampones empleados para el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)	21
<b>Tabla 6.</b> Soluciones amortiguadoras para el tratamiento de los parásitos	21

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## I. INTRODUCCIÓN

### Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es una enfermedad parasitaria crónica causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi* (Avendaño-Rangel & Rey, 2016), es endémica desde el norte de México hasta Argentina (Figura 1). Esta enfermedad comprende una fase aguda inicial de baja mortalidad (10%), seguida en el 30-40% de los casos, de una condición crónica caracterizada por lesiones irreversibles en el tracto gastrointestinal y el corazón (Urbina & Docampo, 2003).

La Organización Mundial de la Salud, clasifica a la Enfermedad de Chagas entre las “enfermedades desatendidas u olvidadas” (*neglected disease*) dado que afecta en mayor medida a poblaciones de bajos recursos y con acceso limitado a programas de salud, aunque actualmente es una enfermedad emergente en algunas partes de Norte América y Europa. La incidencia anual varía entre 28.000 y 56.000 infectados, afectando a millones de personas en 21 países de Latinoamérica; cada año mueren miles de personas a causa de esta enfermedad y existen unos 100 millones de personas en riesgo de contraerla (Avendaño-Rangel & Rey, 2016; Canals et al., 2017).

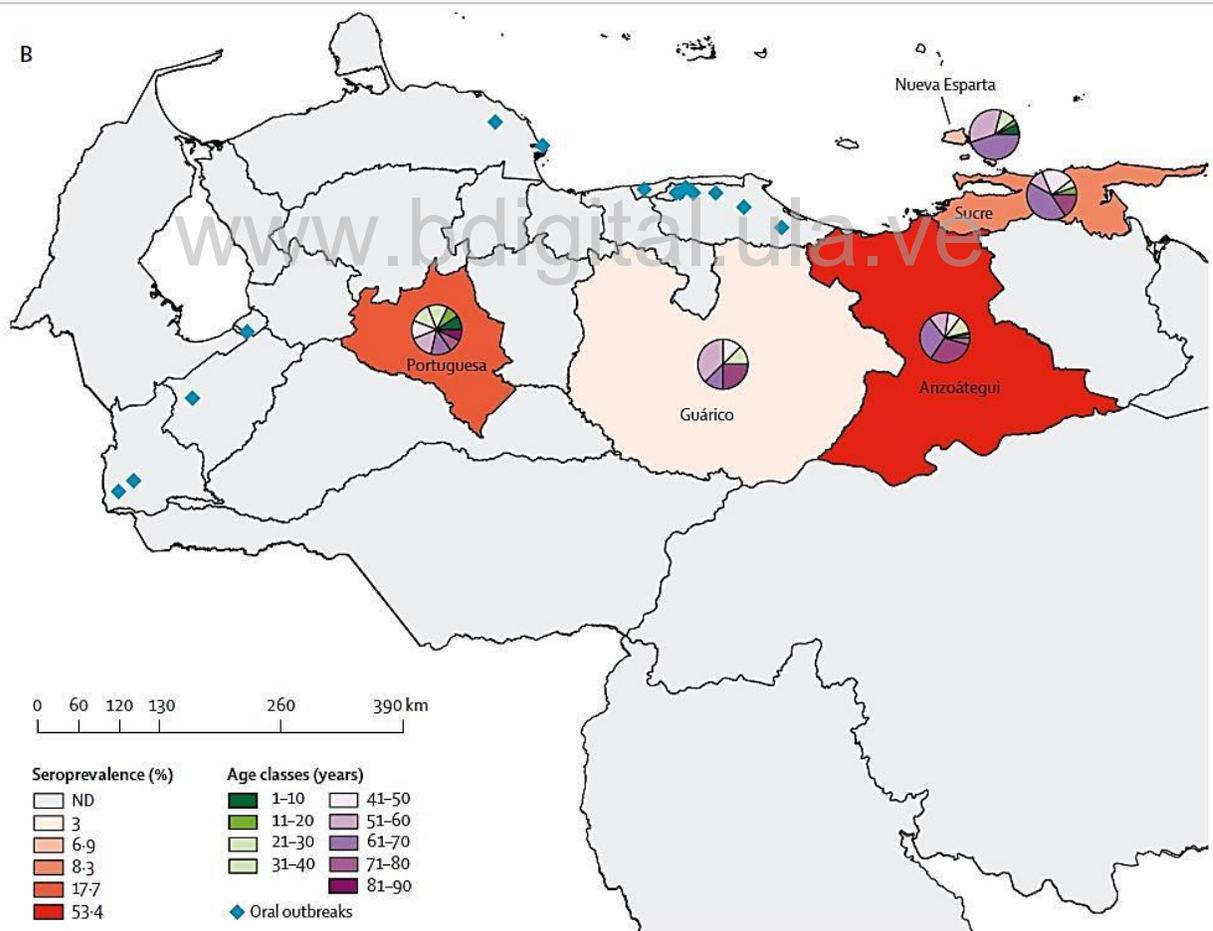
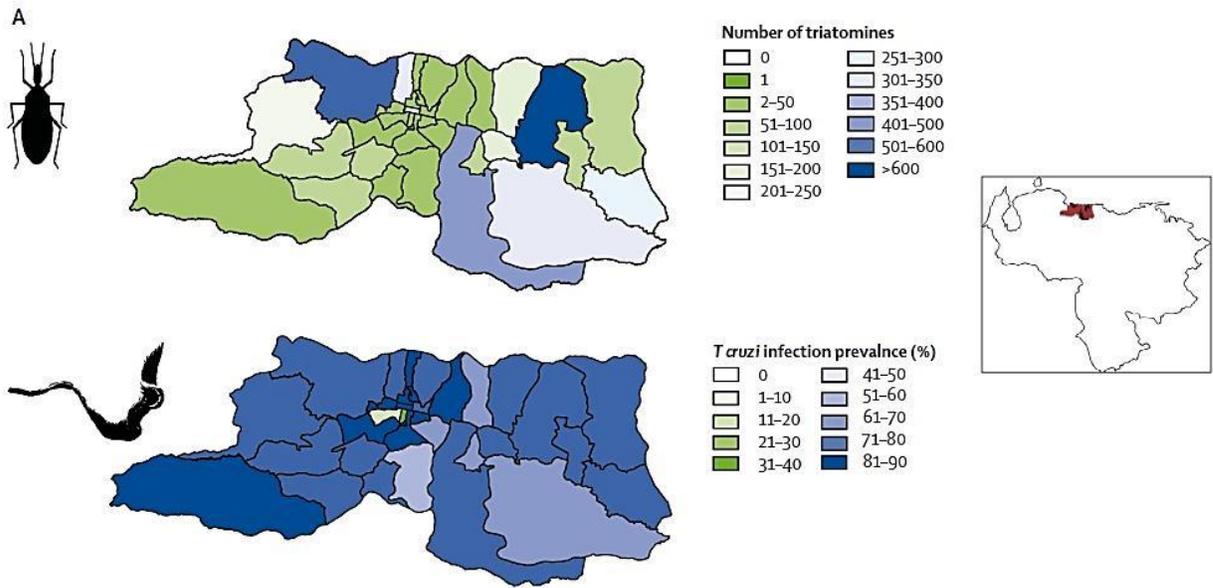


**Figura 1.** Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas. Las zonas endémicas de la enfermedad se muestran en rojo. Mapa publicado por SpringerImages.

En Venezuela, el Programa de Control de la Enfermedad de Chagas logró la disminución del área endémica, de los índices de seroprevalencia de la enfermedad y de los índices de infestación de viviendas por parte del vector *Rhodnius prolixus*, a finales del siglo pasado (Avendaño-Rangel & Rey, 2016). Sin embargo, en los últimos años se ha presentado la infestación de viviendas por especies de Triatomíneos consideradas silvestres, hematófagos e infectados con el parásito *T. cruzi*; no solo zonas rurales sino también urbanismos (Avendaño-Rangel & Rey, 2016), tal como se muestra en la Figura 2A, donde se evidencia la presencia de Triatomíneos en zonas de Caracas (Grillet et al., 2019). Asimismo, distintos estudios muestran que las cifras de casos positivos para *T. cruzi* han ido en aumento y señalan que desde el año 2012 el control de la transmisión de la Enfermedad de Chagas en Venezuela fue abandonado, generando un resurgimiento de la enfermedad (Grillet et al. 2019).

Los pocos datos de zonas endémicas en el país (Figura 2B), demuestran que existe transmisión vectorial activa, reflejada en los considerables índices de seroprevalencia y de infestación de viviendas. La transmisión por vía oral no debe descartarse, dado que existen 23 muertes en los últimos diez años; mientras que la transmisión por vía transfusional permanece como una interrogante, debido a que no existe un control en los bancos de sangre nacionales (Grillet et al., 2019).

En líneas generales, ha habido grandes avances en el control de la Enfermedad de Chagas en lo que respecta a las zonas endémicas de Latinoamérica; lamentablemente, en cuanto al tratamiento de la enfermedad no hay soluciones contundentes, puesto que actualmente solo existen dos medicamentos en el mercado (benznidazol y nifurtimox), que provocan efectos secundarios en el paciente y solo son efectivos si se administran al comienzo de la infección (Urbina & Docampo, 2003; Avendaño-Rangel & Rey, 2016). Por esta razón es necesaria la búsqueda de blancos quimioterapéuticos contra *Trypanosoma cruzi*, lo cual implica realizar estudios enfocados en la biología celular y molecular de este parásito, a fin de comprender su funcionamiento y poder combatirlo de manera eficaz; en este aspecto, radica la importancia de la presente investigación.



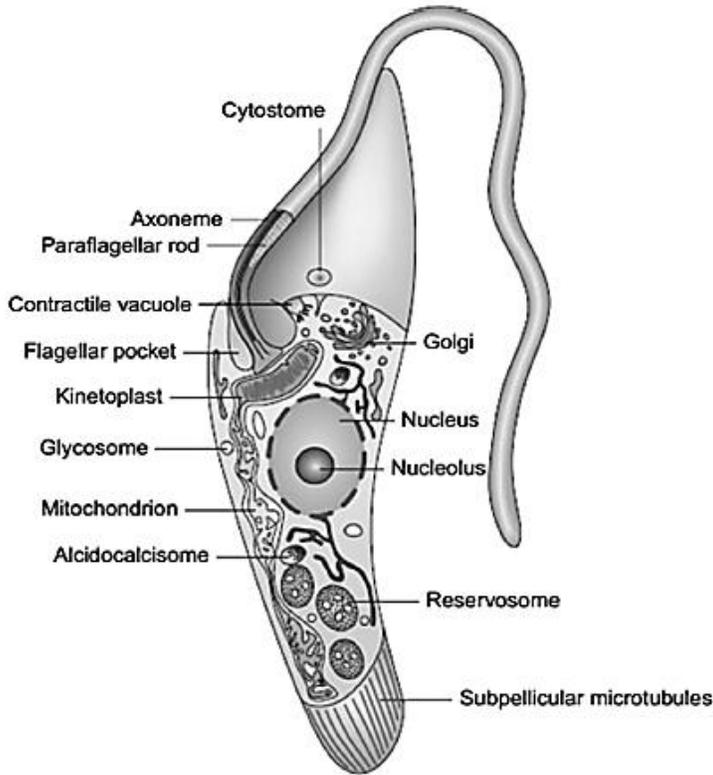
**Figura 2.** Enfermedad de Chagas en Venezuela. **(A)** Distribución y abundancia de vectores Triatomines en zonas de Caracas-Venezuela y la prevalencia de infección por *T. cruzi* en los mismos. **(B)** Datos actuales de seroprevalencia de la Enfermedad de Chagas y sitios de casos de transmisión oral en Venezuela. ND= Data no disponible. Tomado de Grillet et al., 2019.

### ***Trypanosoma cruzi***

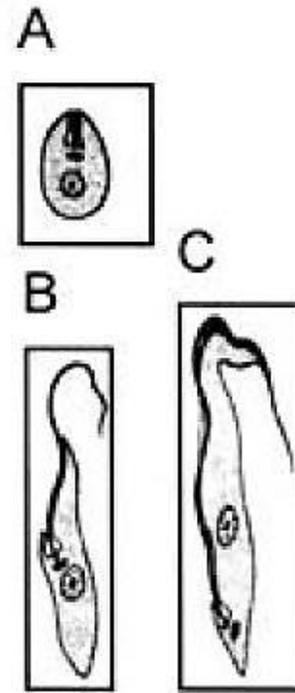
*Trypanosoma cruzi* es un protozoo parásito hemoflagelado causante de la Enfermedad de Chagas, pertenece a la familia Trypanosomatidae del filo Euglenozoa. Otros miembros de la familia Trypanosomatidae también son patógenos, como los parásitos del género *Leishmania*, agente de la Leishmaniasis, y *Trypanosoma brucei* causante de la Tripanosomiasis Africana o Enfermedad del Sueño; por lo cual el grupo posee gran importancia médica y veterinaria (Maslov & Simpson, 1995; De Souza, 2002).

Al igual que el resto de los kinetoplastidas, *T. cruzi* posee las características propias del grupo, entre las cuales se destaca la presencia del kinetoplasto, el cual corresponde a ADN densamente empaquetado que se halla en la matriz de una mitocondria ramificada, representando entre 20-25% del ADN total en epimastigotes. Adicionalmente este parásito posee organelos peculiares representativos como lo son los glicosomas y reservosomas. También se caracteriza por la presencia de un citoesqueleto compuesto por polímeros de tubulina  $\alpha$  y  $\beta$ ; que se extiende y se asocia con toda la membrana plasmática, excepto en la parte posterior de la célula, donde se encuentra el bolsillo flagelar y de donde emerge un flagelo (Figura 3) (De Souza, 2002).

Los protozoarios de la familia Trypanosomatidae, presentan durante su ciclo de vida varias morfologías (Figura 4); en el caso de *T. cruzi*, tiene un ciclo de vida complejo, de tipo heteroxénico, caracterizado por varios estados de desarrollo observados en hospederos vertebrados e invertebrados, comprendiendo las formas de: (a) amastigote, caracterizado por ser esférico y aflagelado, multiplicativo únicamente en el vertebrado; (b) epimastigote, organismos fusiformes de entre 20-40  $\mu\text{m}$  de longitud, caracterizados por presentar el kinetoplasto anterior al núcleo y encontrarse principalmente en el hospedero invertebrado, siendo en este la forma multiplicativa; y (c) trypomastigote, fusiforme de 25  $\mu\text{m}$  de longitud con kinetoplasto ubicado posterior al núcleo, se encuentra en los hospederos vertebrado e invertebrado, siendo la forma infectiva (De Souza, 2002).

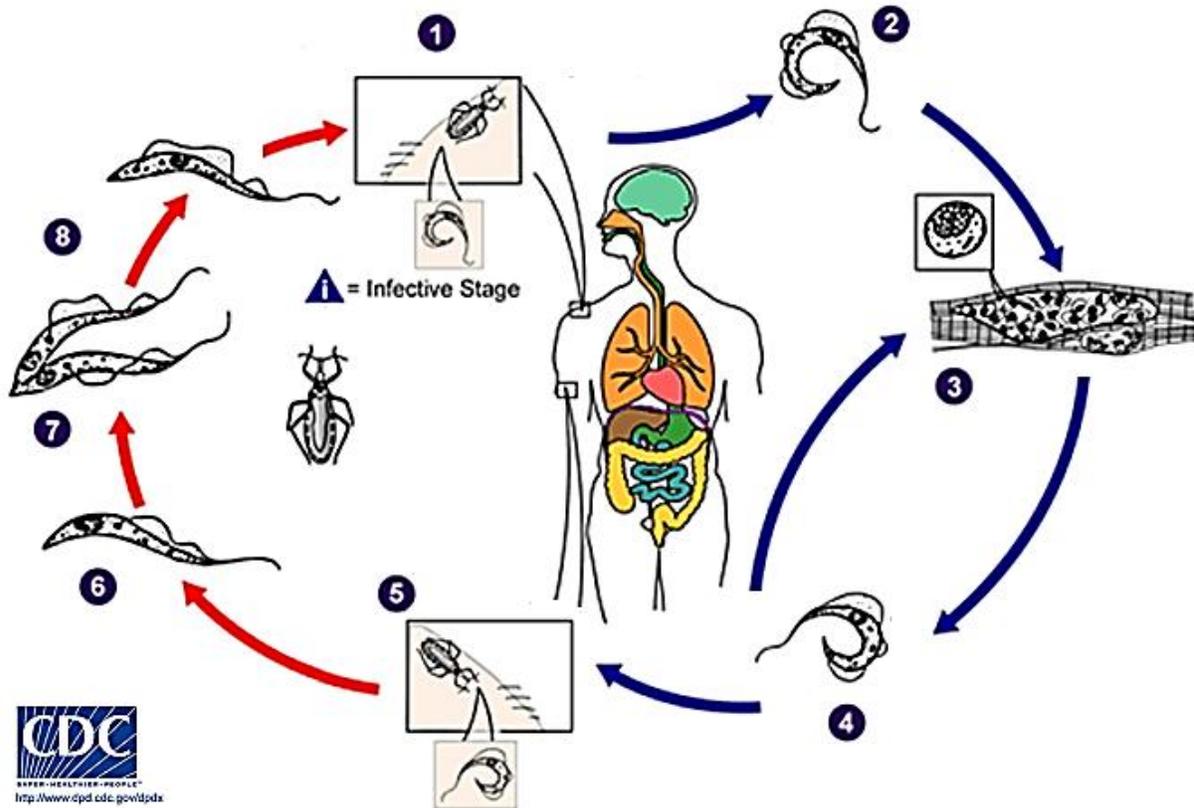


**Figura 3.** Estructuras y organelos de *Trypanosoma cruzi*. Tomado de Docampo R, 2005.



**Figura 4.** Estadios morfológicos de *Trypanosoma cruzi*. (A) amastigote. (B) epimastigote. (C) trypomastigote. Tomado de De Souza, 2002

El ciclo de vida de ese parásito (Figura 5), inicia cuando un insecto hematófago (Hemíptera o Reduvidae, como *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* y *Panstrongylus megistus*), se alimenta del hospedero vertebrado infectado, ingiriendo trypomastigotes. En el estómago del insecto, los trypomastigotes se transforman en epimastigote, que se multiplica por fisión binaria a lo largo del intestino y se convierte en trypomastigote metacíclico en el recto del invertebrado, siendo capaz de infectar a un nuevo hospedero vertebrado. Cuando el insecto infectado se alimenta nuevamente, los trypomastigotes se evacúan a través de las heces y la orina del mismo, ingresando en el vertebrado e infectando distintos tipos de células (sanguíneas, musculares, nerviosas), donde se convierten en amastigote. En esta etapa el parásito se divide repetidamente por fisión binaria; estos originan trypomastigotes que se liberan de las células al torrente sanguíneo, donde son capaces infectar otras células y repetir el ciclo de multiplicación en el hospedero vertebrado. Eventualmente otro insecto se alimenta de la sangre del vertebrado infectado y el parásito completa su ciclo de vida (Coura & De Castro, 2002; De Souza, 2002; Urbina & Docampo, 2003).



**Figura 5.** Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. (1) Ingesta sanguínea, expulsión de trypomastigotes Metacíclicos. (2) Infección al vertebrado. (3) Invasión de células por trypomastigotes, transformación a amastigote y multiplicación. (4) Transformación y liberación de trypomastigotes. (5) Ingesta sanguínea e infección del insecto. (6)(7) Transformación a epimastigote y multiplicación. (8) Transformación a trypomastigote Metacíclico. Publicado por CDC (US Centers for Disease Control and Prevention).

### Metabolismo energético de *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma brucei* ha sido ampliamente estudiado en cuanto a su metabolismo intermediario y se ha tomado como modelo, el metabolismo de la forma procíclica, el cual es aplicable al resto de los miembros de la familia Trypanosomatidae, incluyendo a *T. cruzi*. Estos organismos son capaces de utilizar glucosa y aminoácidos como fuente de energía, empleando preferencialmente glucosa (Bringaud et al., 2006); cuyo catabolismo es parcial incluso en condiciones aeróbicas, por lo cual se denomina “Fermentación aeróbica de la glucosa”. Esta ruta metabólica no está regulada en los puntos clásicos como Hexoquinasa y Fosfofructoquinasa, lo cual conlleva a que estos parásitos consuman tanta glucosa como entra a la célula. Parte de los carbonos de la glucosa parcialmente oxidada, son excretados al medio principalmente como succinato, acetato y L-alanina y en menor cantidad como piruvato,

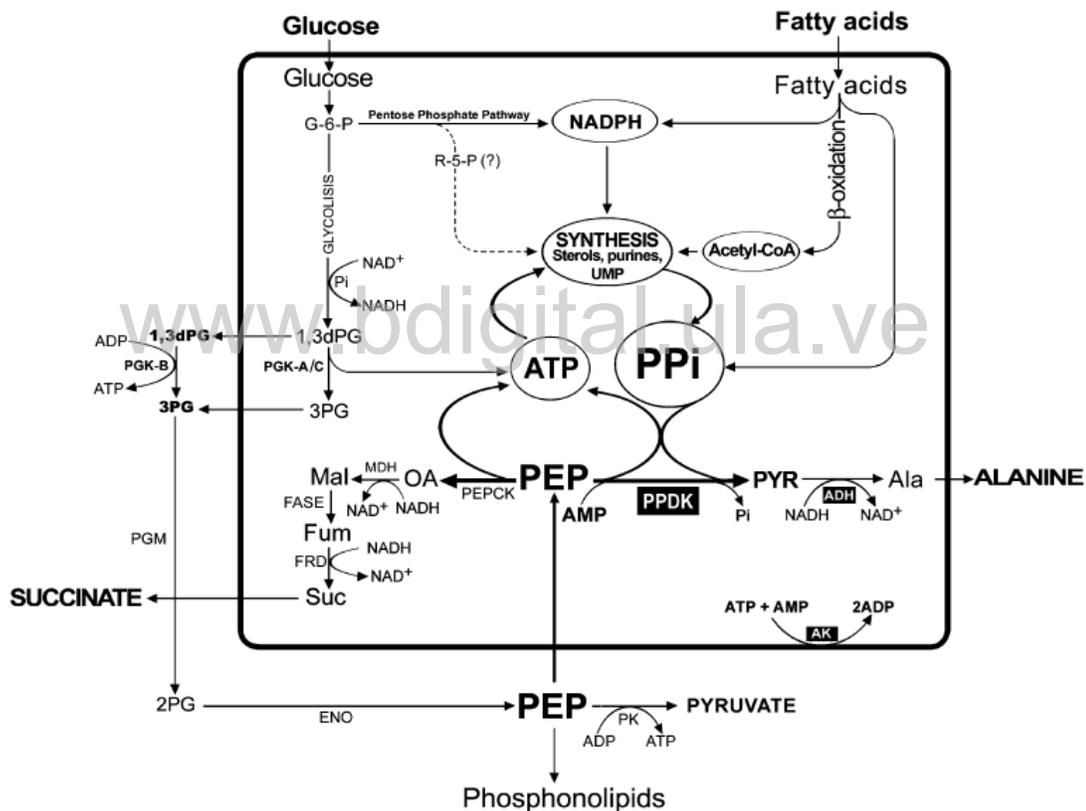
lactato y malato, aunque en general el succinato es siempre el producto principal (Cazzulo et al., 1985; Cazzulo, 1992).

