

República Bolivariana de Venezuela  
Universidad de Los Andes  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología  
Laboratorio de Enzimología de Parásitos

**Expresión y purificación de la hexoquinasa utilizando el sistema homólogo pTcINDEX en epimastigotes recombinantes de Trypanosoma cruzi cepa EP**

---

Proyecto de Trabajo Especial de Grado para optar por el Título de Licenciado en Biología

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

Autor: Raquel Parada Puig  
Tutor: Dra. Ana Judith Cáceres Nicolielly

Mérida, Febrero de 2018

C.C Reconocimiento

*“Nada te turbe, nada te espante,  
todo se pasa, Dios no se muda;  
la paciencia todo lo alcanza;  
quien a Dios tiene nada le falta:  
sólo Dios basta”*

***Santa Teresa de Ávila***

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

*“Buscando mis amores,  
iré por estos montes y riberas;  
ni cogeré las flores,  
ni temeré las fieras  
y pasaré los fuertes y fronteras”*

***San Juan de La Cruz***

## Agradecimientos

A Dios, porque en su infinita misericordia y bondad me regaló el don y la gracia gratuita de estar viva y conocerle.

A mis padres Marina y Marco, porque contribuyeron con el regalo de mi existencia y por ser pilares fundamentales de mi vida, apoyándome en los buenos momentos y en los adversos también. Porque me han regalado su amor a través de mis queridos hermanos, de su presencia incondicional y de las llamadas de atención oportunas. Porque por ellos soy quien soy.

A la profesora Ana Cáceres por ser la mejor tutora y compañera de experimentos. Por recibirme en el laboratorio y darme la oportunidad de trabajar y aprender de mis errores. Por su paciencia y por el cariño de madre con el que guió este proyecto. Por su confianza y su estima.

A la Universidad de Los Andes por abrirme las puertas y a todos los profesores que se esforzaron en mi formación, en especial a Gustavo Fermín, Masyelly Rojas y Héctor Acosta. Mil gracias.

A mis hermanos Gabriela, Jorge Eduardo, Israel y Rolando y a sus pequeños núcleos familiares, porque a pesar de no entender nada preguntan: ¿cómo vas?. Porque aún en la distancia física y emocional que nos separa, sé y saben que están en lo profundo de mi corazón y que todos de alguna manera han contribuido con este logro.

A Rolando, por esperarme paciente o impacientemente, por levantarse temprano para llevarme o buscarme tarde en la noche en el laboratorio. Por hacérmelo fácil y difícil al mismo tiempo. Por echarle aire a los cauchos, por auxiliarme cuando me quedé varada... Por estar allí desde el principio y siempre.

A mi abuelo Juan por alegrarse conmigo, por preocuparse, por enorgullecerse tan abiertamente de mí, aun cuando no merezco tanto. Por tanta paciencia y por tanto amor. Por ser ejemplo y por toda su ayuda. Por su compañía e insistencia en la perseverancia del cariño sobre la pelea.

A toda la familia fuera del núcleo de padres, hijos y abuelos; porque sé que me aman y que estuvieron orando por mí.

A Román David, por su paciencia infinita, su amor infinito e incondicional, su dureza y sensibilidad. Por su perseverancia en nuestra relación. Por sus consejos oportunos, por su silencio, por su compañía eterna. Por su apoyo y por tantas cosas inexplicables. Por compartir conmigo tantos sentimientos y tantos sueños. Este logro no hubiera sido posible sin tu ayuda emocional y logística. Te amo.

A toda la familia González-Mora-Coronado, por todo su apoyo, por la cálida acogida en el interior de su hogar, por todos los almuerzos salva-vidas y por todos los gestos de cariño que recibo de ellos.

A mi fabuloso, único e inigualable compañero, amigo y hermano: Robert. Por su hermosa amistad durante la carrera. Por los hermosos momentos que compartimos juntos durante la preparaduría de Fisiología y durante las dos pasantías que hicimos juntos. Por todos sus sabios consejos y por la compañía que siempre representa. Porque a pesar de que nos separamos, sé que nuestra relación durará en el tiempo y que tendremos más aventuras juntos. Te quiero amigo.

Al grupo fantástico de preparadores y tesistas de la facultad: Adriana, Yossmayer, Danielle, José Daniel, Francisco y José Manuel. Porque sé que andan por ahí, pendientes. Los quiero mucho y me alegra haber compartido con ustedes parte importante de mi carrera, la distancia nos separa que estoy segura de que volveremos encontrarnos en alguna parte del mundo. Gracias también a todos los compañeros inigualables: Greysa, Liara, Edwin, María Antonieta y todos los que aún en mi corazón no menciono.