Los glicosomas se caracterizan por ser microcuerpos esféricos de entre 0,1 y 0,3  $\mu\text{m}$  de diámetro, con matriz electrónica densa de alta densidad de proteínas y una sola membrana de 6-7 nm de espesor. Este organelo está relacionado morfológicamente con los peroxisomas y participa en la degradación de glucosa, contiene las primeras siete enzimas glucolíticas (Hexoquinasa, Fosfoglicosa Isomerasa, Fosfofructoquinasa, Aldolasa, Triosa Fosfato Isomerasa, Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa y Fosfoglicerato Quinasa), mientras que las restantes se encuentran en el citosol (Fosfoglicerato Mutasa, Enolasa y Piruvato Quinasa); ya que la glucólisis está parcialmente compartimentalizada. Los glicosomas poseen algunas enzimas auxiliares de la ruta glucolítica (Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa, Piruvato Fosfato Diquinasa, Fumarato Reductasa y Malato Deshidrogenasa); y también es donde se lleva a cabo otras rutas metabólicas como lo son la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y biosíntesis de esteroides (Oppenheimer, 1987; Acosta et al., 2004; Quiñones et al., 2004; Gualdrón-López et al., 2012; Acosta et al., 2019).

La compartimentalización de la glucólisis, es un mecanismo alternativo que funciona como protección contra una turbo-explosión metabólica: dado que en la vía glucolítica el ATP invertido en los pasos iniciales (catalizados por las enzimas Hexoquinasa, HK y Fosfofructoquinasa, PFK) es generado en los pasos posteriores de la ruta y estas enzimas no están reguladas por un *feedback* negativo; podría ocurrir que tales enzimas consuman el ATP más rápido de lo que este puede generarse y la generación de sus productos esté por encima de la capacidad metabólica de las enzimas subsiguientes. Esta situación se denomina “turbo-diseño” de la glucólisis y ocasionaría una acumulación de intermediarios de la ruta, como las hexosas fosfato, lo que resulta tóxico para la célula; por ende, la compartimentalización de los primeros pasos de la glucólisis en el glicosoma, es un mecanismo de regulación, debido a que las reacciones que ocurren dependen del balance ATP/ADP del organelo, el cual es menor con respecto al citosol y evita la acumulación de intermediarios tóxicos (Michels et al., 2006; Haanstra et al., 2008).

Así como es importante la regulación metabólica mediante la compartimentalización, también es necesario el mantenimiento de los balances energético (ATP/ADP) y redox

(NADH/NAD<sup>+</sup>) dentro del glicosoma para que puedan llevarse a cabo las rutas metabólicas correspondientes, puesto que la membrana de este organelo no es permeable a la mayoría de los intermediarios glucolíticos (Oppendoes, 1987). La ruta glucolítica transcurre entre el glicosoma y el citosol, generando Fosfoenolpiruvato (PEP) que se convierte en piruvato en el citosol. Sin embargo, una parte del PEP ingresa al glicosoma para ser tomado como sustrato de las enzimas Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa (PEPCK) o Piruvato Fosfato Diquinasa (PPDK), las cuales conforman las vías auxiliares de la glucólisis y contribuyen al mantenimiento de los balances energético y redox del glicosoma (Figura 6) (Acosta et al., 2004; Besteiro et al., 2005).



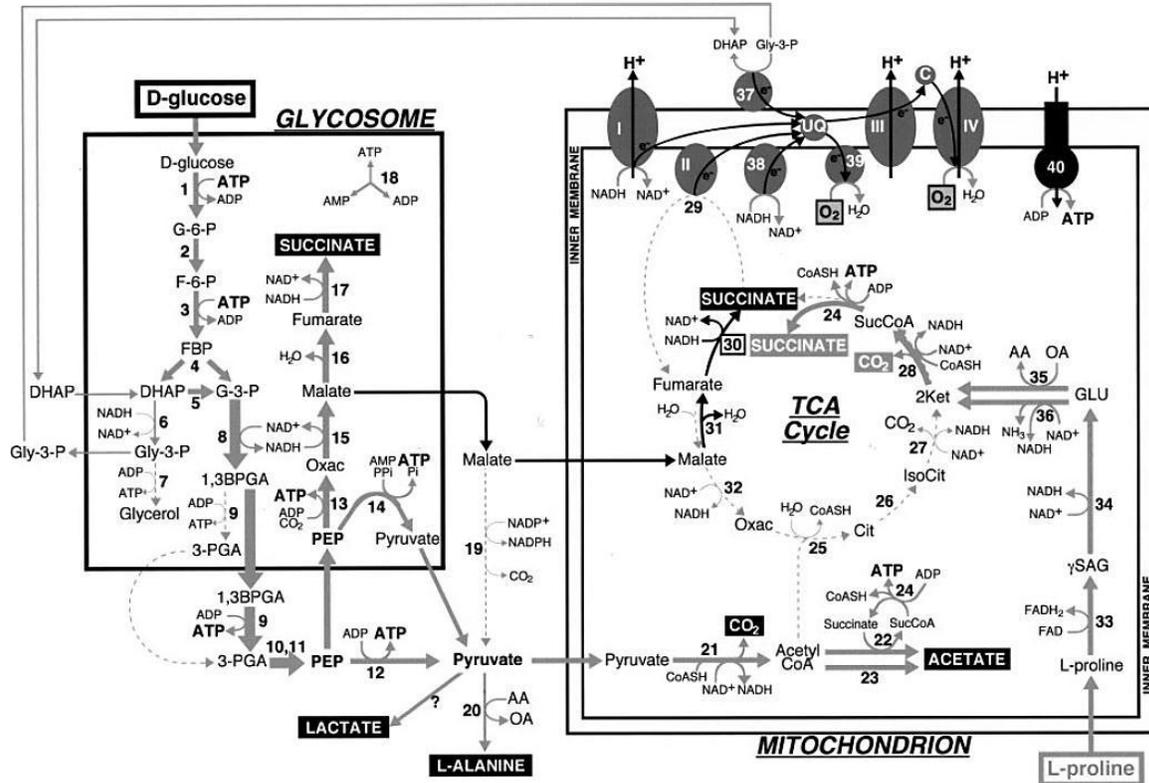
**Figura 6.** Modelo de metabolismo intermediario en el glicosoma de *Trypanosoma cruzi*. Tomado de Acosta et al., 2004.

La rama de la PEPCK o vía de producción de succinato, genera ATP que compensa la inversión en la glucólisis en la activación de la glucosa y adicionalmente reoxida el NADH generado por la enzima Glicerilaldehído-3-fosfato Deshidrogenasa (G3PDH); esto ocurre mediante la vía Oxalacetato-malato-fumarato y succinato, donde participan las enzimas Malato deshidrogenasa (MDH), Fumarasa (Fasa) y Fumarato Reductasa glicosomal (FRD<sub>g</sub>),

en esta vía las enzimas MDH y FRD<sub>g</sub> oxidan NADH y generan dos moléculas de NAD<sup>+</sup> por cada molécula de PEP que entra al glicosoma, por lo tanto, no todo el PEP producido por molécula de glucosa debe entrar al glicosoma para mantener el balance redox. Asimismo, la rama PPDK produce ATP y piruvato a partir del PEP, al mismo tiempo que elimina el tóxico pirofosfato (PPi) producto de la oxidación de ácidos grasos y las rutas de síntesis que se llevan a cabo en el glicosoma; además, esta vía también reoxida NADH, mediante la reducción del piruvato por la enzima Alanina Deshidrogenasa en *T. cruzi*, produciendo NAD<sup>+</sup> y Alanina (Figura 6) (Acosta et al., 2004).

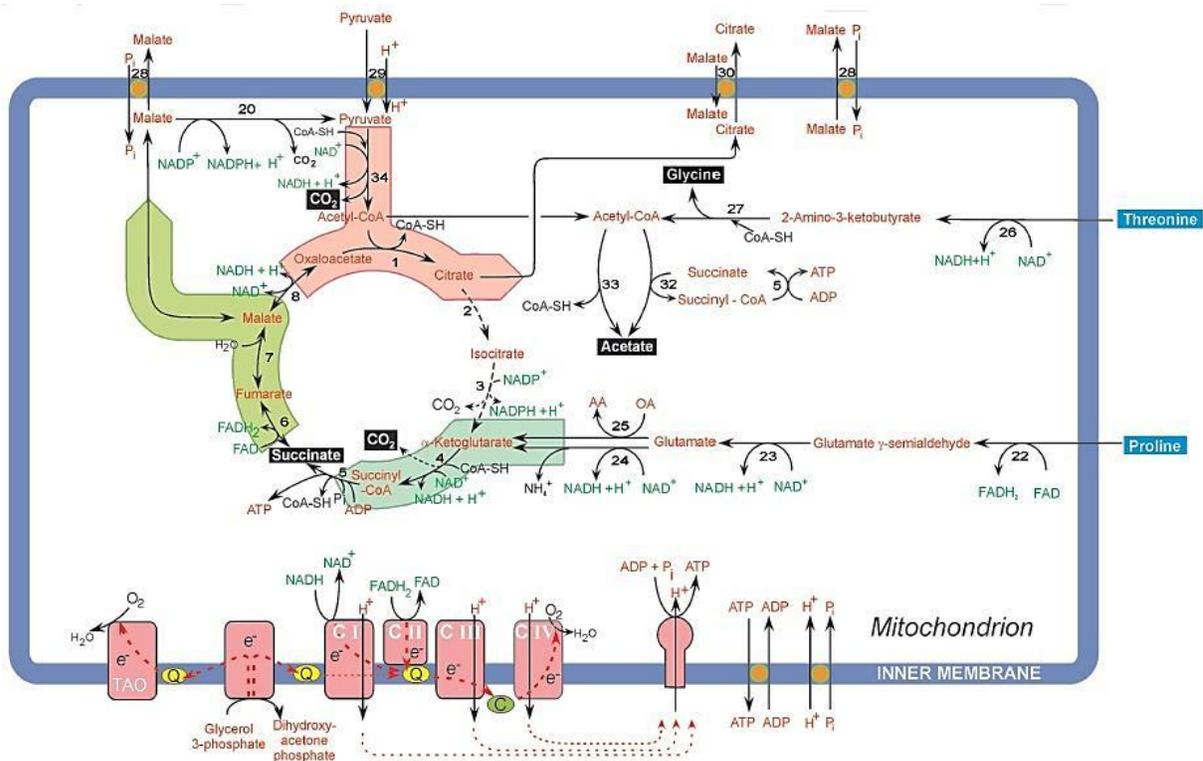
En la mitocondria se encuentran todas las enzimas del ciclo de Krebs aunque este no funciona como tal, en este caso los derivados glucolíticos y los aminoácidos no son degradados a CO<sub>2</sub> y agua de manera canónica; por el contrario, las enzimas del ciclo de Krebs son empleadas para la degradación de los compuestos hasta succinato. La prolina consumida por estos organismos ingresa a la mitocondria, se convierte en glutamato y finalmente en α-cetoglutarato que entra al “ciclo” para producir succinato (van Weelden et al., 2003); mientras que parte del malato generado en el glicosoma, podría también entrar a la mitocondria para ser convertido en succinato por la enzima Fumarasa y una FRD mitocondrial, de modo que una proporción del succinato producido por la célula es consecuencia de un flujo a través de parte del ciclo de Krebs en sentido inverso (Figura 7) (Coustou et al., 2005).

El piruvato producido por la PK, posiblemente por la enzima málica en el citosol y por la PPDK en el glicosoma, puede entrar también a la mitocondria para ser convertido a acetyl-CoA, el cual se convierte en su mayoría a acetato mediante la enzima acetato: succinato CoA-Transferasa (ASCT), que además involucra un ciclo Succinato/Succinil-CoA generador de ATP (Figura 7). Otro sustrato importante que es metabolizado en la mitocondria, es el aminoácido treonina, que puede convertirse en acetyl-Coenzima A, generando glicina y acetato como productos finales. Es necesario destacar que la degradación de los sustratos en la mitocondria (piruvato, prolina y treonina) producen equivalentes reducidos que participan en la cadena transportadora de electrones, la cual es esencial para la supervivencia del parásito y consiste en una oxidasa alternativa (TAO), más los complejos clásicos I-IV (Figuras 7 y 8) (van Weelden et al., 2003; van Weelden et al., 2005).

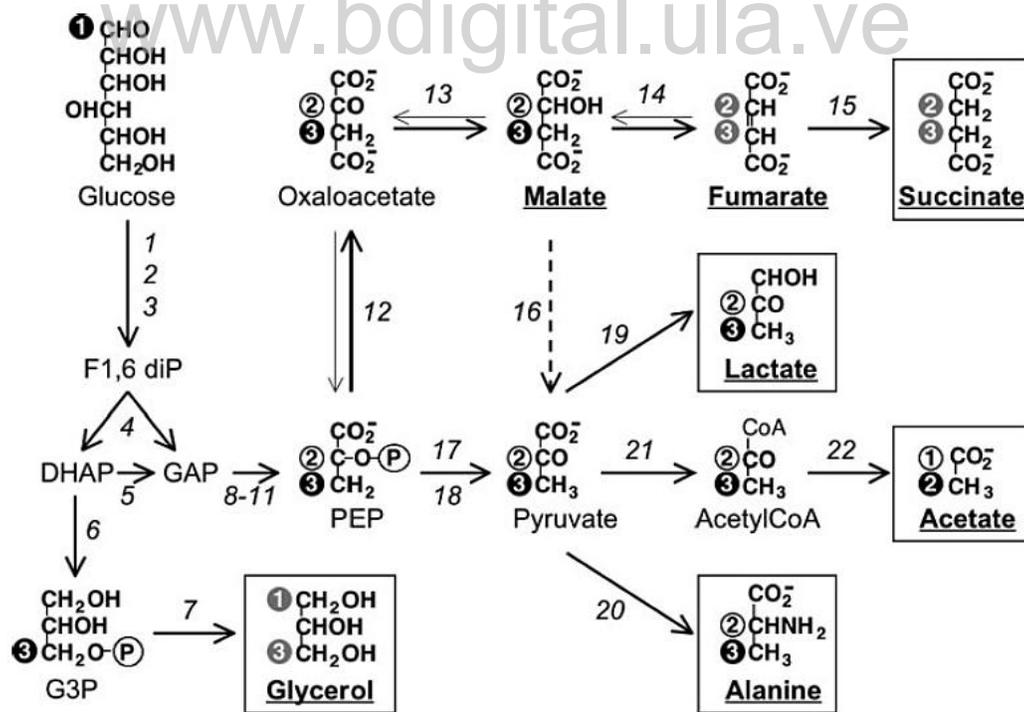


**Figura 7.** Representación esquemática del metabolismo de la glucosa y prolina, en *Trypanosoma brucei* estadio procíclico. Tomado de Coustou et al., 2005.

De lo anteriormente descrito se tiene que los organismos en cuestión excretan acetato desde la mitocondria y succinato proveniente del glicosoma y de la mitocondria (Coustou et al., 2006); asimismo, el glicerol es generado en el glicosoma en anaerobiosis, producto de vía dihidroxiacetona-3-fosfato/glicerol-3-fosfato/glicerol, donde participan las enzimas Glicerol 3-fosfato Deshidrogenasa y Glicerol Quinasa; mientras que en condiciones aeróbicas no hay participación de la Glicerol Quinasa y por ende no se produce glicerol, sino que se acopla la vía a la actividad TAO mitocondrial, para regenerar el  $\text{NAD}^+$  y dihidroxiacetona-3-fosfato en el glicosoma (Kralova et al., 2000). El resto de los metabolitos excretados por la célula, provienen de reacciones que involucran el piruvato producido en la glucolisis: lactato en el glicosoma mediante una reacción que involucra oxidación del  $\text{NADH}$  y es llevada a cabo por la enzima D-2-Hidroxiácido Deshidrogenasa; y alanina producto de las enzimas alanina deshidrogenasa y alanina aminotransferasa, en el glicosoma y en el citosol respectivamente (Figura 9) (Acosta et al., 2004; Coustou et al., 2006; Acosta et al., 2019).



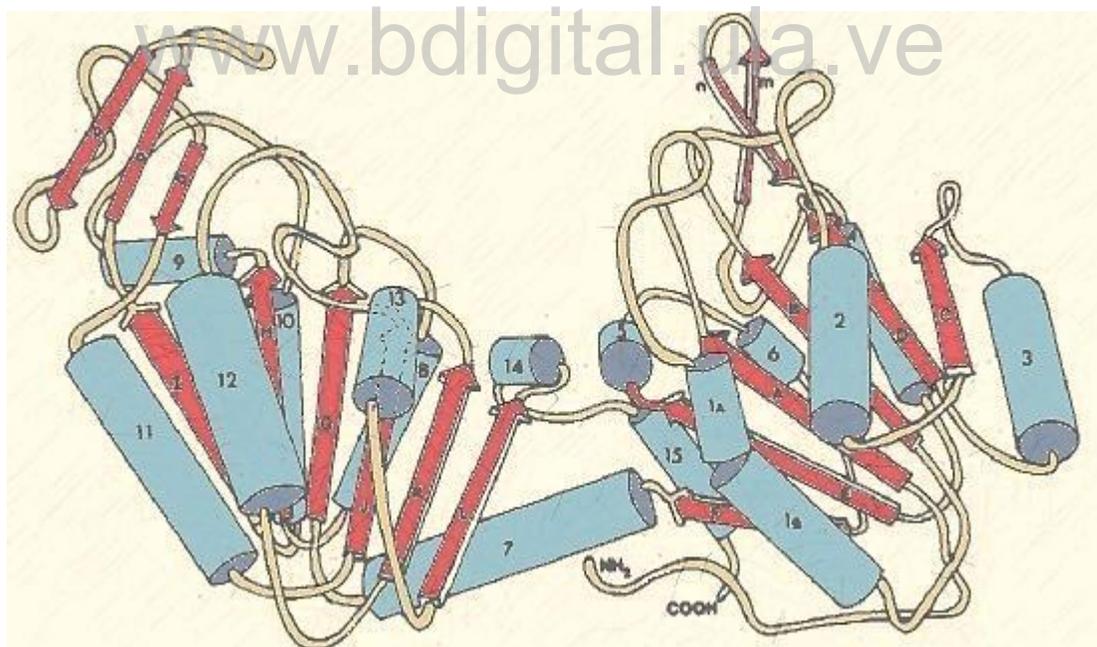
**Figura 8.** Modelo de metabolismo intermediario en la mitocondria de *Trypanosoma brucei* estadio procíclico. Tomado y modificado de (van Weelden et al., 2005)



**Figura 9.** Vías de producción de succinato, acetato, lactato y alanina enriquecidos con Carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ); en *Trypanosoma brucei* procíclico incubado con D-(1- $^{13}\text{C}$ )-Glucosa. Tomado de Coustou et al., 2006.

## Proteína Fosfoglicerato Quinasa

Fosfoglicerato Quinasa (PGK) es una enzima glucolítica esencial para todos los organismos vivos, esta cataliza la transferencia del grupo fosfato desde 1,3-bifosfoglicerato al complejo ADP-Mg para producir 3-fosfoglicerato y ATP-Mg, un paso importante en la glucólisis: la primera fosforilación a nivel de sustrato. Esta enzima es monomérica y presenta una estructura conformada por dos dominios: N-terminal que une 3-fosfoglicerato/1,3-bifosfoglicerato y C-terminal que une ADP-Mg/ATP-Mg; tales dominios son de tamaño similar y se encuentran unidos por dos alfa hélices que forman una “bisagra flexible” (Figura 10). El ciclo catalítico de la PGK conlleva grandes cambios conformacionales, desde una forma abierta que recibe los sustratos hasta una forma cerrada que lleva a cabo la catálisis, la cual es generada únicamente por la unión de ambos sustratos, ya que la unión de solo uno de ellos genera cambios conformacionales menores pero no el “cierre” de la enzima; adicionalmente, se requiere magnesio y altas concentraciones de los sustratos para su actividad (Chiarelli et al., 2012).



**Figura 10.** Modelo estructural de la enzima Fosfoglicerato Quinasa. Las alfa hélices se denotan con cilindros, mientras que las láminas beta se muestran como flechas. Tomado y modificado de Banks et al., 1979.

En tripanosomátidos la PGK posee una ubicación dual, encontrándose en el citosol y en el glicosoma; tal enzima al igual que la de otros organismos, es monomérica y sus

parámetros cinéticos no difieren significativamente, también se caracteriza por tener una actividad óptima entre pH 6-9, y por emplear únicamente ATP y no GTP o ITP como otras PGK conocidas (Misset & Opperdoes, 1987). En *T. brucei* se han identificado tres isoenzimas producto de tres genes arreglados en tándem en el cromosoma uno, los cuales codifican para PGKA, PGKB y PGKC: en el estadio procíclico se encuentra la PGKA en el glicosoma y abundante PGKB en el citosol; mientras que la forma sanguínea expresa únicamente la PGKA y PGKC glicosomales, estando esta última en mayores niveles (Blattner et al., 1998). En *T. cruzi*, se encuentran las mismas tres isoenzimas y su ubicación subcelular coincide con lo descrito anteriormente, PGKB en el citosol y PGKA/PGKC en el glicosoma; tales proteínas se expresan en todos los estadios morfológicos del parásito, la enzima PGKB representa el 80% de la actividad PGK total, mientras que el 20% de la actividad Fosfoglicerato Quinasa restante corresponde a las isoenzimas PGKC y PGKA en conjunto (Concepción et al., 2001).

Dado que las enzimas PGK en *T. cruzi* se expresan simultáneamente durante todo el ciclo de vida del parásito, se podría pensar que existe una redundancia funcional en el glicosoma, donde se encuentran dos de ellas; sin embargo, Barros-Álvarez et al. (2014) proponen que según sus constantes cinéticas tales enzimas cumplen distintos roles en la célula. Por una parte, la PGKC es inhibida por ATP con un  $K_i$  de 270  $\mu\text{M}$ , siendo este valor similar al  $K_m$  para ATP de la enzima PGKA y menor al de Hexoquinasa; por lo tanto, durante un flujo glucolítico activo, la isoenzima PGKC se encuentra inhibida. De este modo la producción de 3-Fosfoglicerato y ATP es llevada a cabo por la PGKA en el glicosoma; y dada la baja actividad específica de esta isoenzima glicosomal, parte del 1,3 Bifosfoglicerato, es consumido en el citosol por la isoenzima PGKB. Adicionalmente, PGKC presenta un bajo valor de  $K_m$  para ATP (10  $\mu\text{M}$ ), lo cual indica una alta afinidad para tal sustrato y aunado a lo anterior descrito, permite deducir que tal enzima podría trabajar en sentido gluconeogénico, mientras que las otras isoenzimas lo hacen en sentido glucolítico (Barros-Álvarez et al., 2014).

La organización de los genes correspondientes a las isoenzimas PGK en *T. cruzi*, difiere de la reportada en *T. brucei* y Leishmania; en este último organismo se ha reportados dos enzimas PGK, la PGKB ubicada en el citosol y la PGKC en el glicosoma (Adhikari et al., 2019). En el caso de *T. cruzi*, se encuentran anotados en la base de datos *TriTryp Database*, dos genes dispuestos en tándem en el cromosoma 9, uno codifica para PGKA y otro (según la

coincidencia del peso molecular de su producto) para PGKB, mientras que el gen codificante de la PGKC no ha sido identificado; sin embargo, en la base de datos se muestra un gen adicional en el cromosoma 32, el cual codifica para otra isoenzima PGK que posee un dominio PAS, y que también fue encontrado en la base de datos de *Leishmania* (Barros-Álvarez et al., 2014; Rojas-Pirela et al., 2018; Adhikari et al., 2019).

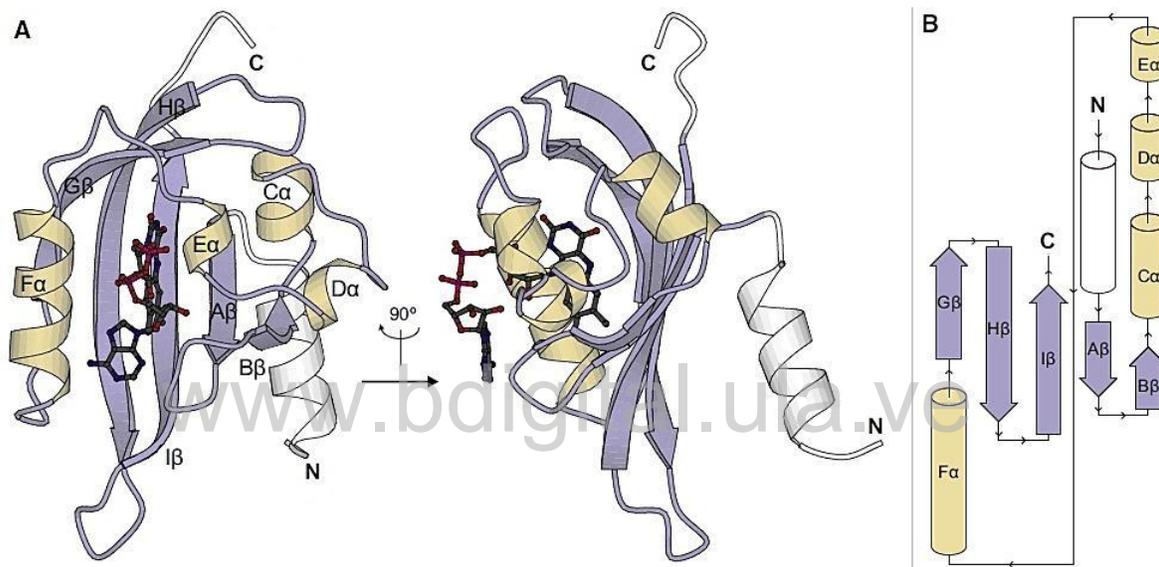
## **Dominios PAS**

El dominio Per-ARNT-Sim (PAS), es un dominio proteico estructural caracterizado como un “dominio versátil”, dado que cumple funciones diversas dentro de los procesos celulares donde participa, principalmente como sensor de señales del ambiente intracelular o extracelular. Este dominio se encuentra ampliamente distribuido en un gran número de proteínas pertenecientes a todos los reinos de vida y ha sido bastante estudiado en los últimos años. Actualmente se encuentran 21000 entradas correspondientes al dominio PAS en la base de datos *Pfam*, como resultado de múltiples investigaciones enfocadas en diversas proteínas; en base a lo cual se sabe que más de 200 poseen tal dominio (Finn et al., 2006; citado por Rojas-Pirela et al., 2018).

Las proteínas con dominios PAS funcionan como sensores celulares, detectando variaciones de oxígeno, luz, potencial redox, entre otros (Taylor & Zhulin, 1999). Los estudios pertinentes sugieren que lo que caracteriza al dominio PAS es su estructura tridimensional, más que la secuencia de aminoácidos; tales estructuras son remarcablemente similares y comparten el grado de flexibilidad conformacional (Vreede et al., 2003). Originalmente, el dominio PAS fue descrito como regiones homólogas en las proteínas Per, ARNT y Sim; luego se identificaron otras regiones adyacentes conservadas denominadas motivos PAC (Nambu et al., 1991). Finalmente, se determinó la estructura tridimensional del dominio PAS por primera vez en la proteína PYP (*photoactive yellow protein*), y se concluyó que ambos motivos PAS y PAC, forman un plegado globular único de 100 residuos conformado por beta láminas y alfa hélices, que es lo que ahora se denomina dominio PAS (Figura 11) (Hefti et al., 2004).

Se ha determinado que los dominios PAS se encuentran predominantemente en proteínas involucradas en transducción de señales; en principio el dominio fue descrito (en eucariotas) en dos tipos de proteínas: factores de transcripción y canales voltaje dependientes

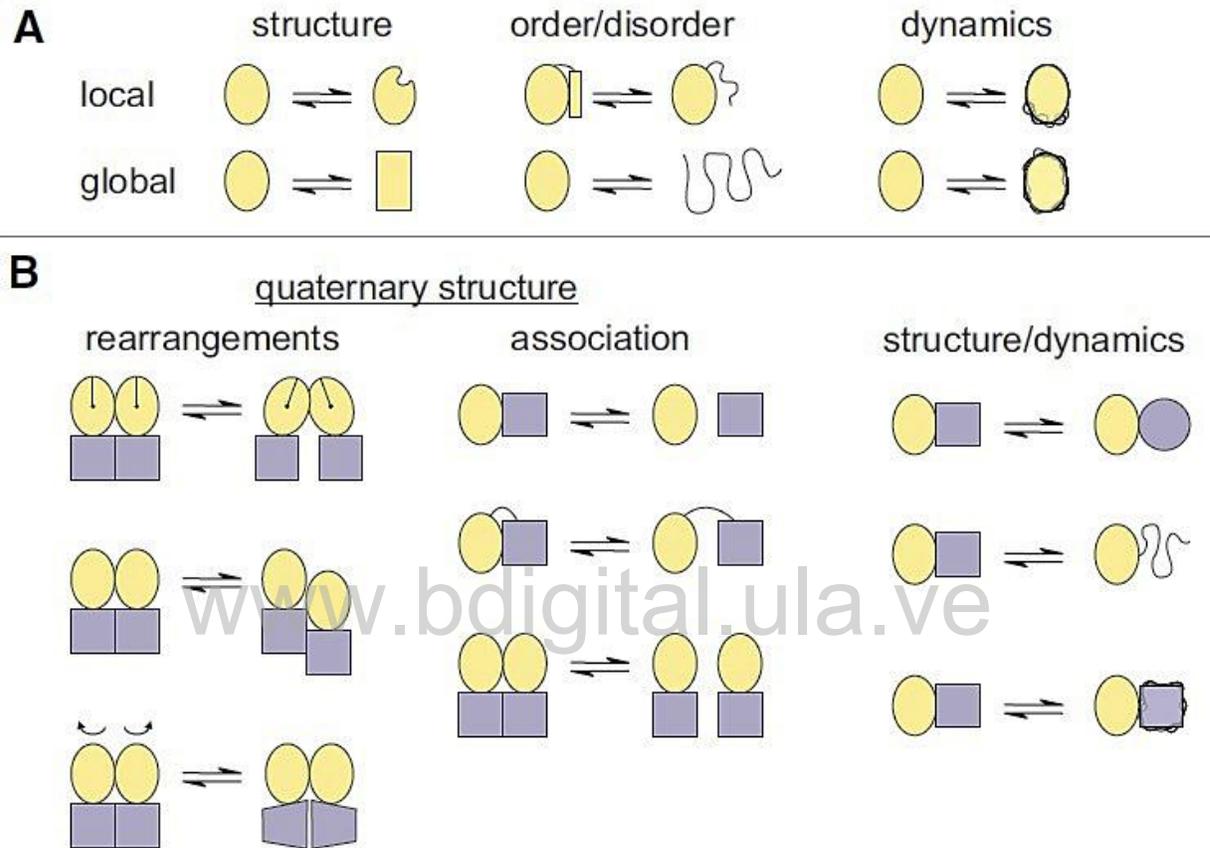
(Taylor & Zhulin, 1999). Recientemente se ha reportado en *Trypanosoma* y *Leishmania major* nuevos tipos de proteínas PAS, entre las cuales se encuentran proteínas con actividad quinasa (Rojas-Pirela et al., 2018; Adhikari et al., 2019). Independientemente del tipo de proteína, el mecanismo general del funcionamiento de un dominio PAS incluye vías de señalización intracelular, en las que básicamente un receptor o sensor en este dominio, detecta un estímulo físico o químico y traduce la señal mediante la regulación de la actividad de algún dominio efector en la proteína; estos son variables, por lo que las proteínas PAS responden de manera diferente a los estímulos (Figura 12) (Möglich et al., 2009).



**Figura 11.** Modelo de un dominio PAS perteneciente a una proteína de *Azotobacter vinelandii*, que presenta la estructura canónica. Se muestran las beta láminas centrales: Aβ, Bβ, Gβ, Hβ e Iβ; además de varias alfa hélices flanqueantes: Cα, Dα, Eα, Fα. (A) Estructura tridimensional. (B) Modelo topológico. Tomado de Möglich et al., 2009

Las señales recibidas por un dominio PAS son propagadas como una combinación de cambios conformacionales y dinámicos, los cuales a su vez pueden ser locales o globales (Figura 12, A) y que generalmente se encuentran asociados a un cofactor que recibe la señal y sus regiones adyacentes; aparentemente, las señales son propagadas desde el núcleo conformado por las láminas beta hasta los dominios efectores donde se modula la actividad biológica. Los dominios efectores a diferencia del dominio PAS varían ampliamente en cuanto a su estructura terciaria, aunque en su estructura cuaternaria suelen funcionar de manera similar, encontrándose como oligómeros, mayormente dímeros. De este modo, la señal recibida puede modular la asociación entre monómeros o dominios individuales, determinando

la estructura cuaternaria de la proteína (Figura 12, B); no obstante, pueden haber también cambios en la estructura terciaria e influir en la dinámica tanto del dominio sensor como del efector, lo cual es aplicable a proteínas monoméricas y oligoméricas (Möglich et al., 2009).



**Figura 12.** Mecanismo de funcionamiento de un dominio PAS. **(A)** Modelos de traducción de señal por el dominio PAS. **(B)** Modelos de propagación de la señal por un dominio efector. Los círculos amarillos representan el dominio PAS y los cuadrados morados representan dominios efectores. Tomado de Möglich et al., 2009

El dominio PAS ha sido reportado para el grupo de kinetoplastidas parásitos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, por lo general se encuentra asociado a proteínas con actividad quinasa, como en el caso de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania major*. Este dominio podría estar involucrado en la detección de los cambios ambientales que estos organismos experimentan debido a su complejo ciclo de vida, el cual involucra distintos hospederos; de este modo el organismo sería capaz de modular procesos metabólicos, de transcripción, actividad enzimática y/o interacciones proteína-proteína, gracias al

funcionamiento de dicho dominio en sus proteínas (Rojas-Pirela et al., 2018; Adhikari et al., 2019).

#### *Proteína PAS-PGK-like en Trypanosoma cruzi*

Recientemente se identificó en *T. cruzi* un gen que codifica para una proteína PGK putativa, que correspondería a una cuarta isoenzima PGK en dicho organismo; esta presenta en su secuencia nucleotídica entre 44-45% de similitud con los genes que codifican para las isoenzimas PGK ya descritas en el parásito, conserva los residuos necesarios para la actividad PGK y además posee un dominio PAS; por lo cual esta proteína se denominó PAS-PGK-like (Barros-Álvarez et al., 2014; Rojas-Pirela et al., 2018).

La proteína PAS-PGK-like posee una señal de importación al peroxisoma (PTS1) en la región C-terminal con secuencia aminoacídica PRL, la cual podría permitir la translocación al glicosoma. En este organelo, al igual que en otros microcuerpos, no ha sido detectado ADN, por lo tanto se deduce que todas las proteínas que allí se encuentran son codificadas por genes nucleares, se sintetizan en el citosol y se translocan, al igual que ocurre en los peroxisomas. Para ello, las proteínas que son dirigidas hacia la matriz glicosomal en muchos casos poseen estas secuencias de importación; un péptido señal PTS (*peroxisomal targeting signal*) de tipo uno (secuencia C-terminal) o de tipo 2 (secuencia N-terminal) que interactúa con receptores de la membrana del microcuerpo (Opperdoes, 1987; Quiñones et al., 2004; Gualdrón-Lopez et al., 2013).

Como resultado de la investigación de Rojas-Pirela et al. (2018) se sabe que la proteína PAS-PGK-like de *T. cruzi* posee el dominio PAS en el extremo N-terminal de la secuencia peptídica, cuyo peso molecular es de 14 kDa, mientras que el peso total de la proteína es de aproximadamente 58 kDa; además, se cree que es expresada en todas las fases del ciclo de vida del parásito (análisis *in silico*). Dicha proteína fue detectada en estudios proteómicos de glicosomas purificados de epimastigotes de *T. cruzi*, y de allí se obtuvo que probablemente esté asociada a la membrana glicosomal de manera periférica y que cumple un rol importante en la fase estacionaria de crecimiento, donde se encontró mayores niveles de expresión (Rojas-Pirela, 2018; Acosta et al., 2019). Es necesario mencionar, que se expresó el péptido correspondiente al dominio PAS completo de la proteína PAS-PGK-like en *E. coli*, y se utilizó

como antígeno para hiperinmunizar un conejo, obteniéndose así el anticuerpo IgG  $\alpha$ -PAS (Rondón, 2018); este será empleado en la presente investigación para los experimentos pertinentes. Dicho anticuerpo reconoce específicamente al dominio PAS, como el que posee la proteína PAS-PGK-like; y no reconoce ninguna de las isoenzimas PGK (Rojas-Pirela, 2019).

A pesar de que en diversos miembros de la familia Trypanosomatidae se encuentran proteínas que contienen dominios PAS, existe muy poca información acerca del rol que cumple este tipo de proteína en tales organismos; en este caso particular, se tiene una proteína PGK que posee un dominio PAS, para la cual no ha sido completamente dilucidada la función que posee. Otro tripanosomátido en el cual ha sido estudiada una proteína del tipo PAS-PGK es *Leishmania major*, organismo en el cual la proteína de interés se encuentra ubicada tanto en el glicosoma como en los lisosomas y está relacionada con la producción de ATP regulada por cambios de pH glicosomal y la autofagia; en este sentido se tiene que la proteína tiene una actividad PGK óptima a pH ácido, que viene dada por cambios conformacionales a nivel del dominio PAS, que es sensible a cambios de pH en el glicosoma. Adicionalmente, la proteína participa en la supervivencia del parásito mediante la regulación de la formación del autofagosoma (Adhikari et al., 2019).

La presencia del dominio PAS en la proteína PAS-PGK-like de *T. cruzi* podría del mismo modo que en *L. major*, estar relacionada con la modulación de su actividad PGK; consecuentemente, participaría en la adaptación metabólica de los parásitos a diferentes ambientes o variaciones particulares del medio en el cual se desarrollan, funcionando como sensor de fuentes de carbono y oxígeno, relacionado con la fosforilación y modulación de la actividad enzimática o el cambio de ubicación subcelular de otras proteínas (Rojas-Pirela et al., 2018). Debido a que la proteína PAS-PGK-like podría tener una implicación relevante en el desarrollo del ciclo de vida de un importante parásito humano, como lo es *Trypanosoma cruzi*; se han realizado diversos estudios para caracterizar esta proteína, de modo que sea posible revelar el rol que desempeña en tal organismo. En el marco de esta línea de investigación se realiza el presente estudio, para dilucidar la ubicación subcelular de la proteína en epimastigotes de *T. cruzi*, empleando las técnicas de centrifugación diferencial y permeabilización selectiva con digitonina; además de evaluar sus niveles de expresión en la curva de crecimiento del parásito, en medio LIT, mediante inmunoensayos.

## II. HIPÓTESIS

Dado que la proteína PAS-PGK-like de *Trypanosoma cruzi* posee un péptido señal de secuencia –PRL, clasificada como PTS1 (*type-1 peroxisomal-targeting signal*) C-terminal; dicha proteína se encuentra localizada subcelularmente en el glicosoma, en la forma epimastigote del parásito.

## III. OBJETIVOS

### Objetivo General

Determinar la ubicación subcelular de la proteína PAS-PGK-like en la forma epimastigote de *Trypanosoma cruzi*, mediante las técnicas de centrifugación diferencial y permeabilización selectiva con digitonina; además de evaluar sus niveles de expresión en una curva de crecimiento.

### Objetivos Específicos

1. Determinar la ubicación subcelular de la proteína PAS-PGK-like en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, empleando la técnica de centrifugación diferencial a partir de un homogenato celular.
2. Determinar la ubicación subcelular de la proteína PAS-PGK-like, aplicando la técnica de permeabilización selectiva con digitonina a células intactas de *Trypanosoma cruzi* en su forma de epimastigote.
3. Evaluar la expresión de la proteína PAS-PGK-like durante el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, en medio LIT.
4. Medir la presencia de las enzimas: Enolasa, Hexoquinasa e Isocitrato Deshidrogenasa, mediante su actividad enzimática e Inmunodetección por *Western Blot*; empleándolas como marcadoras en los estudios de ubicación subcelular de PAS-PGK-like, en las fracciones obtenidas mediante centrifugación diferencial y permeabilización selectiva con digitonina.
5. Inmunodetectar la proteína PAS-PGK-like en las fracciones obtenidas por medio de centrifugación diferencial y permeabilización selectiva con digitonina, mediante ensayos de *Western blot*, ELISA y/o *Dot Blot*, utilizando anticuerpos IgG  $\alpha$ -PAS.

## IV. METODOLOGÍA

### Material biológico

El trabajo experimental fue realizado con epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* de la cepa EP (Elpidio Padrón), los cuales se cultivaron en medio LIT (*Liver infusion triptose*); este un medio de cultivo de tipo complejo, altamente nutritivo, suplementado con suero sanguíneo bovino 5% v/v (inactivado con calor a 56 °C por una hora) obtenido de terneros. Las condiciones de crecimiento comprenden una temperatura de 28°C y agitación constante (60 rpm) para el mantenimiento de un medio aeróbico (Concepción et al., 1999).

Los parásitos fueron recolectados al alcanzar la fase de crecimiento de interés, según los procedimientos experimentales realizados; su nivel de crecimiento fue determinado a partir del valor de absorbancia a 600 nm del cultivo.

### Material químico

A continuación se presentan las soluciones empleadas en cada una de las metodologías realizadas y su composición:

**Tabla 1.** Soluciones para determinación de la concentración de proteínas con el método de Lowry.

Nombre de la solución	Composición
Reactivo A	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2% p/v diluido en NaOH 0,1 N
Reactivo B1	CuSO <sub>4</sub> 1% p/v diluido en agua destilada
Reactivo B2	Tartrato de sodio-potasio 2% p/v diluido en agua destilada
Reactivo C	98 ml de reactivo A, más 1 ml de reactivo B1 y 1 ml de reactivo B2
Reactivo D	Reactivo Folin-Ciocalteu diluido ½ en agua destilada

**Tabla 2.** Soluciones amortiguadoras para los ensayos enzimáticos.

Nombre de la solución	Composición
Tampón HK	Trietanolamina 0,1 M y MgCl <sub>2</sub> 5mM. pH 7,5
Tampón Eno	Tris-base 20 mM, MgSO <sub>4</sub> 2mM y KCl 75mM. HCl hasta pH 7,5.
Tampón IDH	Imidazol 0,1 M y MgCl <sub>2</sub> 4 mM. pH 8,0

**Tabla 3.** Soluciones y tampones empleados para electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Nombre de la solución	Composición
Lower gel buffer	Tris-base 1,5 M y SDS 0,4% p/v en agua destilada. HCl hasta pH 8,8.
Upper gel buffer	Tris-base 0,5 M y SDS 0,4% p/v en agua destilada. HCl hasta pH 6,8.

**Tabla 3.** Continuación

Nombre de la solución	Composición
<i>Sampler buffer</i>	Tris-base 62 mM, SDS 2% p/v, Glicerol 10% v/v y $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM, en agua destilada. Azul de bromofenol hasta obtener la coloración deseada. HCl hasta pH 6,8.
Acrilamida 30%	Acrilamida 29,2% p/v y N,N'-metilén-bis-acrilamida 0,8% p/v en agua destilada.
Solución tampón de corrida	Tris-base 25 mM, Glicina 0,19 M y SDS 0,1% p/v, en agua destilada; pH 8,3.
Solución colorante	Azul de Coomasie R-250 0,25% en Metanol ( <i>stock</i> 50%) 45,4% v/v, añadir ácido acético glacial 9,2% v/v.
Solución decolorante	Ácido acético glacial 7,5% v/v y Metanol 25% v/v, en agua destilada.

**Tabla 4.** Soluciones y tampones empleados para *Western Blot* y *Dot Blot*, en membrana de nitrocelulosa.

Nombre de la solución	Composición
PBS-B	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 80 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 20 mM y NaCl 100 mM en agua destilada; pH 7,4.
Solución bloqueadora-B	Leche descremada 5% p/v y Tween-20 0,1% v/v, en PBS-B.
Solución de Lavado-B	Tween-20 0,1% v/v en PBS-B.
Solución de Incubación-B	Leche descremada 1% p/v en PBS-B.
Solución tampón de Transferencia	Tris-base 48 mM, glicina 38 mM y metanol 20% v/v.
Solución de Revelado DAB	Diaminobenzidina 0,5 mg/ml, $\text{CoCl}_2$ 0,25% v/v y $\text{H}_2\text{O}_2$ 0,5% v/v, en PBS-B.
Solución de Revelado Luminol	Reactivo bipartito constituido por Reactivo A (Luminol) y Reactivo B (un potenciador) utilizado en proporción 40:1, del kit de <i>Amersham Biosciences</i> .
<i>Stripping buffer</i>	Tris-base 62,5 mM, $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM y SDS 2% p/v en agua destilada. HCl hasta pH 6,7.

**Tabla 5.** Soluciones y tampones empleados para el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Nombre de la solución	Composición
PBS-E	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 5 mM, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 15 mM y NaCl 130 mM, en agua destilada; pH 7,2.
Solución tampón de unión	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ 15 mM y $\text{NaHCO}_3$ 35 mM en agua destilada; pH 9,6.
Solución de incubación-E	Reactivo "Diluyente de Muestra" del Kit <i>CruziElisa</i> .
Solución de lavado-E	Tween 20 0,05% v/v en PBS-E.
Solución bloqueadora-E	Tween 20 0,2% v/v y polivinil-alcohol (30-70 kDa) 0,5% p/v, en PBS-E.
Solución de revelado-E	Sistema de sustrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) y HCl 0,5 N para detener la reacción.

**Tabla 6.** Soluciones amortiguadoras para el tratamiento de los parásitos.

Nombre de la solución	Composición
<i>Buffer A</i>	Tris-base 20 mM, Sacarosa 0,225M, EDTA- $\text{Na}_2$ 1 mM, KCl 20 mM, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 10 mM y $\text{MgCl}_2$ 5 mM, en agua destilada; pH 7,2.
<i>Buffer B</i>	Tris-base 25 mM, Sacarosa 0,25M, EDTA- $\text{Na}_2$ 1 mM, NaCl 25 mM, en agua destilada; pH 7,6.
Solución tampón Isosmótico	NaCl 132 mM, KCl 8 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 8 mM, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1,5 mM; pH 7,5.

**Tabla 6.** Continuación

Nombre de la solución	Composición
Coctel de inhibidores de proteasas	Leupeptin 5µg/ml, Inhibidor de tripsina 50µg/ml, Benzamidina 0,16 mg/ml, PMSF 1 mg en 200 µl de metanol, TLCK 37 µg/ml, Antipaina 2,4 mg/ml, Pestatina 2 mg/ml, E-64 2 mg/ml, Quimiostatina 7 mg/ml, Bestatina 6,9 mg/ml, diluido en la solución amortiguadora apropiada.

### Determinación de la concentración de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas de las muestras aplicando el método de Lowry (Lowry et al., 1951), el cual es una valoración colorimétrica cuantitativa donde se emplea un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color resultante, proporcional a la concentración de las mismas. En este caso se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como proteína patrón en un rango de cero a 100 µg de proteína, incubándose por 10 minutos en oscuridad en una solución con 3 ml de Reactivo C y agua destilada para un volumen final de 3,6 ml. Luego, la mezcla es incubada por 30 minutos en oscuridad junto con 300 µl de Reactivo D y finalmente se lee la absorbancia a 600 nm; lo cual se realiza del mismo modo con las muestras problema.

Cabe destacar que en caso de haber sustancias interferentes como la sacarosa, se realizaron diluciones previas a la cuantificación, con factor de dilución entre 0,1 y 0,05; sin embargo, en los procesos en los que esto no fue suficiente para eliminar la interferencia, las proteínas fueron precipitadas. Para este propósito, se añadió a las muestras Deoxicolato de sodio en una concentración de 0,015 % v/v, incubando por 10min a temperatura ambiente; seguidamente, se agregó TCA (ácido tricloroacético) en concentración final de 10% v/v, incubando toda la noche a una temperatura de 4 °C. Por último, se realizó una centrifugación de 25 min a 11000 xg, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento resultante en agua destilada según el volumen original, homogeneizando con potter (Koontz, 2014).

### Determinación de la actividad enzimática

Para determinar la actividad de las proteínas marcadoras se realizaron distintos ensayos enzimáticos, siguiendo (mediante el cambio en la absorbancia en el tiempo) la aparición de NADPH o Fosfoenolpiruvato según cada caso. Para dicho propósito fue necesaria la utilización de un espectrofotómetro de luz UV-visible de arreglo de diodos (Hewlett-Packard

8452 diode array spectrophotometer), se realizaron las mediciones en cubetas de cuarzo de un mililitro, a temperatura ambiente y en caso de ser necesario, las muestras fueron previamente tratadas con Tritón X-100 al 0,1 % y NaCl 150 mM.

En cuanto a las condiciones que difieren entre ensayos, se encuentra la composición de las soluciones amortiguadoras, el orden de adición entre los sustratos y la enzima, el uso de enzimas para las reacciones acoplantes (si fuere necesario), y los sustratos empleados. A continuación se presentan tales particularidades según cada enzima:

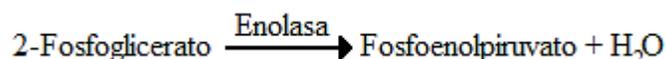
### *Hexoquinasa*

La actividad de esta enzima fue determinada siguiendo la aparición de NADPH, mediante cambios en la absorbancia a 340 nm, en un sistema compuesto por ATP 5,3 mM, Glucosa 4 mM, NADP<sup>+</sup> 0,72 mM y Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa comercial (G6PDH, de *Leuconostoc mesenteroides*, Sigma) 2 U/ml, en tampón HK (Cáceres et al., 2003). La reacción fue iniciada al añadir la muestra en cuestión, acoplándose a la reacción de la enzima G6PDH de la siguiente manera:



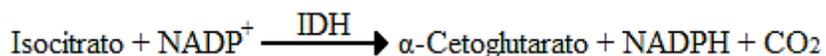
### *Enolasa*

La actividad Enolasa se determinó en un sistema que consta de 2-fosfoglicerato 1 mM en tampón Eno, siguiendo espectrofotométricamente la aparición de Fosfoenolpiruvato a 240 nm y considerando un coeficiente de extinción molar de 1100 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, correspondiente a las condiciones del ensayo (Schurig et al., 1995; Quiñones et al., 2007). La reacción fue iniciada al añadir el sustrato al sistema contenedor de la muestra a evaluar, prosiguiendo como se muestra a continuación:



### *Isocitrato Deshidrogenasa*

Se determinó la actividad enzimática IDH siguiendo la aparición de NADPH espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia de dicho producto a 340 nm; para ello se realizó la mezcla de reacción añadiendo isocitrato 0,5 mM y NADP<sup>+</sup> 0,36 mM en tampón IDH (Bergmeyer, 1983). La reacción se inició al añadir la muestra, desarrollándose de la siguiente manera:



### **Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)**

Con el propósito de separar y posteriormente evaluar las proteínas presentes en las muestras, se realizaron electroforesis en condiciones desnaturalizantes empleando el detergente iónico SDS, según el método propuesto por Weber et al. (1972) con ligeras modificaciones.

Para la preparación de los geles de resolución se utilizó una solución de Acrilamida 30% en concentración final de 12,3% v/v en todos los procedimientos realizados, 1 ml de *Lower gel buffer*, persulfato de amonio en concentración final de 0,15% v/v para iniciar la reacción y TEMED 0,5% v/v para catalizar polimerización; todo diluido en agua destilada, obteniendo un volumen final de 4,08 ml de gel. Por otra parte, el gel concentrador se preparó con una concentración final de 4,9% v/v de acrilamida, 0,15% v/v de persulfato de amonio, 1% v/v de TEMED, 250 µl de *Upper gel buffer* y agua destilada hasta completar un volumen de 2,03 ml de gel (Laemmli, 1970).

Las muestras a evaluar fueron preparadas previo a la corrida electroforética, desnaturalizando las proteínas con calor, sometiéndolas a hervor por cinco minutos junto con *Sampler buffer*, en una proporción mínima de ¼ de solución con respecto al volumen total de la muestra. Seguidamente se procedió con la electroforesis (cantidad de proteína cargada en cada experimento se muestra en las Tablas 7 y 8); llevándose a cabo en los sistemas para mini geles *Hoeffer* o *BioRad*, utilizando solución tampón de corrida, manteniendo el voltaje libre y aplicando corriente fija de 15 mA/gel durante el apilamiento de las proteínas y 20 mA/gel durante la resolución.

En los casos cuyo objetivo fue visualizar las proteínas en el gel, se realizó tinción del mismo con azul de Coomassie, manteniéndolo durante 30 minutos con agitación en la solución colorante y posteriormente en solución decolorante durante toda la noche. Por el contrario, al no ser requerido la visualización de las proteínas directamente en el gel, no se realizó ninguna tinción y los geles fueron preparados para *Western Blot*.

### ***Western Blot y Dot Blot***

Posterior a la separación de las proteínas mediante SDS-PAGE, los geles se equilibraron en tampón de transferencia durante 15 minutos, seguidamente se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa previamente hidratada por dos minutos en agua destilada y equilibrada por 15 minutos en tampón de transferencia. El proceso de transferencia se realizó de manera activa mediante la aplicación de un campo eléctrico en una cámara de transferencia *Semi-dry* (*Amersham biosciences*), durante una hora y media con intensidad de corriente según el área a transferir, igual a  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  (Ausubel et al., 1989).

Una vez transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, se realizó el bloqueo con solución bloqueadora-B durante toda la noche a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ; luego, la membrana fue lavada durante tres intervalos de cinco minutos con agitación, utilizando solución de lavado-B. Se realizaron incubaciones de una hora a temperatura ambiente y con agitación, junto con el anticuerpo primario y consecutivamente con el secundario  $\alpha$ -IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Sigma), ambos diluidos en solución de incubación-B (las diluciones realizadas se muestran en las Tablas 7 y 8), intercalando con lavados triples de cinco minutos con agitación en solución de lavado-B. Finalmente se realizaron tres lavados adicionales de 5 minutos cada uno, con PBS-B y se procedió a revelar (Ausubel et al., 1989). En este estudio se realizaron dos tipos de revelado, uno se realizó con solución de revelado DAB, incubando la membrana hasta observar la señal esperada o hasta transcurrir un tiempo de 30 minutos; el segundo tipo de revelado, se realizó con solución de revelado Luminol, colocando la membrana sobre un mililitro de la misma durante cinco minutos, para luego ser observada en un equipo *ChemiDoc XRS+ System* (Bio Rad).

Para la realización de *Dot Blot* se colocaron 10 µl de las respectivas muestras directamente sobre la membrana de nitrocelulosa, sin que esta haya sido hidratada y equilibrada previamente. Luego, se realizó el mismo procedimiento de bloqueo, incubación con los anticuerpos, lavados y revelado que en el método de *Western Blot* (Hawkes et al., 1982).

### **Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)**

Para esta técnica se utilizaron placas de tipo Immulon 2HB (*Thermo Scientific*). En primer lugar, se realizó la sensibilización de cada pozo con 200 µl del antígeno diluido en tampón de unión (las cantidades de proteína empleadas en cada caso se muestran en la Tabla I, Apéndice) y se realizó una incubación por tres horas a 37°C, seguida de cinco lavados con solución de lavado-E. Luego, se bloqueó durante toda la noche a 4 °C con 200 µl de solución bloqueadora-E, realizando consecutivamente cinco lavados con solución de lavado-E, y posteriormente las incubaciones con los anticuerpos correspondientes; para ello, se diluyeron los anticuerpos primario y secundario (conjugado a peroxidasa) en solución de incubación-E, colocando 200 µl de la solución en cada pozo e incubando a 37 °C durante una hora con cada anticuerpo (definidos en la Tabla I, Apéndice), intercalando nuevamente con cinco lavados. Por último, se reveló la placa con 100 µl de solución de revelado-E a temperatura ambiente, deteniendo la reacción con 50 µl de HCl 0,5 N al obtener la señal de interés o transcurrir un tiempo de 45 minutos; posteriormente se midió la absorbancia a 490 nm (Engvall & Perlmann, 1971), utilizando un lector de ELISA: *ELISA reader* de *Thermo Fisher Scientific*.

### **Centrifugación diferencial**

A partir de un litro de cultivo se colectaron los epimastigotes en fase exponencial (Absorbancia igual a 0,6 a 600 nm), mediante centrifugación a 3000 xg por 20 min con temperatura de 10 °C, seguidamente se lavaron con *Buffer A* dos veces y por último con *Buffer B*, centrifugando también a 3000 xg por 20 minutos y a 10 °C en cada lavado; de modo que se obtuvo las células libres del medio de cultivo.

Una vez aisladas las células, se procedió con la ruptura celular empleando un método abrasivo que consistió en la maceración de los parásitos (previamente lavados), junto con carburo de silicio 200 *mesh* (*Sigma*), en proporción 1:1 y 20 ml de *Buffer B* suplementado con

coctel de inhibidores de proteasas, en un mortero frío. Dicho proceso se realizó hasta obtener un 90% de lisis (observado al microscopio); al lograr tal objetivo se dejó reposar 10 minutos la mezcla de carburo de silicio y parásitos rotos para que el exceso de carburo sedimentara y se realizó una centrifugación del sobrenadante a 300 xg por 5 min a 5°C para obtener el homogenato.

El homogenato se sometió a distintos pasos consecutivos de centrifugación a velocidades crecientes para obtener las fracciones enriquecidas en los distintos componentes celulares: fracción nuclear (FN) a 1000 xg por 10 minutos, fracción granular gruesa (FGG) a 3000 xg por 10 minutos, fracción rica en glicosomas (FRG) a 33000 xg por 15 minutos, fracción microsomal (FM) y fracción citosólica (FC) a 50000 xg por 120 minutos (Steiger et al., 1980; Concepción et al., 1998; Mikkelsen & Cortón, 2004). Las centrifugaciones se realizaron a una temperatura de 5°C y los sedimentos obtenidos correspondientes a las fracciones ya mencionadas, fueron resuspendidos y lavados en *Buffer B* (con inhibidores de proteasas) a máxima velocidad (50000 xg por 120 minutos para FM y 33000 xg por 15 minutos, para el resto de las fracciones).

Se determinó la concentración de proteínas en cada una de las fracciones obtenidas; asimismo, se evaluó la actividad enzimática de enzimas marcadoras de los distintos compartimentos celulares: Hexoquinasa para glicosoma, Enolasa para el citosol e Isocitrato Deshidrogenasa para citosol y mitocondria. A partir de los resultados obtenidos, se graficó la actividad específica de las enzimas marcadoras con respecto al porcentaje de proteína acumulada en cada fracción; adicionalmente, se detectó mediante *Western Blot* la enzima PPDK, como marcadora del compartimento glicosomal, empleando anticuerpos producidos en conejo (González-Marcano et al., 2014).

La proteína objeto del presente estudio: PAS-PGK-like; se visualizó en las fracciones obtenidas mediante centrifugación diferencial, utilizando las técnicas: *Western blot* y *Dot Blot*, empleando anticuerpos IgG  $\alpha$ -PAS producidos en conejo (Rondón, 2018). Se realizaron distintas pruebas de ELISA, estandarizando las concentraciones de los anticuerpos, el tratamiento de las muestras y las concentraciones de proteínas a emplear para la sensibilización de los pozos; de igual manera, se realizaron distintos ensayos de tipo *Western Blot*, probando dos métodos de revelado. Los inmunoensayos realizados se denotan con un

código y las condiciones específicas aplicadas en cada uno de ellos se muestran en el Apéndice (Tabla I).

### **Permeabilización selectiva de epimastigotes por tratamiento con digitonina**

Los parásitos en fase estacionaria (Absorbancia igual a 1,2 a 600nm), fueron colectados a partir de 100 ml de cultivo centrifugándose a 3000 xg por 20 minutos con temperatura de 10 °C; luego fueron lavados dos veces con solución tampón isosmótico, centrifugando a 3000 xg por 20 minutos con temperatura de 10 °C en cada lavado, obteniendo así células libres del medio de cultivo. El sedimento celular obtenido se resuspendió en 15 ml de solución tampón isosmótico, para una concentración de 14 mg/ml (determinado por el método de Lowry); a partir de allí se tomaron alícuotas, de modo que los parásitos fueron separados en fracciones equivalentes a un miligramo de proteína, en un volumen final de 500 µl de tampón isosmótico suplementado con inhibidores de proteasas (Concepción et al., 1998).

Se agregaron concentraciones crecientes de digitonina a cada una de las fracciones ya definidas, abarcando un rango de entre 5 y 500 µg de digitonina por miligramo de proteína de parásito. La digitonina fue preparada en solución tampón isosmótico, en baño de María a 50 °C, agitando hasta obtener una solución homogénea y cristalina, de concentración inicial correspondiente a 5 mg/ml. Las fracciones fueron incubadas durante 20 minutos, agitando suavemente; una vez transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 14000 xg durante 5min, a fin de separar sobrenadantes y sedimentos (Hannaert et al., 1992; Concepción et al., 1998). Estos últimos fueron lavados con solución tampón isosmótico, centrifugando de nuevo a 14000 xg por 5 minutos y posteriormente preparados para *Western blot* en 100 µl de *Sampler buffer*.

Se midió la actividad de las enzimas marcadoras Enolasa, Hexoquinasa e Isocitrato Deshidrogenasa (dependiente de NADP<sup>+</sup>), en los sobrenadantes resultantes; los resultados obtenidos fueron representados en gráficos de porcentaje de actividad enzimática en función de la concentración de digitonina para cada fracción, considerando el 100% de actividad al tubo con mayor valor para cada enzima. Asimismo, se realizaron ensayos inmunológicos de *Western blot* para la detección de PAS-PGK-like, Hexoquinasa y Enolasa; empleando anticuerpos primarios producidos en conejo, por Rondón (2018), Cáceres et al. (2003) y

Quiñones et al. (2007), respectivamente; evaluando tanto los sobrenadantes como los sedimentos obtenidos.

En los *Western blot* se realizaron distintos revelados sobre la misma membrana, observando tanto la proteína de interés como las proteínas marcadoras (WB4 y WB5); para ello se aplicó la técnica de *Stripping* (*Amersham Biosciences*), la cual se lleva a cabo removiendo totalmente los anticuerpos de la membrana, incubando durante 30 minutos en *Stripping buffer* a 50 °C en agitación. Seguidamente se lavó la membrana tres veces por cinco minutos con solución de lavado-B y se repitió el proceso de bloqueo con solución bloqueadora-B durante toda la noche a 4 °C o durante una hora a temperatura ambiente, seguido de las incubaciones con los respectivos anticuerpos, durante una hora a temperatura ambiente, realizando los lavados pertinentes. Finalmente se procedió a revelar, empleando nuevamente solución de revelado Luminol y repitiendo el proceso cuantas veces fue necesario, según el número de proteínas a detectar. Las características particulares del método y el código que denota a cada uno de los ensayos realizados, se describen en el Apéndice (Tabla II).

### **Evaluación de la expresión de PAS-PGK-like durante el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***

Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* de la cepa EP, fueron cultivados en medio LIT, suplementado con suero sanguíneo bovino 5% v/v (inactivado con calor a 56 °C por una hora) obtenido de terneros. Las condiciones de crecimiento comprenden una temperatura de 28°C y agitación constante a 60 rpm (Concepción et al., 1999). Se cultivó un preinóculo hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial (Absorbancia 0,5 a 600 nm), a partir del cual se inocularon 10 matraces que contenían 10 ml de medio LIT cada uno, para una concentración inicial de  $2,5 \times 10^6$  parásitos/ml; estos se mantuvieron bajo las mismas condiciones de crecimiento durante máximo siete días.

La proliferación celular fue seguida mediante medición de la absorbancia a 600 nm y conteo del número de células, utilizando cámara de Neubauer; el resultado obtenido fue representado gráficamente en una curva de crecimiento, mostrando el valor de absorbancia con respecto al día de medición.

Se consideró un matraz por día, realizando las medidas mencionadas y posteriormente cosechando los parásitos mediante centrifugación a 3000 xg por 10 minutos a 9°C; seguidamente, los parásitos fueron lavados dos veces con solución tampón isosmótico centrifugando de la misma manera. El sedimento obtenido diariamente, fue almacenado a -20 °C para su posterior análisis.

Una vez transcurrido los siete días de crecimiento, se cuantificó la concentración de proteínas en tres puntos de la curva, correspondientes a distintas fases de crecimiento: dos de fase exponencial (días tres y cinco) y uno de fase estacionaria (día siete). Conociendo el número de parásitos (según el conteo en cámara de Neubauer realizado previamente) y la cantidad de proteínas totales (por medio del método de Lowry) en dichos puntos, se calculó un factor de  $5,55 \times 10^{-6}$  µg de proteína por parásito; con el cual se estimó la cantidad total de proteína para el resto de las muestras. Según la proporción de proteína presente en cada punto, los sedimentos fueron resuspendidos en solución tampón isosmótico; luego, las muestras se sometieron al pasaje a través de una aguja de insulina hasta eliminar la viscosidad (rompiendo el ADN presente), y por último se prepararon para SDS-PAGE con *Sampler Buffer*.

Las fracciones resultantes fueron analizadas mediante *Western Blot*, cargando 80 µg de proteína para cada punto de la curva. Se emplearon anticuerpos IgG α-PAS (Rondón, 2018) dilución 1/1000 y α-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (*Sigma*) dilución 1/4000, revelando con solución de revelado Luminol. En este caso también se realizó *Stripping*, de modo que posterior al revelado de la proteína PAS-PGK-like, se reveló la proteína Enolasa (control) en la misma membrana (WB10A/WB10B), empleando anticuerpos IgG α-Enolasa (Quiñones et al., 2007) dilución 1/2000 y α-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (*Sigma*) dilución 1/4000.

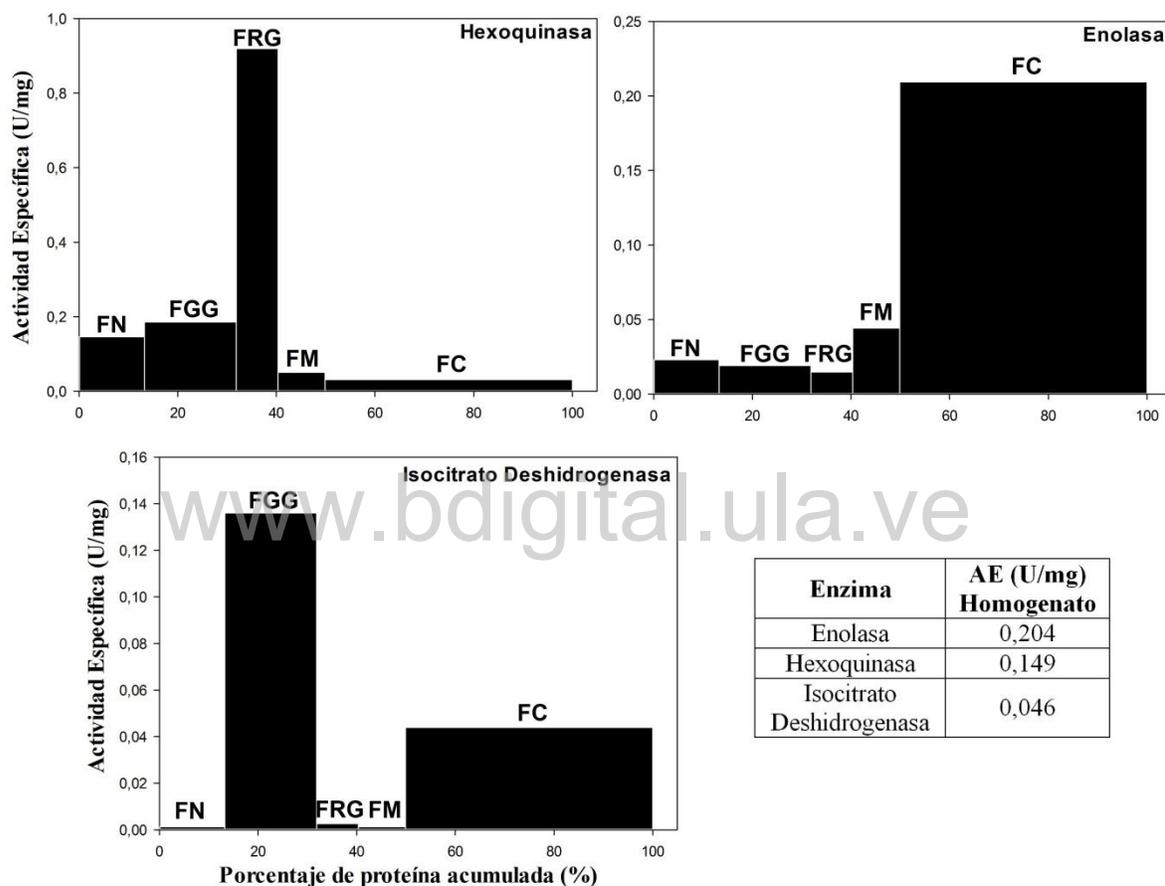
### Centrifugación diferencial

Mediante el método de centrifugación diferencial se obtienen fracciones enriquecidas en los distintos componentes celulares, los cuales son separados según su coeficiente de sedimentación mediante la aplicación de fuerza centrífuga. En las fracciones obtenidas al realizar este procedimiento, se evaluó la actividad específica de las enzimas marcadoras, así como también se determinó la concentración de proteína correspondiente. La cantidad de proteína recuperada en las fracciones corresponde al 92% de las proteínas que se tenían inicialmente en el homogenato, distribuidas en las proporciones esperadas y reportadas previamente; también se encontró que las actividades de las enzimas marcadoras se enriquecen en los compartimientos esperados, tal como se observa en la Figura 13 (Concepción et al., 1999, 2001; Denicola et al., 2002; Cáceres et al., 2003; Domingo-Sananes & Concepción, 2004; Quiñones et al., 2007).

La actividad Hexoquinasa se ve enriquecida seis veces en la FRG con respecto al homogenato, siendo esta un marcador glicosomal. La actividad Enolasa se recuperó al 100% en la FC, aunque no hubo enriquecimiento con respecto al homogenato, se evidencia la presencia de esta enzima principalmente en el citosol dado que en ninguna otra fracción se registró actividad similar. Del mismo modo se encontró un enriquecimiento de la actividad Isocitrato Deshidrogenasa de tres veces en FGG y se observa también su presencia en FC, aunque en esta fracción no hay un enriquecimiento de la actividad con respecto al homogenato, ya que presentó la misma actividad específica. Este comportamiento se debe a que IDH es un marcador dual: esta enzima corresponde canónicamente a la mitocondria, pero debido al tratamiento abrasivo aplicado en este tipo de ensayo para la ruptura celular, el mitocondrion se fragmenta y libera parte de las proteínas al citosol; adicionalmente, se ha reportado la presencia de una isoenzima citosólica en *T. cruzi* (Leroux et al., 2011), por lo cual la actividad IDH se ve reflejada también en este compartimiento (Figura 13).

La distribución de la proteína PAS-PGK-like, en principio, fue evaluada en las fracciones resultantes mediante ELISA, con el fin de inmunodetectar y cuantificar de la proteína en los distintos compartimientos celulares (Tabla I, Apéndice). Se realizaron distintas

pruebas preliminares para la estandarización de las concentraciones de los anticuerpos, la solución de bloqueo y los controles a emplear; de allí que en la mayoría de los casos se utilizó el anticuerpo primario IgG  $\alpha$ -PAS diluido 1/200 y el secundario  $\alpha$ -IgG de conejo diluido 1/2000, se tomó como estándar la solución bloqueadora-E, se realizó un control positivo con el dominio PAS recombinante y un control negativo que constó del antígeno (FRG) con anticuerpo secundario en ausencia del anticuerpo primario.

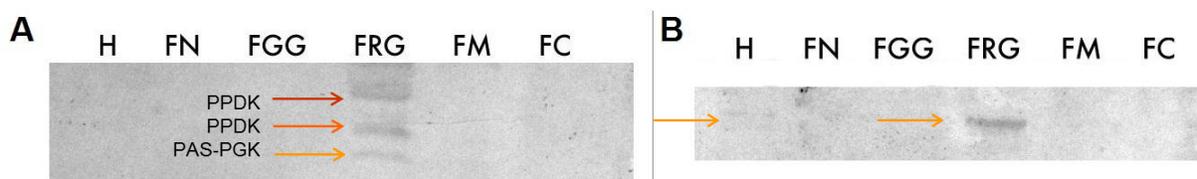


**Figura 13.** Distribución de la actividad específica de las enzimas marcadoras: Enolasa, Hexoquinasa e Isocitrato Deshidrogenasa; en fracciones obtenidas mediante centrifugación diferencial de un homogenato celular de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Se muestra la actividad específica de cada enzima en función del porcentaje de proteína acumulada en cada fracción. Las barras se muestran en concordancia al orden en el cual son obtenidas las fracciones: Nuclear (FN), Granular Gruesa (FGG), Rica en Glicosomas (FRG), Microsomal (FM) y Citosólica (FC). Se muestra la actividad específica (AE) de cada enzima en el homogenato inicial, en la tabla anexa.

En los ensayos restantes se probaron diferentes condiciones para determinar la causa de la ausencia de señal: se descartó la posibilidad de degradación de la proteína de interés repitiendo el proceso de centrifugación diferencial, obteniendo nuevas fracciones y evitando el uso de muestras congeladas repetidas veces; asimismo se probó distintas concentraciones de

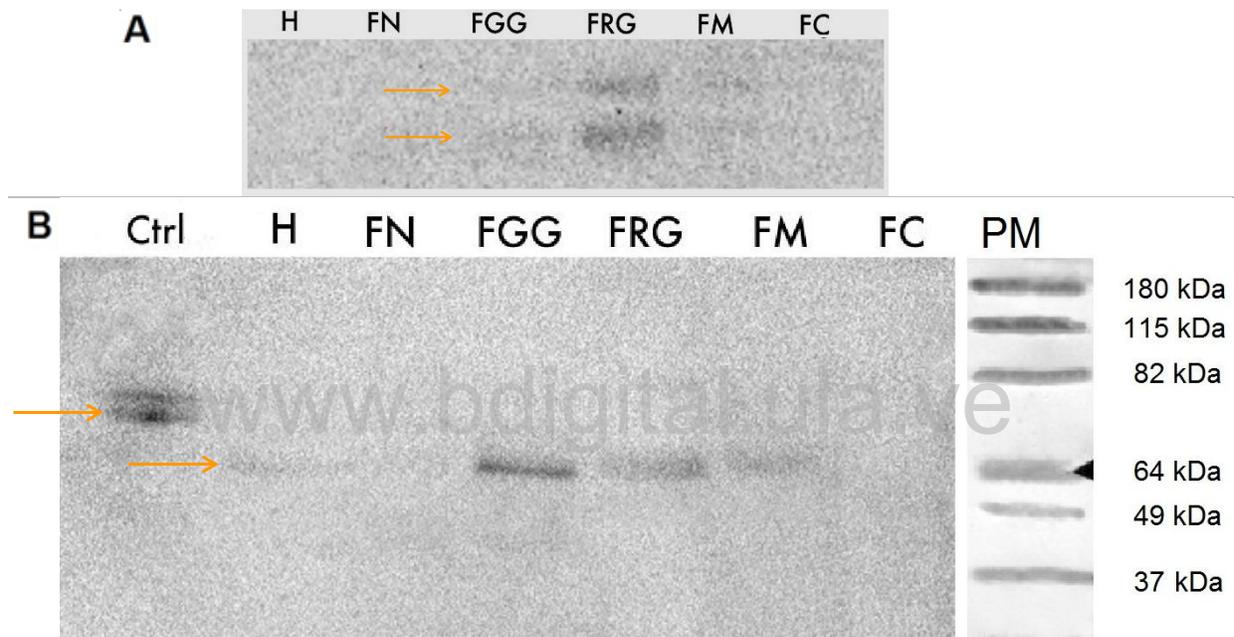
antígeno e incluso se realizó la sensibilización de los pozos no solo con las proteínas en su conformación nativa sino también desnaturalizadas con urea y en ausencia de detergente. A pesar de las distintas variables evaluadas (Tabla I, Apéndice), no se obtuvo señal en ninguno de los pozos correspondientes a las muestras, únicamente se obtuvo una señal reproducible en el pozo correspondiente al control positivo (dominio PAS recombinante); por lo tanto, existe un problema de unión de la proteína PAS-PGK-like a la superficie de las placas utilizadas y para llevar a cabo de manera satisfactoria ensayos de tipo ELISA con éste antígeno, deben realizarse pruebas adicionales empleando otro tipo de pozos con distinta afinidad de unión.

La inmunodetección de la proteína PAS-PGK-like, en las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial, finalmente se realizó mediante *Western Blot*. En todos los procedimientos se utilizó la dilución de 1/1000 para IgG  $\alpha$ -PAS y 1/2000 para el anticuerpo secundario  $\alpha$ -IgG de conejo. En los ensayos WB2 y WB3 se observó una banda correspondiente a la proteína de interés ubicada en la FRG (Figura 14); en el caso de WB2 también se emplearon anticuerpos IgG  $\alpha$ -PPDK (dilución 1/1000), por lo cual la banda correspondiente a PAS-PGK-like se encuentra junto a dos bandas adicionales que corresponden a la proteína PPDK en sus dos isoformas de 100 KDa y 75 KDa (Figura 14, A), en concordancia a lo previamente reportado (González-Marcano et al., 2014). En WB3 solo fueron empleados anticuerpos IgG  $\alpha$ -PAS (dilución 1/1000), como resultado se observa una banda única de PAS-PGK-like en la misma fracción FRG y además se obtuvo una tenue señal en el homogenato a la misma altura, que correspondería también a dicha proteína (Figura 14, B).



**Figura 14.** Inmunodetección de la proteína PAS-PGK-like en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial y evaluadas mediante *Western Blot*. Revelado con diaminobenzidina, carga equivalente a 50  $\mu$ g de proteína de cada fracción. Las flechas amarillas indican las bandas correspondientes a la proteína PAS-PGK-like. H: homogenato, FN: fracción nuclear, FGG: fracción granular gruesa, FRG: fracción rica en glicosomas, FM: fracción microsomal, FC: fracción citosólica. (A) Se emplearon los anticuerpos primarios IgG  $\alpha$ -PAS (dilución 1/1000) e IgG  $\alpha$ -PPDK como marcador glicosomal (dilución 1/1000). (B) Se incubó con anticuerpo primario IgG  $\alpha$ -PAS (dilución 1/1000).

Para incrementar la sensibilidad del método y apreciar bandas que podrían haber pasado desapercibidas al revelar con DAB, se empleó un revelado alternativo utilizando Luminol (*Amersham Biosciences*). En la Figura 15, se observan los resultados obtenidos de estos inmunoensayos; en WB7 (Figura 15, A) se evidencia nuevamente la presencia de PAS-PGK-like principalmente en FRG y además se aprecian señales tenues en las fracciones FGG y FM, lo cual podría ser indicio de una ubicación dual; mientras que la aparición de dos bandas de diferente peso molecular sería producto de degradación parcial de la proteína, por el tiempo de almacenamiento de las muestras.



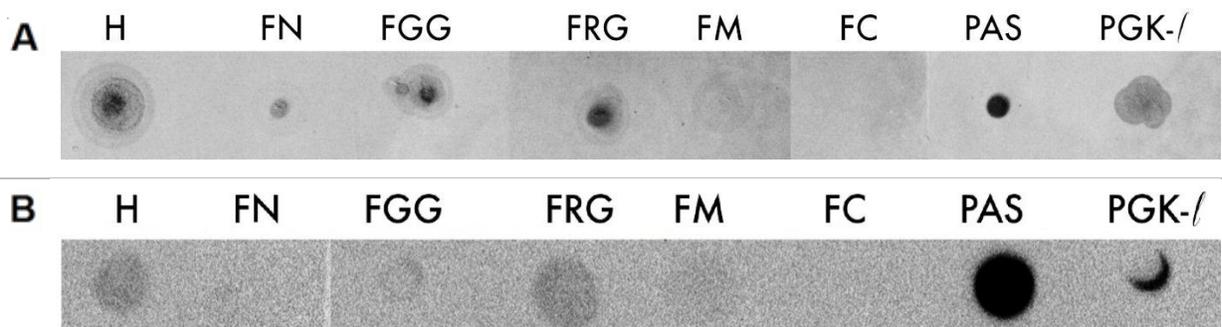
**Figura 15.** Inmunodetección de la proteína PAS-PGK-like en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial y evaluadas mediante *Western Blot*. Revelado con luminol. Se empleó como anticuerpo primario IgG  $\alpha$ -PAS (dilución 1/1000). Las flechas amarillas indican las bandas correspondientes a PAS-PGK-like. H: homogenato, FN: fracción nuclear, FGG: fracción granular gruesa, FRG: fracción rica en glicosomas, FM: fracción microsomal, FC: fracción citosólica. (A) Carga equivalente a 50  $\mu$ g de proteína de cada fracción. (B) Carga equivalente a 80  $\mu$ g de proteína de cada fracción. Los números a la derecha de las bandas denotan su peso molecular aproximado, expresado en kiloDaltons (kDa). Ctrl: control PAS-PGK-like recombinante, PM: marcadores de peso molecular (*Invitrogen*).

El ensayo WB9 (Figura 15, B) muestra las bandas correspondientes a PAS-PGK-like en las muestras obtenidas y a la proteína recombinante, de mayor peso molecular; en este caso se emplearon marcadores (*Invitrogen*) y se observa que la proteína nativa se localiza en un nivel similar a la banda correspondiente a 64 kDa, cercano a su peso molecular reportado de 58 kDa. Las bandas observadas indican que la proteína se distribuye principalmente en las fracciones FGG, FRG y FM, estando enriquecida en FGG y FRG; este resultado continúa

demostrando una posible ubicación dual de la proteína, siendo en este caso la banda más notoria en FGG, a diferencia de los ensayos anteriores donde la proteína se observó mayoritariamente en FRG, esta diferencia puede deberse a la diferencia en la cantidad de proteína cargada en cada ensayo (50 µg/80 µg provenientes de la misma ruptura), y al diferente tiempo en el almacenamiento de las muestras.

Adicionalmente se realizaron ensayos tipo *Dot Blot* (Figura 16), el DB6 se realizó con el propósito de demostrar que el anticuerpo empleado (IgG α-PAS) no solo reconoce epítopes lineales en el dominio PAS desnaturalizado, como se observó en los *Western Blot* realizados; sino que también reconoce al dominio PAS en su conformación nativa, lo cual se confirma con el resultado obtenido (Figura 16, A). En este ensayo se evidencia la presencia de PAS-PGK-like principalmente en FRG y FGG además del homogenato; sin embargo, las señales no son comparables entre sí, debido a que los 10 µl de cada muestra, corresponden a distintas cantidades de proteína.

Para obtener señales comparables mediante *Dot Blot* se realizó el DB8, en el cual se colocaron puntos equivalentes a 50 µg de proteína de cada una de las fracciones; además fue revelado con Luminol, que a diferencia del revelado con DAB, permite distinguir la señal química generada por la presencia de la proteína de interés, de la coloración propia de las fracciones. El resultado obtenido confirma la presencia de la proteína PAS-PGK-like en FRG y permite distinguir nuevamente señal en las fracciones FGG y FM (Figura 16, B).



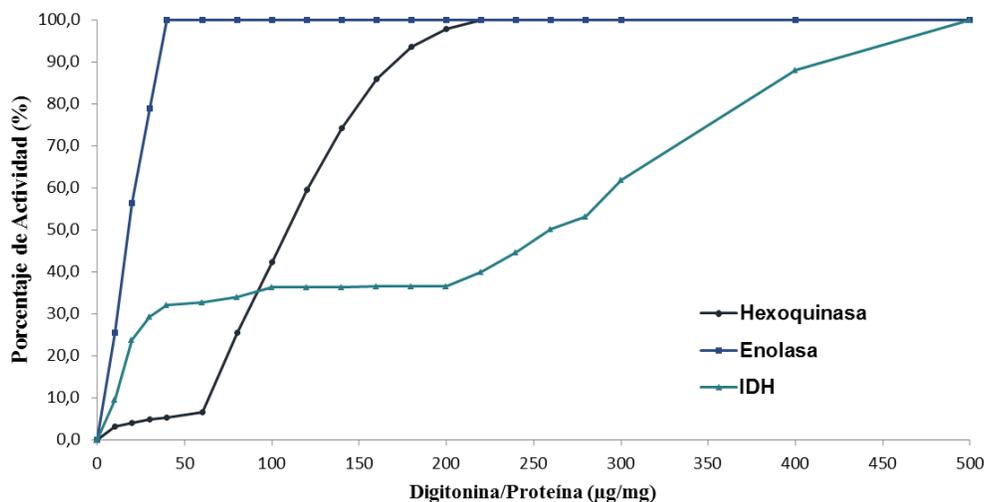
**Figura 16.** Inmunodetección de la proteína PAS-PGK-like en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial, evaluadas mediante *Dot Blot*. Se empleó como anticuerpo primario IgG α-PAS (dilución 1/1000). H: homogenato, FN: fracción nuclear, FGG: fracción granular gruesa, FRG: fracción rica en glicosomas, FM: fracción microsomal, FC: fracción citosólica, PAS: control dominio PAS recombinante (10µl), PGK-/: control PAS-PGK-like recombinante (10 µl). (A) Cada punto corresponde a 10 µl de muestra. Revelado con diaminobenzidina. (B) Cada punto corresponde a 50 µg de proteína de cada fracción. Revelado con Luminol.

## **Permeabilización selectiva de epimastigotes por tratamiento con digitonina**

Este método se basa en la interacción de la digitonina con los lípidos neutros de las membranas biológicas (ergosterol); debido a que estos se encuentran distribuidos desigualmente en las membranas de los organelos y la membrana plasmática, al variar la concentración de digitonina, se permeabilizan diferencialmente los compartimientos celulares (Fiskum et al., 1980).

Las fracciones obtenidas con este tratamiento, muestran la permeabilización progresiva de las células según concentraciones crecientes de digitonina; por lo tanto, para identificar los organelos que son permeabilizados a determinada concentración del detergente, se midió la actividad de enzimas solubles características de los compartimientos, siendo liberadas cuando los mismos son permeabilizados: Enolasa para citosol, Hexoquinasa para glicosoma e Isocitrato Deshidrogenasa para citosol y mitocondria.

En la Figura 17 se muestra el perfil de liberación de la actividad enzimática de los marcadores ya mencionados; en cuanto a la Enolasa, la actividad se evidencia desde las concentraciones más bajas de detergente siendo la primera proteína liberada y alcanzando el 100% de actividad con apenas 40  $\mu\text{g}$  de digitonina/mg de proteína, lo cual indica el punto a partir del cual ha ocurrido la permeabilización total de la membrana plasmática. Asimismo, se tiene que la actividad Isocitrato deshidrogenasa comienza a liberarse a bajas concentraciones de digitonina, generando inicialmente un perfil similar a la enzima Enolasa y alcanzando aproximadamente 40% de actividad liberada a partir de 100  $\mu\text{g}/\text{mg}$  del detergente, lo cual corresponde a la enzima ubicada en el citosol; seguidamente, se observa un incremento del porcentaje de actividad liberada a partir de la concentración de digitonina igual a 200  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , lo cual corresponde entonces a la enzima IDH presente en la mitocondria, alcanzando el 100% de actividad liberada en la concentración máxima empleada (500  $\mu\text{g}$  de Digitonina/mg de proteína). Por su parte, la actividad Hexoquinasa comienza a liberarse a partir de 60  $\mu\text{g}$  de digitonina/ mg de proteína (la actividad previa puede deberse a ruptura mecánica), pero a partir de este punto aumenta progresivamente hasta alcanzar el 100% de actividad con la cantidad de detergente igual a 200  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , marcando así la permeabilización total del glicosoma.

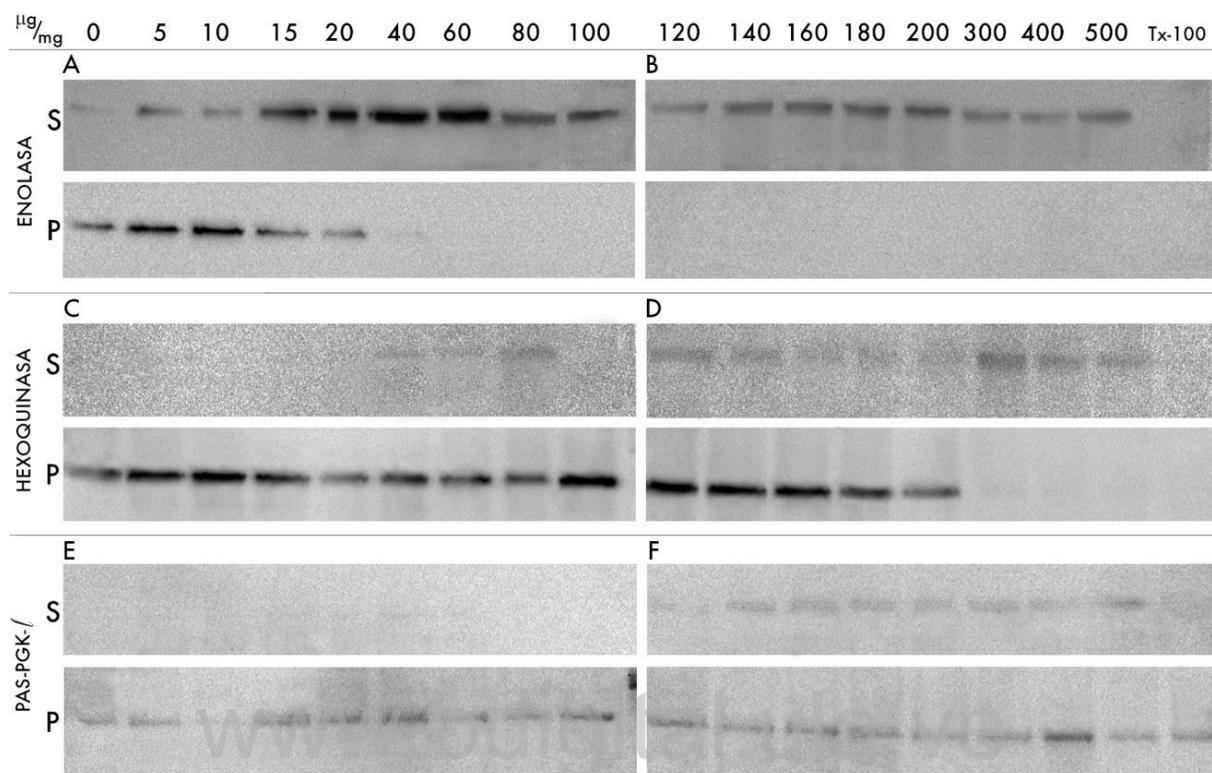


**Figura 17.** Perfil de liberación de la actividad enzimática de las proteínas marcadoras: Hexoquinasa, Enolasa e Isocitrato Deshidrogenasa; en sobrenadantes obtenidos por tratamiento con digitonina de células de *Trypanosoma cruzi*. Se muestra el porcentaje de actividad liberada en función de la concentración de digitonina empleada en la permeabilización.

Lo antes descrito indica que luego de permeabilizar la membrana plasmática y ser liberado el contenido citosólico, son permeabilizados los glicosomas, lo cual coincide con datos reportados en otros estudios (Domingo-Sananes & Concepción, 2004; Quiñones et al., 2007). El resultado obtenido al igual que otras investigaciones previas, demuestran que la permeabilización del glicosoma es seguida por la permeabilización total del mitocondrion, que conlleva a la liberación concomitante de la actividad de enzimas marcadoras de tal organelo, como lo es IDH, alcanzando el 100% de actividad cerca de los 500 µg de digitonina por miligramos de proteína (Barros-Álvarez et al., 2015).

Además de detectar los marcadores enzimáticos mediante su actividad, también se observó el patrón de liberación de los mismos en los sobrenadantes y sedimentos obtenidos, mediante *Western Blot*. En concordancia a los valores de actividad enzimática, la proteína Enolasa (Figura 18, A y B), se inmunodetecta desde la primera concentración del detergente (5 µg/mg), siendo la primera proteína liberada y alcanzando el 100% a 40 µg de digitonina/mg de proteína; punto a partir del cual no es inmunodetectada en los sedimentos (Figura 18, A) y permanece la señal relativamente constante en los sobrenadantes (Figura 18, B). De la misma manera ocurre con Hexoquinasa, similar a lo obtenido por medición de la actividad enzimática, esta proteína se observa en mayor proporción en sobrenadantes, luego de 60 µg de digitonina/mg de proteína; entre 40 y 60 µg/mg, aparecen señales más tenues y a partir de allí

la señal aumenta (Figura 19, C), alcanzando el 100% de liberación luego de los 200  $\mu\text{g}/\text{mg}$  del detergente (Figura 19, D).



**Figura 18.** Inmunodetección de las proteínas Enolasa, Hexoquinasa y PAS-PGK-like, en sobrenadantes y sedimentos de las fracciones obtenidas por permeabilización selectiva con digitonina, evaluadas mediante *Western Blot*. Revelado con Luminol, carga igual a 20  $\mu\text{l}$  de cada fracción. Las señales se revelaron sobre dos membranas de nitrocelulosa, una para los sobrenadantes y otra para los sedimentos. Los números sobre los carriles indican la concentración de digitonina empleada ( $\mu\text{g}$  digitonina/mg proteína). P: Sedimento. S: Sobrenadante. Tx-100: tratamiento de Tritón X-100 0,1% más NaCl 150 mM. (A)(B) Se empleó como anticuerpo primario IgG  $\alpha$ -Enolasa (dilución 1/2000). (C)(D) Se empleó como anticuerpo primario IgG  $\alpha$ -HK (dilución 1/2000). (E)(F) Se empleó como anticuerpo primario IgG  $\alpha$ -PAS (dilución 1/1000).

Al evaluar la proteína de interés PAS-PGK-like; se observa que es liberada partir de 120  $\mu\text{g}$  de digitonina/mg de proteína siendo la señal mucho más tenue en este punto inicial y enriqueciéndose a partir de 140  $\mu\text{g}/\text{mg}$  (Figura 18, E y F). Debido a que se obtuvo señal constante en los sobrenadantes en el rango de 120 a 500  $\mu\text{g}$  de digitonina/mg de proteína (Figura 18, F), se confirma con este método, que la proteína PAS-PGK-like se ubica subcelularmente en el glicosoma, sin descartar su presencia en otros compartimientos; también es evidente que existe un retraso en su liberación, con respecto al marcador glicosomal HK (Figura 18, C y E). Asimismo, se encontró señal constante en los sedimentos, incluso después de 200  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , cuando según el perfil de HK, ya se ha liberado el 100% del contenido del

glicosoma (Figura 18, D y F). Por ende, el comportamiento observado indica que la proteína de interés, corresponde a una proteína asociada de manera no covalente a la membrana glicosomal, en concordancia a lo obtenido por Acosta et al. (2019).

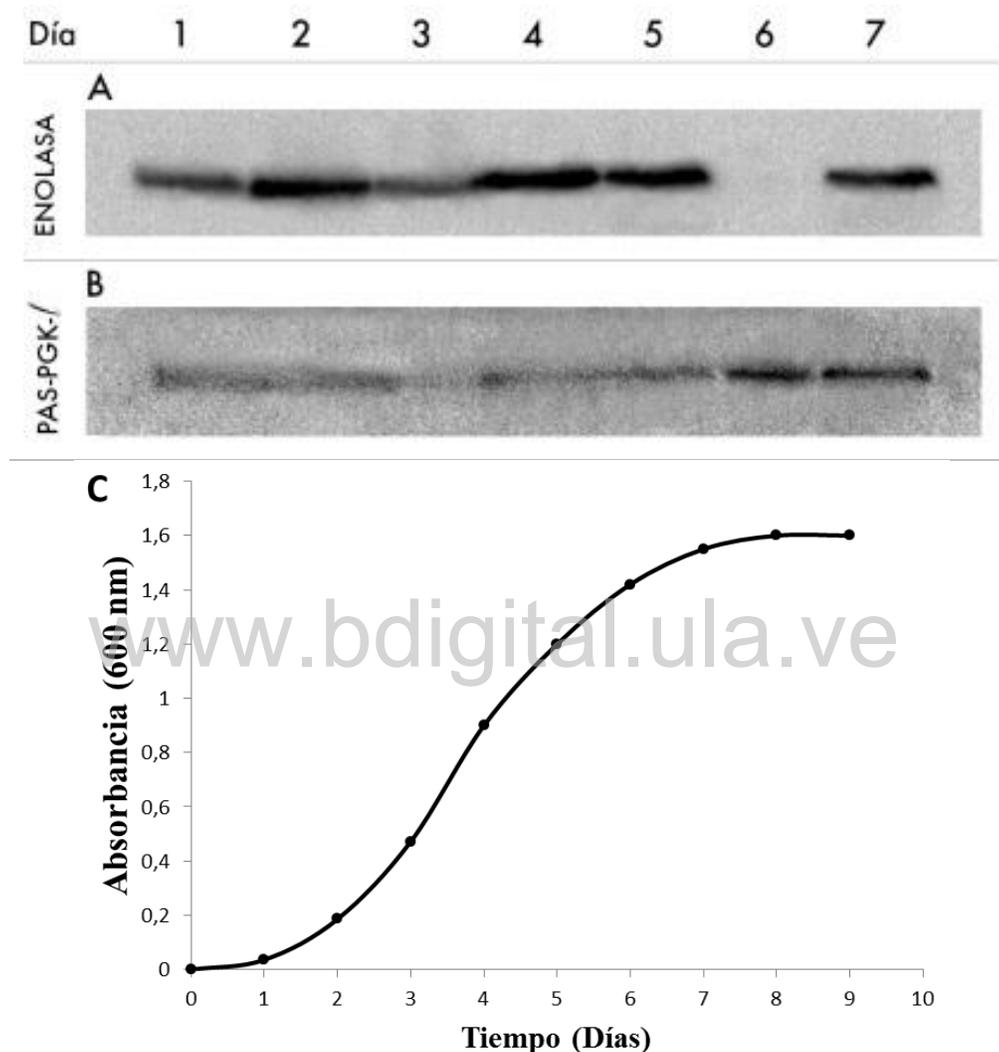
### **Expresión de PAS-PGK-like en la curva de crecimiento de *Trypanosoma cruzi***

Mediante el monitoreo del crecimiento de un cultivo de epimastigotes en un medio determinado y detección de las proteínas de interés en muestras obtenidas periódicamente, durante un tiempo establecido; es posible probar si existe expresión diferencial de la proteína según la fase de crecimiento del parásito, lo cual depende del proceso de proliferación celular en un medio de cultivo cambiante en cuanto a disponibilidad de nutrientes se refiere. En este sentido, se evaluó la expresión de la proteína PAS-PGK-like, empleando la técnica de *Western Blot* con muestras obtenidas diariamente de un cultivo celular de *T. cruzi* en medio LIT, durante siete días.

Al llevar a cabo esta metodología, es necesario evaluar una proteína marcadora cuyos niveles de expresión sean constantes durante todo el crecimiento del cultivo, a fin de corroborar que la cantidad de proteína evaluada por cada muestra sea la misma. De este modo, al observar diferencias de intensidad en las bandas de la proteína en cuestión, se tiene certeza de que es consecuencia de las variaciones en sus niveles de expresión y no es producto artefactos experimentales. En este caso, se usó como marcador a la proteína Enolasa, sobre la cual se sabe que posee niveles de expresión constantes en epimastigotes de *T. cruzi* (González, 2006). En función de tales niveles de expresión, se observa la señal esperada para esta proteína marcadora (Figura 19, A); siendo la intensidad de las bandas similar y relativamente constante, en diferentes puntos a lo largo de los siete días de crecimiento evaluados.

El resultado obtenido para la expresión de la proteína Enolasa muestra discrepancias en cuanto a la intensidad de las bandas, a pesar de que el comportamiento general indica que hay una expresión constante durante la curva de crecimiento (Figura 19, A). Esto es probablemente consecuencia del tratamiento de *Stripping*, el cual al ser realizado varias veces sobre la misma membrana, promueve que junto con los anticuerpos, también se separen las proteínas presentes. Tal análisis, también es aplicable a algunos puntos discordantes en los inmunoensayos del tratamiento con digitonina (Figura 18), sobretodo en el panel

correspondiente a HK, cuyo revelado fue el último en realizar (posterior a la segunda ronda de stripping). Por esta razón la proteína PAS-PGK-like siempre correspondió al primer revelado de la membrana y no a revelados post-*Stripping*, evitando agregar esta variable adicional.



**Figura 19.** Expresión de la proteína PAS-PGK-like, en muestras obtenidas diariamente de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* cultivados en medio LIT. La proliferación celular fue seguida mediante la medición de la absorbancia a 600 nm, mientras que las muestras obtenidas fueron evaluadas mediante *Western Blot*. (A)(B) Se incubó con anticuerpos primarios IgG  $\alpha$ -Enolasa (dilución 1/2000) e IgG  $\alpha$ -PAS (dilución 1/1000). Revelado con Luminol, carga igual a 80  $\mu$ g de proteína de cada muestra. Las señales se revelaron sobre la misma membrana de nitrocelulosa. Los números sobre los carriles indican el día de crecimiento en el cual se tomó la muestra. (C) Curva de crecimiento del parásito bajo las condiciones experimentales aplicadas. Se muestra la absorbancia del cultivo a 600 nm con respecto al tiempo de crecimiento en días.

Los resultados obtenidos para PAS-PGK-*like* con el procedimiento experimental ejecutado, muestran que hay un incremento en los niveles de expresión de PAS-PGK-*like* al final de la curva de crecimiento del parásito *T. cruzi*. Esta afirmación se basa en lo observado en la Figura 19 (B), donde se evidencian señales mucho más intensas en los días seis y siete, en comparación al resto de los puntos evaluados. Por el contrario, las bandas correspondientes a los primeros días de crecimiento, se muestran relativamente tenues y difusas, indicando menores niveles de expresión de la proteína para esos niveles de crecimiento celular (Figura 19, B).

Los días con mayor expresión de la proteína según lo muestra el WB10B (Figura 19, B), equivalen respectivamente a los valores de absorbancia iguales a 1,42 y 1,55; los cuales se ubican en puntos propios de la fase exponencial tardía y la fase estacionaria (Figura 19, C). Es importante mencionar, que la curva obtenida mediante la medición de la densidad óptica del cultivo, muestra el comportamiento canónico, donde se observa una fase *lag*, una fase exponencial y una fase estacionaria (Barros-Álvarez et al., 2014).

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## VI. DISCUSIÓN

*Trypanosoma cruzi* posee tres isoenzimas Fosfoglicerato Quinasa, dos de estas se localizan en el glicosoma (PGKA y PGKC) y una en el citosol (PGKB); las tres isoenzimas se expresan en todos los estadios de vida del parásito y participan en el metabolismo de la glucosa (Concepción et al., 2001; Barros-Álvarez et al., 2014).

Sin embargo, actualmente se añade a la lista una cuarta isoenzima PGK en *T. cruzi*, cuya función es desconocida y hasta ahora ha sido poco caracterizada (Rojas-Pirela et al. 2018). Dicha proteína, objeto del presente estudio, se denominó PAS-PGK-like debido a que posee un dominio PAS en su estructura. La misma plantea nuevas interrogantes sobre la fisiología celular del parásito *T. cruzi*; aunque podría implicar redundancia funcional con respecto a las otras isoenzimas, al poseer un dominio sensor, es posible que tenga un papel regulador, más allá de su participación en el metabolismo intermediario como isoenzima PGK.

A pesar de la importancia que puede poseer un dominio PAS como sensor versátil e interruptor de rutas metabólicas, en organismos cuyos ciclos de vida involucran variaciones ambientales drásticas, la información que se tiene sobre este tipo de proteínas en kinetoplastidas es escasa. Hasta ahora, solo ha sido estudiada la proteína PAS-PGK de *Leishmania major* (Adhikari et al., 2019) y PAS-PGK-like de *Trypanosoma cruzi* en los trabajos de Rojas-Pirela (2018), Acosta et al. (2019) y en la presente investigación (2020).

Una aproximación primordial a la función de la proteína en cuestión, es conocer su ubicación subcelular. En el estudio de proteómica del glicosoma realizado por Acosta et al. (2019), se detectó la presencia de PAS-PGK-like, y se determinó que su expresión es mayor en un punto de la fase de crecimiento estacionaria, con respecto a un punto de la fase exponencial; sin embargo, dicho estudio no permite saber si la proteína se encuentra presente en otro compartimiento celular y como es su expresión en toda la curva de crecimiento. En base a tales interrogantes, se plantearon los objetivos de esta investigación y a continuación se discuten los resultados obtenidos.

## Ubicación subcelular de la proteína PAS-PGK-like en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

La proteína PAS-PGK-like fue evaluada en epimastigotes de *T. cruzi* con la finalidad de determinar su ubicación subcelular, para ello se llevaron a cabo dos técnicas: centrifugación diferencial de un homogenato celular y permeabilización selectiva de los parásitos por tratamiento con digitonina. Ambas metodologías coinciden en que la proteína PAS-PGK-like se encuentra ubicada principalmente en el glicosoma, de acuerdo a lo previamente reportado (Acosta et al, 2019).

La ubicación de PAS-PGK-like, fue predicha en 2018 en el trabajo de Rojas-Pirela, quien utilizó el programa “*Target Signal Predictor*” y afirmó que existía una alta probabilidad de que la proteína se encontrara compartimentalizada; esto se confirma de manera experimental en el presente trabajo, ya que se obtuvo la ubicación glicosomal esperada. Este resultado se fundamenta en la secuencia PRL de tipo PTS-1, C-terminal, que posee esta proteína, la cual permite la translocación de la misma al glicosoma luego de ser totalmente sintetizada en el citosol. Las secuencias de tipo PTS-1 interactúan con receptores en el citosol llamados PEX5; el proceso de translocación depende de la secuencia del tripéptido señal C-terminal, de su accesibilidad en la conformación en la cual se encuentra la proteína, y de la secuencia anterior al tripéptido (aproximadamente 10 residuos), que también interactúa con el receptor afectando la eficiencia de la importación (Brocard & Hartig, 2006; Galland et al., 2007).

En cuanto a las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial, se observó señal en la fracción rica en glicosomas (FRG), en todos los inmunoensayos realizados, indistintamente del método de revelado empleado (DAB/Luminol), y en la fracción granular gruesa (FGG) en los inmunoensayos revelados con Luminol. Con respecto a la señal obtenida en FRG, se notó una disminución de la misma al incrementar el tiempo de almacenamiento de las muestras; esto se evidencia al comparar los ensayos WB3 (Figura 14, B) y WB7 (Figura 15, A), donde a pesar de haber cargado la misma cantidad de proteína (50 µg) y usar un revelado más sensible como lo es el Luminol, la señal es menor en el último, puesto que había transcurrido más tiempo luego de la obtención de las muestras por fraccionamiento celular. Este

comportamiento indica que la proteína glicosomal es menos estable; es decir, tiende a degradarse, en comparación a la señal observada en FGG que se discutirá más adelante.

De las muestras producto del tratamiento con digitonina, también se obtuvo señal de la proteína PAS-PGK-*like* en los glicosomas; adicionalmente, se mostró con este método que dicha proteína se encuentra asociada a la membrana glicosomal, debido a que se vio señal en todos los sedimentos y hubo un retraso en la liberación hacia los sobrenadantes, en comparación con la liberación del marcador glicosomal (HK). Esto obedece a que la membrana del organelo está siendo permeabilizada (a partir de 40 µg de digitonina/mg de proteína) pero la concentración del detergente y la fuerza iónica del medio no es suficiente para interrumpir totalmente la interacción con la membrana. De hecho, se observó señal en el sedimento, en el punto correspondiente al tratamiento con Tritón X-100, a diferencia de las proteínas marcadoras donde no se observó señal alguna con este tratamiento, posiblemente por liberación al sobrenadante y posterior degradación (Figura 18).

Esto sugiere que, aunque la interacción con la membrana no es de tipo covalente (ya que no es una proteína integral de membrana), la proteína es resistente a la solubilización con detergente y podría ser parte de un complejo de membrana; estando asociada con otras proteínas y/o con la membrana, por medio de interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas. Dichas interacciones fueron eliminadas cuando se realizó un tratamiento con carbonato de sodio a glicosomas purificados, apareciendo la proteína en su totalidad, en los sobrenadantes correspondientes (Acosta et al., 2019). A raíz de estos resultados, surge la necesidad de determinar el tipo y grado de interacción de la proteína PAS-PGK-*like* con la membrana glicosomal, evaluando su solubilidad según la fuerza iónica en el buffer.

Ahora bien, Rojas-Pirela (2018) no solo plantea la posibilidad de encontrar a la proteína PAS-PGK-*like* en el glicosoma, sino que también es altamente probable que la misma se encuentre ubicada en el citosol y/o mitocondria. Los resultados obtenidos en el presente estudio, validan experimentalmente lo propuesto por Rojas-Pirela (2018), puesto que además de obtener señal en la FRG, se observó señal en la fracción granular gruesa (FGG); la misma corresponde a una proteína mitocondrial, dado que en esta fracción se enriqueció el marcador de dicho organelo, la enzima Isocitrato Deshidrogenasa (Figura 13). Existe la posibilidad de

que la señal observada en la fracción FGG sea producto de contaminación de glicosomas; sin embargo, esta opción es poco probable, puesto que en la distribución de la actividad específica del marcador glicosomal HK, no se determinó niveles relevantes de la actividad específica de esta enzima, en la fracción FGG con respecto al homogenato (Figura 13).

En los inmunoensayos de tipo *Western Blot* revelados con DAB, no se observó señal en la FGG (Figura 14), sin embargo, al revelar con Luminol se obtuvo una señal clara en dicha fracción (Figura 15); esto podría indicar que la proteína mitocondrial se encuentra en menores niveles que la glicosomal, al menos en la fase exponencial de crecimiento, en la cual se realizó el fraccionamiento celular. Sin embargo, los casos en donde fueron observadas mayores señales PAS-PGK-*like* en la FGG, podrían ser consecuencia del tiempo de almacenamiento de las muestras, debido a un posible procesamiento proteolítico de la FRG, distinto a la FGG.

Contrario a lo indicado anteriormente, en las fracciones solubles obtenidas por el tratamiento con digitonina, no se observó un incremento en la señal PAS-PGK-*like* en los rangos donde ocurre la permeabilización del mitocondrion; lo que podría indicar la no liberación de esta enzima por parte de la mitocondria, correspondiendo así a una proteína asociada a membrana. Es necesario mencionar que a partir de los resultados obtenidos con este método, no es posible descartar la ubicación dual de la proteína PAS-PGK-*like*, en el glicosoma y mitocondria de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

En el contexto en el cual se plantea la posible ubicación dual de la proteína, la señal PAS-PGK-*like* observada en los sedimentos del tratamiento con digitonina, corresponde a proteína asociada a las membranas del parásito, incluyendo glicosoma y mitocondrion (concentración  $\geq 200$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). La asociación con la membrana tanto glicosomal como mitocondrial, explicaría la presencia de una débil señal en la fracción microsomal (FM) (Figura 15), la cual es producto de pequeñas vesículas de membrana de estos dos organelos, generadas durante el proceso de ruptura; siendo la membrana de la mitocondria más sensible, ya que por ser un mitocondrion ramificado que se extiende por todo el cuerpo del parásito *T. cruzi* (De Sousa, 2002), es más propenso a ser fragmentado por el tratamiento mecánico. Otra posibilidad es que la proteína de la fracción microsomal corresponda a una ubicación en membrana plasmática.

PAS-PGK-*like* es producto de un gen único, que codifica para un solo tipo de péptido señal, el cual es de importación al glicosoma. Por lo tanto, para una enzima mitocondrial, debe haber un mecanismo de importación no canónico, independiente de péptido señal, el cual podría estar basado en modificaciones postraduccionales de la proteína; tal como ocurre en el caso de la PGK1 humana, la cual se encuentra ubicada principalmente en el citosol, pero que bajo ciertas condiciones, es fosforilada y translocada a la mitocondria (Li et al., 2016). En *T. cruzi*, se han encontrado proteínas homólogas a las que intervienen en la translocación de la PGK1 a la mitocondria; las mismas poseen secuencias que podrían interactuar con PAS-PGK-*like*, por lo que es posible que ocurra un mecanismo similar (Rojas-Pirela et al., 2018).

Con las muestras obtenidas por centrifugación diferencial, además de evaluar la ubicación subcelular de PAS-PGK-*like*, se examinó su peso molecular. El resultado obtenido, no coincide con lo reportado previamente por Rojas-Pirela (2018), a pesar de que el peso molecular calculado es de 58 kDa, la banda correspondiente a la proteína nativa coincide con el marcador de 64 kDa. Asimismo, se obtuvo que la banda correspondiente a la proteína recombinante se encuentra por encima de dicho marcador, lo cual es lógico ya que esta posee una serie de residuos de aminoácidos extra, que permiten su purificación y corte proteolítico, lo que conlleva un aumento en el peso molecular. Cabe destacar, que aunque Rojas-Pirela (2018) afirma que la proteína recombinante PAS-PGK-*like* corresponde a un peso molecular de 58 kDa, la banda obtenida en sus resultados, coincide precisamente con el marcador de 66 kDa, lo que es más congruente con lo obtenido en este estudio.

El hecho de que la banda de la proteína en cuestión se ubique por encima del peso molecular estimado mediante herramientas bioinformáticas (Rojas-Pirela 2018), manifiesta que la misma posee un patrón de migración aberrante. Esto puede deberse en parte, a alteraciones en la unión de SDS por la proteína; uno de los factores que afectan esta interacción es la hidrofobicidad de la proteína (Rath et al., 2009). Esto puede estar ocurriendo dado que PAS-PGK-*like* ha sido clasificada como una proteína hidrofóbica (Rojas-Pirela, 2018), sin embargo, dado que no es tan hidrofóbica como una proteína integral de membrana, es más probable que la proteína nativa posea modificaciones postraduccionales que pueden retardar la movilidad en el gel; por ejemplo, glicosilaciones o unión a lípidos, como ya se ha estudiado previamente con otras proteínas (Shirai et al., 2008).

Este carácter hidrofóbico de PAS-PGK-*like* también podría ser responsable de lo observado en los ensayos de tipo ELISA; luego de haber realizado pruebas con distintas variables, se determinó que la proteína no estaba uniéndose a la superficie de los pozos, los cuales fueron de tipo “*High binding*” que unen preferencialmente proteínas hidrofílicas. Este hecho, aunado a los bajos niveles de expresión en la fase exponencial donde se obtuvieron las muestras (menor representatividad de la proteína en el total de la muestra), pueden ser los causantes de la ausencia de señal; por lo tanto, se deben usar pozos de afinidad media, que unen preferencialmente proteínas hidrofóbicas. En el caso del péptido correspondiente al dominio PAS recombinante, cuyas pruebas siempre arrojaron un resultado positivo; se puede interpretar que, a pesar de tener también una naturaleza hidrofóbica, tiene más posibilidad de unión dado que procede de una muestra pura, en comparación a la proteína nativa presente en las muestras de centrifugación diferencial con las que se realizaron los ensayos de ELISA.

Por último, empleando las fracciones de centrifugación diferencial, también se realizaron inmunoensayos de tipo *Dot Blot*, con los cuales se confirmó lo obtenido en *Western Blot*, y adicionalmente se demostró que los anticuerpos IgG  $\alpha$ -PAS, reconocen a la proteína en su conformación nativa. Cabe destacar, que este estudio es pionero en la evaluación de la proteína nativa mediante inmunoensayos, confirmando el reconocimiento de los anticuerpos obtenidos por Rondón (2018) y estandarizando las condiciones experimentales para su uso con muestras nativas, ya que Rondón (2018), solo evidenció señales empleando el dominio PAS recombinante como antígeno.

### **Expresión de la proteína PAS-PGK-*like* en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***

Al evaluar las muestras obtenidas diariamente de un cultivo de epimastigotes en medio LIT, se obtuvo mayor expresión de la proteína PAS-PGK-*like* en la fase estacionaria del crecimiento de este parásito.

Metabólicamente, durante la fase de crecimiento exponencial, los parásitos consumen la glucosa del medio, siendo este su sustrato preferencial, y a medida que la disponibilidad del mismo es menor (alrededor de 5 mM), comienzan a consumir aminoácidos, fuente nutritiva asociada con la fase de crecimiento estacionaria, donde los niveles de amonio excretado al medio son mayores (Barros-Álvarez et al., 2014). En la fase exponencial del parásito se

encuentran más activas las rutas de síntesis y la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, es necesario el catabolismo de la glucosa para suplir de ATP neto al glicosoma vía PPDK; mientras que en fase estacionaria, donde la división celular es menor, hay menos síntesis y no hay degradación de ácidos grasos, la producción de ATP a partir del consumo de aminoácidos, es suficiente para mantener el balance del organelo vía PEPCK, aunque no haya ganancia neta de ATP (Urbina, 1994; Barros-Álvarez et al., 2014). El resultado obtenido, indica que el rol de la proteína PAS-PGK-like se ubica en este contexto metabólico, lo cual será discutido más adelante.

Cabe destacar, que además de la metodología establecida para la evaluación de la expresión de la proteína en cuestión, se comparó el resultado obtenido de la permeabilización selectiva con digitonina realizado en fase estacionaria (Figura 18), con el mismo tratamiento aplicado a parásitos en fase exponencial (resultado no mostrado). Observándose una mayor señal en el tratamiento con digitonina de epimastigotes en fase estacionaria, lo que representa otra confirmación de que *T. cruzi* expresa la proteína PAS-PGK-like mayoritariamente en fase estacionaria.

### **Papel fisiológico de PAS-PGK-like en el metabolismo de *Trypanosoma cruzi***

Los dominios PAS poseen funciones diversas; las proteínas que los contienen son modulares, es decir, poseen un dominio sensor PAS (*input*), que detecta una amplia gama de estímulos fisicoquímicos y responde ante ellos, generando una reacción que se ve reflejada a través de un dominio efector (*output*). La señal recibida, puede alterar las interacciones intramoleculares de los dominios de la proteína afectando la estructura terciaria, las interacciones intermoleculares de los dominios con otros afectando la estructura cuaternaria, o ambas interacciones; siendo este un proceso termodinámico (Möglich et al., 2009). De este modo, cambios conformacionales en el dominio sensor, producto de la unión a un ligando o cambios fisicoquímicos en el entorno, modulan directamente la actividad del dominio efector o promueven cambios en los estados de oligomerización, afectando finalmente la actividad catalítica de la misma proteína o de las proteínas con las que se asocia.

En este sentido, el dominio PAS modularía la actividad PGK de PAS-PGK-like o incluso la actividad de otras proteínas mediante interacción con las mismas. Rojas-Pirela

(2018), realizó un análisis bioinformático de la secuencia del dominio PAS de la proteína en cuestión, en el que no se identificaron residuos asociados a la unión de algún ligando documentado en otras proteínas PAS; por lo tanto, el mecanismo de detección de la señal por parte de la proteína, debe estar relacionado con interacciones proteína-proteína o cambios conformacionales no asociados a la unión de ligando.

Una variable importante a considerar con respecto a las condiciones del cultivo de Epimastigotes de *T. cruzi*, en el cual se observó expresión diferencial de PAS-PGK-like, es la disponibilidad de nutrientes; como se describió anteriormente, durante la proliferación celular, el parásito pasa de emplear glucosa a emplear aminoácidos como fuente de carbono, modulando su metabolismo según cada condición (Urbina, 1994). Al disminuir los niveles de glucosa, el pH intraglicosomal varía desde 7,4 a 6,8; lo cual es producto del establecimiento de un equilibrio entre el pH en el citosol y el glicosoma, en respuesta a las diferentes condiciones ambientales y en función de la adaptación metabólica del parásito; puesto que, diversas proteínas son moduladas por tales variaciones de pH (Lin et al., 2017; Quiñones et al., 2020).

La proteína PAS-PGK-like posee dos picos de actividad PGK, a valores de pH iguales a 7 y 8, mientras que la misma proteína sin el dominio PAS, posee un único máximo de actividad a pH 8 (Rojas-Pirela, 2018); el primer pico es más cercano al pH reportado para el glicosoma a bajas concentraciones de glucosa (pH 6,8), por lo que es posible plantear que la proteína funcione en este compartimento, como una isoenzima PGK en función de la disponibilidad de glucosa, siendo el dominio sensor PAS, un activador de la enzima a pH ácido, mediante cambios conformacionales. Un proceso similar ocurre en los glicosomas de *Leishmania*, donde la actividad de la proteína PAS-PGK varía según el pH intraglicosomal; en ese caso, el dominio PAS inhibe la actividad de la proteína a pH neutro, por lo que la misma posee un pico actividad a pH ácido de 5,5 (Adhikari et al., 2019). Tales mecanismos de funcionamiento, difieren del encontrado para la proteína PAS kinasa; esta proteína también está catalogada como un sensor de glucosa, pero su activación consiste en cambios de interacción entre los dominios kinasa y PAS, generado por la unión de metabolitos a este último, permitiendo así la función del dominio kinasa (DeMille & Grose, 2013).

El segundo pico de actividad de PAS-PGK-like en el gradiente de pH, el cual correspondió al valor de pH 8 (Rojas-Pirela, 2018); podría pertenecer a otra condición

fisiológica en la cual la proteína está más activa en glicosoma, en este caso a la condición en la cual existe disponibilidad de glucosa y el pH se encuentra alrededor de 7,4 en el glicosoma (Lin et al., 2017). Sin embargo, esta posibilidad es poco probable, dado que Rojas-Pirela (2018), también reportó que la actividad PGK de la proteína PAS-PGK-*like*, es inhibida a partir de 70  $\mu$ M de glucosa, concentración en la cual puede haber flujo glucolítico, según el valor de  $K_m$  para la glucosa de la enzima HK, igual a 60  $\mu$ M (Cáceres et al., 2003).

El hecho de que la proteína sea inhibida por glucosa y que posea un pico de actividad en el pH cercano al valor intraglicosomal, a bajas concentraciones de glucosa, aunado a su expresión mayoritaria en fase estacionaria, que coincide también con el estado fisiológico en el cual la glucosa se encuentra en valores menores o iguales a 5 mM (Barros-Álvarez et al., 2015); podría indicar que la proteína PAS-PGK-*like* glicosomal, funciona en sentido gluconeogénico. No obstante, se requieren estudios detallados sobre la cinética de PAS-PGK-*like* para corroborar tal afirmación; así como no es posible descartar, que esta proteína interactúe con otras proteínas glicosomales a través del dominio PAS y cumpla una función reguladora además de su participación en el metabolismo intermediario, por ejemplo, detectar un cambio nutricional y en consecuencia, permitir la fosforilación y escisión proteolítica de PDK, mediante la interacción y activación de la o las enzimas, que realizan dicha modificación, según lo encontrado por González-Marcano et al. (2014); lo cual también requiere estudios posteriores.

Entonces, el valor de actividad hallado a pH 8 (Rojas-Pirela, 2018), podría corresponder al funcionamiento de la proteína PAS-PGK-*like* en otro compartimiento celular, como en el caso de la mitocondria, cuya matriz posee un pH alrededor de 7,7 en condiciones aeróbicas y disponibilidad de glucosa (Nolan & Voorheis, 2000); lo cual coincidiría con la representación mitocondrial, encontrada en este estudio. Sin embargo, es importante resaltar que con los resultados obtenidos, no es posible distinguir si la proteína mitocondrial PAS-PGK-*like* realmente se encuentra en el interior de la matriz mitocondrial, en el espacio intermembranas o inclusive, podría estar asociada a la membrana externa de cara al citosol, en vez de ser translocada dentro del organelo; lo cual influye en el esclarecimiento de su función en el mismo.

El rol que la proteína PAS-PGK-*like* cumple en la mitocondria es desconocido y se tienen menos indicios de su funcionamiento en este organelo, dado que este estudio es el primer reporte de su ubicación en el mismo. Li et al. (2017), proponen un mecanismo en el cual la proteína PGK1 de humano, es fosforilada en el citosol y translocada a la matriz mitocondrial bajo condiciones de hipoxia y mutaciones oncogénicas; una vez translocada, la proteína actúa como una *protein kinasa*, lo que resulta en la supresión del metabolismo del piruvato mitocondrial.

En el caso de PAS-PGK-*like*, existe la posibilidad de que sea translocada a la mitocondria, permaneciendo asociada a alguna de las membranas del organelo, según los resultados obtenidos en la presente investigación; sin embargo, no se puede contemplar la idea de que esta proteína actúe de manera similar a la PGK1, dado que no posee el dominio “*protein kinasa*” que se lo permita. En cambio, el dominio PAS puede permitir la interacción con otras proteínas mitocondriales, regulando su actividad para generar cambios metabólicos; por ejemplo, si PAS-PGK-*like* se asociase con una *protein kinasa*, y permite su activación o inhibición, podría participar en la generación o supresión de alguna cascada de señalización. Por lo tanto, se requieren estudios de interacción proteína-proteína, para dilucidar si la función de PAS-PGK-*like* se basa en tales interacciones.

Ahora bien, la mitocondria además de tener una implicación en el metabolismo intermediario del parásito, también está relacionada con el estado redox de la célula, siendo la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS), algunas de estas hemo-inducidas. PAS-PGK-*like* posee un bolsillo de unión a hemo, la cual es una molécula generada por la digestión de la sangre en el hospedero invertebrado, involucrada en el favorecimiento de la proliferación de los epimastigotes, a través de un mecanismo de señalización sensible a variaciones del estado redox del parásito (Nogueira et al., 2017); por lo tanto, el rol fisiológico que cumple la proteína de interés en la mitocondria, podría ubicarse en este contexto.

El mecanismo de acción relacionado con el incremento de grupos hemo en el microambiente del parásito, consiste en la disminución de la actividad del sistema respiratorio de la célula, lo cual a su vez se relaciona con la hiperpolarización de la membrana mitocondrial, que conlleva al aumento en la producción de ROS. Esto se considera un mecanismo utilizado por el parásito para incrementar y mantener un ambiente oxidativo

mitocondrial, favoreciendo la proliferación celular en el estadio de epimastigote, en el intestino del Triatomino (Nogueira et al., 2017). El dominio PAS de PAS-PGK-*like* y su unión a los grupos hemo, podría ser parte de este mecanismo mitocondrial, detectando la presencia de esta molécula y posteriormente activando la cascada de señalización que conlleva al cambio de polarización de la membrana mitocondrial y el incremento de las ROS en el organelo. Un efecto similar ocurre en el caso de IPAS, un factor de transcripción que también posee un dominio PAS y al ubicarse en la mitocondria, participa en la despolarización de la membrana; iniciando en este proceso, la vía de señalización relacionada con apoptosis intracelular, mediante la interacción con otras proteínas (Torii et al., 2011).

Es necesario destacar que con los resultados obtenidos, se confirma la ubicación dual de la proteína PAS-PGK-*like*, se plantea su ubicación más probable en los glicosomas y mitocondria; aunque no se descarta que la proteína pueda ubicarse en otro compartimiento celular, como lo son los lisosomas, al igual que en *Leishmania major*, o asociada a membrana plasmática de cara al citosol, en base a la señal observada en la fracción microsomal producto de la centrifugación diferencial.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## VII. CONCLUSIONES

- La proteína PAS-PGK-*like* posee una ubicación subcelular dual, en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
- Se confirma por métodos experimentales que la proteína PAS-PGK-*like* se encuentra ubicada en el glicosoma, en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
- La proteína PAS-PGK-*like* posiblemente se encuentra ubicada en la mitocondria de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, aunque en este organelo se encontraría en menores niveles con respecto al glicosoma.
- Existen mayores niveles de expresión de la proteína PAS-PGK-*like*, en la fase estacionaria del crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
- PAS-PGK-*like* se encuentra asociada a la membrana glicosomal de manera no covalente.
- De haber una proteína PAS-PGK-*like* mitocondrial, se encuentra asociada a la membrana de dicho organelo; sin embargo, no se obtuvo información acerca del tipo de interacción.
- La proteína PAS-PGK-*like* posee un patrón de migración aberrante en geles de SDS-PAGE, la proteína nativa migra al nivel del marcador de peso molecular igual a 64 kDa.
- Los anticuerpos IgG  $\alpha$ -PAS reconocen a la proteína PAS-PGK-*like* en su conformación nativa y desnaturalizada en extractos celulares de *Trypanosoma cruzi*, evaluados mediante *Dot Blot* y *Western Blot*.

## VIII. PERSPECTIVAS

- Inmunodetectar la proteína PAS-PGK-*like*, mediante inmunomicroscopía de epifluorescencia, en células de *Trypanosoma cruzi*, empleando un marcador mitocondrial para corroborar su ubicación en este organelo; con el fin de verificar la ubicación mitocondrial de la proteína y/o dilucidar otras posibles ubicaciones.
- Realizar estudios detallados sobre la cinética de PAS-PGK-*like*, con respecto a la unión de ligandos e inhibidores.
- Realizar estudios de interacción proteína-proteína, con el fin de dilucidar si PAS-PGK-*like* tiene funciones basadas en tales interacciones, y si las mismas forman parte del mecanismo de importación a la mitocondria.
- Dilucidar la ubicación suborganelar de la proteína PAS-PGK-*like*, en la mitocondria de *Trypanosoma cruzi*.
- Determinar el tipo y grado de interacción de la proteína PAS-PGK-*like* con las membranas glicosomal y mitocondrial de *Trypanosoma cruzi*.
- Evaluar mediante herramientas bioinformáticas, las posibles modificaciones postraduccionales que pudiese tener la proteína PAS-PGK-*like* en *Trypanosoma cruzi*.
- Realizar pruebas ELISA, empleando pozos de afinidad media, con el fin de inmunodetectar y cuantificar la presencia de la proteína PAS-PGK-*like* en los distintos compartimientos celulares de *Trypanosoma cruzi*.
- Evaluar la ubicación y expresión de la proteína PAS-PGK-*like* de *Trypanosoma cruzi*, en los distintos estadios del ciclo de vida del parásito: amastigote y trypomastigote.

## REFERENCIAS

- Acosta, H., Burchmore, R., Naula, C., Gualdrón-López, M., Quintero-Troconis, E., Cáceres, A. J., y otros. (2019). Proteomic analysis of glycosomes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 229, 62-74.
- Acosta, H., Dubourdieu, M., Quiñones, W., Cáceres, A., Bringaud, F., & Concepción, J. L. (2004). Pyruvate phosphate dikinase and pyrophosphate metabolism in the glycosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 138(4), 347-356.
- Adhikari, A., Biswas, S., Mukherjee, A., Das, S., & Adak, S. (2019). PAS domain-containing phosphoglycerate kinase deficiency in *Leishmania major* results in increased autophagosome formation and cell death. *Biochemical Journal*, 476, 1303–1321.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., y otros. (1989). *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Avendaño-Rangel, F., & Rey, K. (2016). Avances y desafíos en el control de la Enfermedad de Chagas en Venezuela y un estudio de caso en el estado Mérida. *Consciencia y Diálogo*, 6, 155-164.
- Banks, R. D., Blake, C. C., Evans, P. R., Haser, R., Rice, D. W., Hardy, G. W., y otros. (1979). Sequence, structure and activity of Phosphoglycerate kinase: a possible hinge-bending enzyme. *Nature*, 279, 773-777.
- Barros-Álvarez, X., Cáceres, A., Michels, P. A., Concepción, J. L., & Quiñones, W. (2014). The phosphoglycerate kinase isoenzymes have distinct roles in the regulation of carbohydrate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, 143, 39-47.
- Barros-Álvarez, X., Cáceres, A., Ruiz, M., Michels, P., Concepción, J. L., & Quiñones, W. (2015). The glycosomal-membrane associated phosphoglycerate kinase isoenzyme A plays a role in sustaining the glucose flux in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 200, 5-8.

- Bergmeyer, H. U. (1983). *Methods of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press.
- Besteiro, S., Barrett, M., Riviere, L., & Bringaud, F. (2005). Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux. *Trends in Parasitology*, 21(4), 185-191.
- Blattner, J., Helfert, S., Michels, P., & Clayton, C. (1998). Compartmentation of phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei* plays a critical role in parasite energy metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 11596–11600.
- Bringaud, F., Rivière, L., & Coustou, V. (2006). Energy metabolism of Trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 149, 1-9.
- Brocard, C., & Hartig, A. (2006). Peroxisome targeting signal 1: Is it really a simple tripeptide? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, 1565–1573.
- Cáceres, A., Portillo, R., Acosta, H., Rosales, D., Quiñones, W., Avilan, L., y otros. (2003). Molecular and biochemical characterization of hexokinase from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 126, 251–262.
- Canals, M., González, C., Canals, L., Canals, A., Cáceres, D., Alvarado, S., y otros. (2017). ¿Qué dicen los números de la evolución temporal de la Enfermedad de Chagas? *Revista Chilena de Infectología*, 34(2), 120-127.
- Cazzulo, J. (1992). Aerobic fermentation of glucose by Trypanosomatids. *FASEB Journal*, 6(13), 3153-3161.
- Cazzulo, J., de Cazzulo, B. M., Engel, J. C., & Cannata, J. J. (1985). End products and enzyme levels of aerobic glucosa fermentation in Trypanosomatids. *Molecular Biochemistry Parasitology*, 16, 329-343.
- Chiarelli, L., Morera, S., Bianchi, P., Fermo, E., Zanella, A., Galizzi, A., y otros. (2012). Molecular Insights on Pathogenic Effects of Mutations Causing Phosphoglycerate kinase Deficiency. *PLoS ONE*, 7(2), e32065.

- Concepción, J. L., Adje, C. A., Quiñones, W., Chevalier, N., Dubourdiou, M., & Michels, P. A. (2001). The expression and intracellular distribution of phosphoglycerate kinase isoenzymes in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 118, 111–121.
- Concepción, J. L., Chataing, B., & Dubourdiou, M. (1999). Purification and properties of phosphoglucose isomerases of *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 122(B), 211–222.
- Concepción, J. L., Gonzalez-Pacanowska, D., & Urbina, J. (1998). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase in *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi*: Subcellular Localization and kinetic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 352(1), 114–120.
- Coura, J., & De Castro, S. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(1), 3-24.
- Coustou, V., Besteiro, S., Riviere, L., Biran, M., Biteau, N., Franconi, J.-M., y otros. (2005). A Mitochondrial NADH-dependent Fumarate Reductase Involved in the Production of Succinate Excreted by Procyclic *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 16559-16570.
- Coustou, V., Biran, M., Besteiro, S., Riviere, L., Baltz, T., Franconi, J.-M., y otros. (2006). Fumarate Is an Essential Intermediary Metabolite Produced by the Procyclic *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(37), 26832–26846.
- De Souza, W. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, 8, 269-285.
- DeMille, D., & Grose, J. (2013). PAS Kinase: A Nutrient Sensing Regulator of Glucose Homeostasis. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 65(11), 921–929.

- Denicola, A., Rubbo, H., Haden, L., & Turrens, J. (2002). Extramitochondrial localization of NADH-fumarate reductase in Trypanosomatids. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133, 23–27.
- Docampo R, D. S. (2005). Acidocalcisomes—conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*, 3(251), 61.
- Domingo-Sananes, M., & Concepción, J. (2004). *Ubicación Subcelular, purificación, caracterización y estudios de interacción proteína-proteína de la enolasa de epimastigotes de Trypanosoma cruzi*. Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Mérida-Venezuela: SERBIULA (sistema Librum 2.0).
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874.
- Fiskum, G., Craig, S., Decker, G., & Lehninger, A. (1980). The cytoskeleton of digitonin-treated rat hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 77(6), 3430-3434.
- Galland, N., Demeure, F., Hannaert, V., Verplaetse, E., Vertommen, D., Van Der Smissen, P., y otros. (2007). Characterization of the role of the receptors PEX5 and PEX7 in the import of proteins into glycosomes of *Trypanosoma brucei*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773, 521–535.
- González, L. G. (2006). *Clonación y secuenciación del gen enolasa de Trypanosoma cruzi; sobreexpresión, purificación y estudios cinéticos de la enzima recombinante*. Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Mérida-Venezuela: SERBIULA.
- González-Marcano, E., Mijares, A., Quiñones, W., Caceres, A., & Concepción, J. L. (2014). Post-translational modification of the pyruvate phosphate dikinase from *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology international*, 63.
- Grillet, M., Hernández-Villena, J., Llewellyn, M., Paniz-Mondolfi, A., Tami, A., Vincenti-G, M., y otros. (2019). Venezuela's humanitarian crisis, resurgence of vector-borne

- diseases, and implications for spillover in the region. *The Lancet Infectious Diseases*, 1-13.
- Gualdrón-López, M., Brennan, A., Avilán, L., & Michels, P. A. (2013). Translocation of solutes and proteins across the glycosomal membrane of trypanosomes; possibilities and limitations for targeting with trypanocidal drugs. *Parasitology*, *140*(1), 1-20.
- Gualdrón-López, M., Brennan, A., Hannaert, V., Quiñones, W., Cáceres, A., Bringaud, F., y otros. (2012). When, how and why glycolysis became compartmentalized in the Kinetoplastea. A new look at an ancient organelle. *International Journal for Parasitology*, *42*(1), 1-20.
- Haanstra, J., Tuijl, A. v., Kessler, P., Reijnders, W., Michels, P., Westerhoff, H., y otros. (2008). Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(46), 17718-17723.
- Hannaert, V., Blaauw, M., Col, L., Allert, S., Opperdoes, F. R., & Michels, P. A. (1992). Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana*. *Molecular Biochemistry Parasitology*, *55*, 115-126.
- Hawkes, R., Niday, E., & Gordon, J. (1982). A Dot-Immunobinding Assay for Monoclonal and Other Antibodies. *Analytical Biochemistry*(119), 142-147.
- Hefti, M., Francoijs, K., de Vries, S., Dixon, R., & Vervoort, J. (2004). The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. *European Journal Biochemistry*, *271*, 1198–1208.
- Koontz, L. (2014). TCA precipitation. En J. Lorsch, *Methods in enzymology* (págs. 3-10). USA: Academic Press.
- Kralova, I., Rigden, D. J., Opperdoes, F. R., & Michels, P. (2000). Glycerol kinase of *Trypanosoma brucei*: Cloning, molecular characterization and mutagenesis. *European Journal of Biochemistry*, *267*, 2323-2333.

- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Leroux, A., Maugeri, D., Cazzulo, J., & Nowicki, C. (2011). Functional characterization of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isozymes from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 177, 61-64.
- Li, X., Jiang, Y., Meisenhelder, J., Yang, W., Hawke, D., Zheng, Y., y otros. (2016). Mitochondria-Translocated PGK1 Functions as a Protein Kinase to Coordinate Glycolysis and the TCA Cycle in Tumorigenesis. *Molecular Cell*, 61, 705–719.
- Lin, S., Voyton, C. M., Ackroyd, P., Morris, J., & Christensen, k. (2017). pH regulation in glycosomes of procyclic form *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 292(19), 7795–7805.
- Lobo-Rojas, Á. E., González-Marcano, E., Valera-Vera, E. A., Acosta, H., Quiñonez, W., Burchmore, R., y otros. (2016). *Trypanosoma cruzi* contains two galactokinases; molecular and biochemical characterization. *Parasitology International*, 65, 472–482.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, L., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Maslov, D., & Simpson, L. (1995). Evolution of parasitism in Kinetoplastid protozoa. *Parasitology today*, 11, 30-32.
- Michels, P., Bringaud, F., Herman, M., & Hannaert, V. (2006). Metabolic functions of glycosomes in Trypanosomatids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, 1463–1477.
- Mikkelsen, S. R., & Cortón, E. (2004). *Bioanalytical Chemistry*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Misset, O., & Opperdoes, F. (1987). The phosphoglycerate kinases from *Trypanosoma brucei*, A comparison of the glycosomal and the cytosolic isoenzymes and their sensitivity towards Suramin. *European Journal of Biochemistry*, 162, 493-500.

- Möglich, A., Ayers, R., & Moffat, K. (2009). Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Cell Press Structure*, 17, 1282-1294.
- Nambu, J., Lewis, J., Wharton, K., & Crews, S. (1991). The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell*, 67, 1157–1167.
- Nogueira, N., Saraiva, F., Oliveira, M., Mendonça, A., Inacio, J., Almeida-Amaral, E., y otros. (2017). Heme modulates *Trypanosoma cruzi* bioenergetics inducing mitochondrial ROS production. *Free Radical Biology and Medicine*, 108, 183-191.
- Nolan, D., & Voorheis, P. (2000). Hydrogen ion gradients across the mitochondrial, endosomal and plasma membranes in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. Solving the three-compartment problem. *European Journal of Biochemistry*, 267, 4601-4614.
- Opperdoes, F. (1987). Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annual Review of Microbiology*, 41, 127–151.
- Quiñones, W., Acosta, H., Gonçalves, C., Motta, M., Gualdrón-López, M., & Michels, P. (2020). Structure, Properties, and Function of Glycosomes in *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 1-11.
- Quiñones, W., Peña, P., Domingo-Sananes, M., Cáceres, A., Michels, P., Avilan, L., y otros. (2007). *Leishmania mexicana*: Molecular cloning and characterization of enolase. *Experimental Parasitology*, 116, 241–251.
- Quiñones, W., Urbina, J., Dubourdiou, M., & Concepción, J. L. (2004). The glycosome membrane of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: protein and lipid composition. *Experimental Parasitology*, 106, 135–149.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V., Chen, G., & Deber, C. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(6), 1760–1765.

- Ratha, A., Glibowicka, M., Nadeau, V., Chen, G., & Deber, C. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(6), 1760–1765.
- Rivero, L. A., Concepción, J. L., Quintero-Troconis, E., Quiñones, W., Michels, P. A., & Acosta, H. (2016). *Trypanosoma evansi* contains two auxiliary enzymes of glycolytic metabolism: Phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate phosphate dikinase. *Experimental Parasitology*, 165, 7-15.
- Rojas-Pirela, M. (2018). *Caracterización Molecular y Bioquímica de la PAS-PGK Like Recombinante De Trypanosoma cruzi*. Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Mérida-Venezuela: SERBIULA.
- Rojas-Pirela, M., Rigden, D., Michels, P., Cáceres, A., Concepción, J., & Quiñones, W. (2018). Structure and function of Per-ARNT-Sim domains and their possible role in the life-cycle biology of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular & Biochemical Parasitology*(219), 52-66.
- Rondón, Y. (2018). *Producción de anticuerpos  $\alpha$ -Dominio PAS de una fosfoglicerato quinasa-like en Trypanosoma cruzi*. Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Mérida-Venezuela: SERBIULA.
- Schurig, H., Rutkat, K., Rachel, R., & Jaenicke, R. (1995). Octameric enolase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: purification, characterization, and image processing. *Protein Science*, 4, 228-236 .
- Shirai, A., Matsuyama, A., Yashiroda, Y., Hashimoto, A., Kawamura, Y., Arai, R., y otros. (2008). Global Analysis of Gel Mobility of Proteins and Its Use in Target Identification. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(16), 10745–10752.
- Steiger, R. F., Opperdoes, F. R., & Bontemps, J. (1980). Subcellular fractionation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms with special reference to hydrolases. *European Journal of Biochemistry*, 105, 163-175.

- Taylor, B., & Zhulin, I. (1999). PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 479-506.
- Torii, S., Goto, Y., Ishizawa, T., Hoshi, H., Goryo, K., Yasumoto, K., y otros. (2011). Pro-apoptotic activity of inhibitory PAS domain protein (IPAS), a negative regulator of HIF-1, through binding to pro-survival Bcl-2 family proteins. *Cell Death and Differentiation*, 18, 1711–1725.
- Urbina, J. (1994). Intermediary Metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, 10(3).
- Urbina, J., & Docampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in parasitology*, 19(11).
- van Weelden, S., Fast, B., Vogt, A., Meer, P. v., Saas, J., Jaap, v. H., y otros. (2003). Procyclic *Trypanosoma brucei* Do Not Use Krebs Cycle Activity for Energy Generation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 12854-12863.
- van Weelden, S., van Hellemond, J., Opperdoes, F., & Tielens, A. (2005). New Functions for Parts of the Krebs Cycle in Procyclic *Trypanosoma brucei*, a Cycle Not Operating as a Cycle. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 12451-12460.
- Vreede, J., Horst, M. V., Hellingwerf, K., Crielaard, W., & Aalten, D. V. (2003). PAS Domains. Common structure and common flexibility. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 18434–18439.
- Weber, K., Pringle, J., & Osborn, M. (1972). Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods in Enzymology*, 26, 3-27.

## APÉNDICE

**Tabla I.** Condiciones experimentales de los ensayos inmunológicos realizados con las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial: *Western blot*, *Dot Blot* y ELISA.

Inmunoensayo	Características
E01	<u>Anticuerpos:</u> IgG $\alpha$ -PAS dilución 1/100, $\alpha$ -IgG de conejo dilución 1/4000. <u>Sensibilización:</u> FRG 2,9 $\mu$ g y 5 $\mu$ g de proteína. <u>Control:</u> sin antígeno. <u>Observaciones:</u> prueba preliminar de diluciones de los anticuerpos. <u>Muestra:</u> solubilizadas con Tritón X-100 0,2% más NaCl 180 mM.
E02	<u>Anticuerpos:</u> IgG $\alpha$ -PAS dilución 1/200, $\alpha$ -IgG de conejo dilución 1/4000. <u>Sensibilización:</u> FRG 2,9 $\mu$ g y 5 $\mu$ g de proteína. <u>Control:</u> sin antígeno. <u>Observaciones:</u> prueba preliminar de diluciones de los anticuerpos. <u>Muestra:</u> solubilizadas con Tritón X-100 0,2% más NaCl 180 mM.
E03	<u>Anticuerpos:</u> IgG $\alpha$ -PAS dilución 1/200, $\alpha$ -IgG de conejo dilución 1/2000. <u>Sensibilización:</u> 5 $\mu$ g y 10 $\mu$ g de proteína de FN, FRG, FM, FC. <u>Control:</u> Blanco 1 (antígeno FRG 10 $\mu$ g, sin anticuerpo primario); Blanco 2 (sin antígeno). <u>Muestra:</u> descongeladas el día de la prueba, solubilizadas con Tritón X-100 0,2% más NaCl 180 mM, directo en la alícuota. <u>Observaciones:</u> prueba preliminar de diluciones de anticuerpos y solución de bloqueo; tiempo de revelado 15 minutos.
E04	<u>Anticuerpos:</u> IgG $\alpha$ -PAS dilución 1/200, $\alpha$ -IgG de conejo dilución 1/2000. <u>Sensibilización:</u> 5 $\mu$ g y 10 $\mu$ g de proteína de FN, FRG, FM, FC. <u>Control:</u> antígeno FRG 10 $\mu$ g, sin anticuerpo primario. <u>Muestra:</u> descongeladas por segunda vez el día de la prueba, solubilizadas con Tritón X-100 0,2% más NaCl 180 mM, directo en la alícuota. <u>Observaciones:</u> Repetición de E03.
E05	<u>Anticuerpos:</u> IgG $\alpha$ -PAS dilución 1/200, $\alpha$ -IgG de conejo dilución 1/2000. <u>Sensibilización:</u> 5 $\mu$ g y 10 $\mu$ g de proteína de FN, FGG, FRG, FM, FC. <u>Control negativo:</u> antígeno FRG 10 $\mu$ g, sin anticuerpo primario. <u>Control positivo:</u> 100 $\mu$ l de dominio PAS recombinante. <u>Muestra:</u> descongeladas por segunda vez el día de la prueba, solubilizadas con Tritón X-100 0,2% más NaCl 180 mM, directo en la alícuota. <u>Observaciones:</u> Se trabajó con alícuotas más pequeñas producto de las fracciones originales.
E06	<u>Anticuerpos:</u> IgG $\alpha$ -PAS dilución 1/200, $\alpha$ -IgG de conejo dilución 1/2000. <u>Sensibilización:</u> 5 $\mu$ g y 10 $\mu$ g de proteína de FN, FGG, FRG, FM, FC. <u>Control negativo:</u> antígeno FRG 10 $\mu$ g, sin anticuerpo primario. <u>Control positivo:</u> 100 $\mu$ l de dominio PAS recombinante. <u>Muestra:</u> descongeladas por primera vez el día de la prueba, solubilizadas con Tritón X-100 0,2% más NaCl 180 mM, en un volumen tomado de la alícuota original. <u>Observaciones:</u> La muestra restante se preparó para electroforesis.
E07	<u>Anticuerpos:</u> IgG $\alpha$ -PAS dilución 1/200, $\alpha$ -IgG de conejo dilución 1/2000. <u>Sensibilización:</u> 5 $\mu$ g y 10 $\mu$ g de proteína de H, FN, FGG, FRG, FM, FC. <u>Control negativo:</u> antígeno FRG 10 $\mu$ g, sin anticuerpo primario. <u>Control positivo:</u> 100 $\mu$ l de dominio PAS recombinante. <u>Muestra:</u> descongeladas por primera vez el día de la prueba, solubilizadas con Tritón X-100 0,2% más NaCl 180 mM, en un volumen tomado de la alícuota original; se centrifugaron las muestras a máxima velocidad antes de sensibilizar. <u>Observaciones:</u> Se trabajó con fracciones obtenidas más recientemente que en las pruebas anteriores.
E08	<u>Anticuerpos:</u> IgG $\alpha$ -PAS dilución 1/1000, $\alpha$ -IgG de conejo dilución 1/2000. <u>Sensibilización:</u> 5 $\mu$ g de proteína de H, FN, FGG, FRG, FM, FC. <u>Control negativo:</u> antígeno FRG 5 $\mu$ g, sin anticuerpo primario. <u>Control positivo:</u> 100 $\mu$ l de dominio PAS recombinante. <u>Muestra:</u> descongeladas por primera vez el día de la prueba, solubilizadas con Tritón X-100 0,3% más NaCl 270 mM, directamente en la alícuota.
E09	<u>Anticuerpos:</u> IgG $\alpha$ -PAS dilución 1/1000, $\alpha$ -IgG de conejo dilución 1/2000. <u>Sensibilización:</u> 50, 25, 12,5, 6 y 3 $\mu$ g de proteína de H. <u>Control negativo:</u> antígeno FRG 50 $\mu$ g, sin anticuerpo primario. <u>Control positivo:</u> 100 $\mu$ l de dominio PAS recombinante. <u>Muestra:</u> descongeladas por segunda vez el día de la prueba, solubilizadas con Tritón X-100 0,3% más NaCl 270 mM, directamente en la alícuota. <u>Observaciones:</u> Prueba de titulación de antígeno.

ELISA

**Tabla I. Continuación**

Inmunoensayo	Características
ELISA	<p>E10 <u>Anticuerpos:</u> IgG <math>\alpha</math>-PAS dilución 1/1000, <math>\alpha</math>-IgG de conejo dilución 1/2000. <u>Sensibilización:</u> 6, 3, 1.5 y 0.75 <math>\mu</math>g de proteína de FRG. <u>Control negativo:</u> Blanco 1 (antígeno FRG 6 <math>\mu</math>g, sin anticuerpo primario); Blanco 2 (BSA 6 <math>\mu</math>g). <u>Control positivo:</u> 100 <math>\mu</math>l de dominio PAS recombinante; 100 <math>\mu</math>l de PAS-PGK-like recombinante. <u>Muestra:</u> descongeladas por primera vez el día de la prueba, no solubilizadas. <u>Observaciones:</u> Prueba de titulación de antígeno en ausencia de Tritón X-100.</p>
	<p>E11 <u>Anticuerpos:</u> IgG <math>\alpha</math>-PAS dilución 1/1000, <math>\alpha</math>-IgG de conejo dilución 1/2000. <u>Sensibilización:</u> 6, 3 y 1.5 <math>\mu</math>g de proteína de FRG. <u>Control negativo:</u> antígeno FRG 6 <math>\mu</math>g, sin anticuerpo primario. <u>Control positivo:</u> 100 <math>\mu</math>l de dominio PAS recombinante; 100 <math>\mu</math>l de PAS-PGK-like recombinante. <u>Muestra:</u> descongeladas por primera vez el día de la prueba, no solubilizadas, incubadas 90 minutos con Urea 2 M. <u>Observaciones:</u> Prueba de titulación de antígeno en ausencia de Tritón X-100, proteína desnaturalizada con Urea.</p>
Western Blot	<p>WB1 <u>Anticuerpos:</u> IgG <math>\alpha</math>-PAS dilución 1/100, <math>\alpha</math>-IgG de conejo dilución 1/2000. <u>Carga:</u> 50 <math>\mu</math>g de proteína de H, FN, FGG, FRG, FM, FC. <u>Revelado:</u> DAB <u>Observaciones:</u> Prueba preliminar de concentraciones de los anticuerpos.</p>
	<p>WB2 <u>Anticuerpos:</u> IgG <math>\alpha</math>-PAS dilución 1/1000, IgG <math>\alpha</math>-PPDK 1/1000, <math>\alpha</math>-IgG de conejo dilución 1/2000. <u>Carga:</u> 50 <math>\mu</math>g de proteína de H, FN, FGG, FRG, FM, FC. <u>Revelado:</u> DAB. <u>Observaciones:</u> Concentraciones óptimas de los anticuerpos, se toman como estandar en los ensayos siguientes.</p>
	<p>WB3 <u>Anticuerpos:</u> IgG <math>\alpha</math>-PAS dilución 1/1000, <math>\alpha</math>-IgG de conejo dilución 1/2000. <u>Carga:</u> 50 <math>\mu</math>g de proteína de H, FN, FGG, FRG, FM, FC. <u>Revelado:</u> DAB</p>
	<p>WB7 <u>Anticuerpos:</u> IgG <math>\alpha</math>-PAS dilución 1/1000, <math>\alpha</math>-IgG de conejo dilución 1/2000. <u>Carga:</u> 50 <math>\mu</math>g de proteína de H, FN, FGG, FRG, FM, FC. <u>Revelado:</u> Luminol. <u>Observaciones:</u> repetición WB3, con diferente revelado.</p>
	<p>WB9 <u>Anticuerpos:</u> IgG <math>\alpha</math>-PAS dilución 1/1000, <math>\alpha</math>-IgG de conejo dilución 1/2000. <u>Carga:</u> 80 <math>\mu</math>g de proteína de H, FN, FGG, FRG, FM, FC. Marcadores de peso molecular preteñidos <i>Invitrogen</i> 10 <math>\mu</math>l <u>Control:</u> 15 <math>\mu</math>l de PAS-PGK-like recombinante. <u>Revelado:</u> Luminol. <u>Observaciones:</u> muestras nuevas, cargadas inmediatamente después de ser preparadas en <i>Sampler buffer</i>.</p>
Dot Blot	<p>DB6 <u>Anticuerpos:</u> IgG <math>\alpha</math>-PAS dilución 1/1000, <math>\alpha</math>-IgG de conejo dilución 1/2000. <u>Carga:</u> 10 <math>\mu</math>l de muestra de H, FN, FGG, FRG, FM, FC. <u>Control:</u> 10 <math>\mu</math>l de PAS-PGK-like recombinante y 10 <math>\mu</math>l de dominio PAS recombinante. <u>Revelado:</u> DAB</p>
	<p>DB8 <u>Anticuerpos:</u> IgG <math>\alpha</math>-PAS dilución 1/1000, <math>\alpha</math>-IgG de conejo dilución 1/2000. <u>Carga:</u> 50 <math>\mu</math>g de proteína de H, FN, FGG, FRG, FM, FC. <u>Control:</u> 10 <math>\mu</math>l de dominio PAS recombinante. <u>Revelado:</u> Luminol</p>

**Tabla II.** Condiciones experimentales de los ensayos inmunológicos de *Western blot*, realizados con las fracciones obtenidas por permeabilización selectiva con digitonina.

	<b>Inmunoensayo</b>	<b>Características</b>
<b>Western Blot</b>	WB4A WB4B	<u>Anticuerpos:</u> IgG $\alpha$ -Enolasa dilución 1/2000, $\alpha$ -IgG de conejo dilución 1/4000. <u>Carga:</u> 20 $\mu$ l de proteína de sobrenadantes. <u>Revelado:</u> Luminol. <u>Observaciones:</u> las muestras fueron concentradas 5X, mediante rotoevaporación. Este ensayo se realizó en la misma membrana que WB4E/WB4F, mediante <i>Stripping</i> .
	WB4C WB4D	<u>Anticuerpos:</u> IgG $\alpha$ -HK dilución 1/2000, $\alpha$ -IgG de conejo dilución 1/4000. <u>Carga:</u> 20 $\mu$ l de proteína de sobrenadantes. <u>Revelado:</u> Luminol. <u>Observaciones:</u> las muestras fueron concentradas 5X, mediante rotoevaporación. Este ensayo se realizó en la misma membrana que WB4E/WB4F, mediante <i>Stripping</i> .
	WB4E WB4F	<u>Anticuerpos:</u> IgG $\alpha$ -PAS dilución 1/1000, $\alpha$ -IgG de conejo dilución 1/4000. <u>Carga:</u> 20 $\mu$ l de proteína de sobrenadantes. <u>Control:</u> 20 $\mu$ l de PAS-PGK-like recombinante. <u>Revelado:</u> Luminol. <u>Observaciones:</u> las muestras fueron concentradas 5X, mediante rotoevaporación. Luego de este ensayo se realizó <i>Stripping</i> de la membrana, para probar diferentes anticuerpos en WB4A/WB4B y WB4C/WB4D.
	WB5A WB5B	<u>Anticuerpos:</u> IgG $\alpha$ -Enolasa dilución 1/2000, $\alpha$ -IgG de conejo dilución 1/4000. <u>Carga:</u> 20 $\mu$ l de proteína de sedimentos. <u>Revelado:</u> Luminol. <u>Observaciones:</u> este ensayo se realizó en la misma membrana que WB5E/WB5F, mediante <i>Stripping</i> .
	WB5C WB5D	<u>Anticuerpos:</u> IgG $\alpha$ -HK dilución 1/2000, $\alpha$ -IgG de conejo dilución 1/4000. <u>Carga:</u> 20 $\mu$ l de proteína de sedimentos. <u>Revelado:</u> Luminol. <u>Observaciones:</u> este ensayo se realizó en la misma membrana que WB5E/WB5F, mediante <i>Stripping</i> .
	WB5E WB5F	<u>Anticuerpos:</u> IgG $\alpha$ -PAS dilución 1/1000, $\alpha$ -IgG de conejo dilución 1/4000. <u>Carga:</u> 20 $\mu$ l de proteína de sedimentos. <u>Control:</u> 20 $\mu$ l de PAS-PGK-like recombinante. <u>Revelado:</u> Luminol. <u>Observaciones:</u> luego de este ensayo se realizó <i>Stripping</i> de la membrana para probar diferentes anticuerpos en WB5A/WB5B y WB5C/WB5D.

www.bdigital.ula.ve