## Resumen

*T. cruzi* posee un metabolismo energético que depende principalmente de glucosa como fuente de carbono y energía. Gran parte de la vía glicolítica en *T. cruzi* está compartimentalizada en el interior de los glicosomas, y la primera reacción de la ruta corresponde a la transferencia de un grupo fosforilo a la glucosa, catalizada por la HK. Empleando el sistema homólogo pTcINDEX en *T. cruzi*, el objetivo fundamental de este trabajo fue la caracterización fenotípica de los parásitos mutantes que sobre-expresan la enzima HK-(His)<sub>6</sub>, la optimización de la expresión y la caracterización de la misma en términos bioquímicos. Los resultados indican que la HK-(His)<sub>6</sub> puede ser sobre-expresada 8 veces más respecto a la enzima natural, sin efectos cuantificables sobre el crecimiento, consumo de glucosa, producción de amonio o expresión de las enzimas GlcK y G6PDH. La enzima fue purificada a homogeneidad en un solo paso cromatográfico por IMAC a partir de una fracción enriquecida de glicosomas de los epimastigotes recombinantes inducidos con 5µg/ml de tetraciclina. La HK-(His)<sub>6</sub> resultó ser más afín al anómero α de la D-glucosa ( $K_M$  de 33µM y  $V_{máx}$  de 0.807U/mg) y fue capaz de fosforilar D-glucosamina ( $K_M$  de 863µM y  $V_{máx}$  de 1.27 U/mg), pero fue incapaz de fosforilar N-Acetilglucosamina.

Palabras Claves: Epimastigotes, glicosoma, hexoquinasa, pTcINDEX, purificación, sobre-expresión, *T. cruzi*

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

## Índice General

1	Introducción .....	1
1.1	Enfermedad de Chagas .....	1
1.2	<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	2
1.3	Características generales de los Tripanosomátidos .....	2
1.4	Metabolismo Intermediario .....	4
1.5	Hexosas quinasas .....	5
1.6	Antecedentes.....	6
2	Hipótesis .....	8
3	Objetivos .....	8
3.1	Objetivo General.....	8
3.2	Objetivos Específicos .....	8
4	Justificación .....	8
5	Metodología .....	9
5.1	Materiales .....	9
5.1.1	Parásitos .....	9
5.1.2	Medios de cultivo .....	9
5.2	Métodos .....	9
5.2.1	Curvas de crecimiento para los epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	9
5.2.2	Cuantificación de proteínas .....	10
5.2.3	Análisis por SDS-PAGE .....	10
5.2.4	Cuantificación de la expresión de la hexoquinasa en los parásitos recombinantes..	10
5.2.5	Determinación de la concentración de Glucosa y Amonio .....	12
5.2.6	Localización sub-celular de la hexoquinasa recombinante (HK-(His) <sub>6</sub> ) por Inmunofluorescencia.....	12
5.2.7	Purificación de la HK-(His) <sub>6</sub> por cromatografía de afinidad a metales (His-Link, Promega) .....	13
5.2.8	Determinación de la $K_M$ y $V_{máx}$ para los anómeros $\alpha$ -Glucosa, $\alpha/\beta$ -Glucosa y uso de otros amino-azúcares como sustratos.....	15
6	Resultados .....	16
6.1	Análisis fenotípico de los epimastigotes de <i>T. cruzi</i> pTcINDEXHK cepa EP .....	16

6.1.1	Efecto de la sobreexpresión de la HK-(His) <sub>6</sub> en el consumo de glucosa y aminoácidos .....	22
6.1.2	Localización sub-celular de la hexoquinasa recombinante (HK-(His) <sub>6</sub> ) por Inmunofluorescencia.....	23
6.2	Caracterización cinética de la enzima recombinante HK-(His) <sub>6</sub> .....	24
6.2.1	Determinación de las constantes $K_M$ y $V_{máx}$ para los anómeros D- $\alpha$ -glucosa y D- $\alpha/\beta$ -glucosa.....	27
6.2.2	Determinación de la capacidad de uso de amino-azúcares como sustrato .....	30
7	Discusión.....	32
7.1	Análisis fenotípico de los epimastigotes recombinantes de <i>T. cruzi</i> pTcINDEXHK cepa EP.....	33
7.2	Caracterización cinética de la enzima recombinante (HK-(His) <sub>6</sub> ) .....	36
7.2.1	Purificación por cromatografía de afinidad a metales.....	36
7.2.2	Determinación de las constantes $K_M$ y $V_{máx}$ .....	37
7.2.3	Determinación de la capacidad de fosforilación de hexosaminas.....	39
8	Conclusiones .....	42
9	Bibliografía .....	43

www.bdigital.ula.ve

# 1 Introducción

## 1.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una condición clínica causada por la infección con el protozooario *Trypanosoma cruzi*, que es transmitido por algunas especies de insectos vectores reduvídeos de la subfamilia Triatominae (Teixeira *et al.*, 2006; Rassi Jr *et al.*, 2012). Fue descubierta hace más de cien años por el médico brasileño Carlos Chagas, quien descubrió la enfermedad, un nuevo parásito, su insecto vector y las principales manifestaciones clínicas agudas (Coura & Borges-Pereira, 2010).

Reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una de las 13 enfermedades tropicales desatendidas a nivel mundial, la enfermedad de Chagas representa una importante afección para la humanidad desde hace cientos de años y continúa siendo un problema relevante en términos económicos y sociales en muchos países de Latinoamérica (Rassi *et al.*, 2010). Es una enfermedad endémica en Suramérica, Centroamérica y parte de Norteamérica, aunque se ha detectado su presencia también en otros continentes. Durante el primer trimestre del año 2016 se estimó que para entonces existían cerca de 7 millones de personas infectadas a nivel mundial, y que el número de personas en riesgo de contraer la infección podría ser aún mayor (OMS, 2017).

En el cuadro clínico de esta enfermedad pueden reconocerse varias fases: una aguda, una indeterminada y una crónica. La fase inicial o aguda de la infección con *T. cruzi* dura de 4-8 semanas y es comúnmente asintomática. Pueden presentarse, sin embargo, durante las dos primeras semanas después de la invasión de los parásitos, e independientemente del mecanismo de transmisión, síntomas consistentes en fiebres prolongadas, hinchazón o recrecimiento de hígado, bazo y nódulos linfáticos y edemas subcutáneos localizados o generalizados. En la transmisión mediada por el insecto vector, usualmente hay signos de la entrada del parásito tales como el chagoma (en la piel) y el signo de Romana (en los ojos). El método para el diagnóstico durante esta etapa de la enfermedad incluye frotis sanguíneos y detección microscópica del parásito (Rassi Jr *et al.*, 2012). En la mayoría de los pacientes que han sido infectados con *T. cruzi* se desarrolla una respuesta inmune acompañada de disminución de la parasitemia y desaparición progresiva de los síntomas; etapa que se conoce como la fase indeterminada de la infección, y se caracteriza por la presencia de anticuerpos contra el parásito en el suero y la ausencia de manifestaciones clínicas (Hemmige *et al.*, 2012). Décadas después del cuadro inicial, cerca del 30% de los pacientes que entraron en fase indeterminada pueden desarrollar complicaciones severas, progresando hacia la fase crónica. Las manifestaciones en estos casos se hacen evidentes como padecimientos cardíacos o gastrointestinales, y el diagnóstico, debido al bajo número de parásitos en sangre, además de la exploración clínica de los pacientes, depende usualmente de técnicas como la inmunodetección y el PCR (Rassi Jr *et al.*, 2012).

Hace algunas décadas se desarrollaron los dos únicos tratamientos farmacológicos disponibles en la actualidad para combatir la enfermedad de Chagas. Se trata de los compuestos nitroheterocíclicos benznidazol y nifurtimox. Los efectos citotóxicos y genotóxicos asociados con estas sustancias están relacionados con sus estructuras químicas, que resultan en la liberación de radicales electrofílicos por nitro-reducción enzimática y la toxicidad afecta tanto al parásito como a cualquier célula expuesta del hospedador. De estos dos fármacos el más empleado, debido a su mayor efectividad, es el benznidazol, a pesar de los numerosos efectos secundarios adversos que acompañan a su administración, tales como: sarpullidos, eritrodermias, neuropatías periféricas y supresión de la médula ósea (Hemmige *et al.*, 2012). Así pues, y aun cuando se trata de las pocas drogas disponibles en el mercado mundial, el tratamiento con las mismas ha tenido un éxito limitado en las distintas fases de la enfermedad (Teixeira

*et al.*, 2006); por lo que los estudios bioquímicos relacionados al metabolismo del parásito han cobrado importancia en los últimos años para el descubrimiento de nuevos blancos quimioterapéuticos para el diseño de nuevas drogas.

## 1.2 *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* es un organismo protozooario parasítico, flagelado, perteneciente a la clase Euglenozoa, al orden Kinetoplastida, a la familia Trypanosomatidae y al género *Trypanosoma*. Posee un ciclo de vida digenético, con cuatro estadios diferentes repartidos entre el insecto vector y el mamífero hospedador. En la sangre del mamífero hospedador, los tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* constituyen una población pleomórfica, consecuentemente, cuando el insecto reduvídeo se alimenta de la sangre de mamíferos infectados, se lleva una población heterogénea de tripomastigotes sanguíneos y una menor proporción de amastigotes. Una vez en el intestino medio del vector, y dependiendo de la densidad celular, los tripomastigotes sanguíneos se diferencian a epimastigotes, que representan la forma replicativa en el vector (Tyler & Engman, 2001). Los epimastigotes alcanzan la ampolla rectal del insecto y es allí donde una gran proporción de los mismos se diferencia en tripomastigotes metacíclicos infectivos no replicativos, que son excretados con las heces del insecto junto a epimastigotes no diferenciados (Brenner, 1973).

La infección de un mamífero ocurre generalmente cuando un insecto se alimenta, y al defecar, tales deposiciones que contienen las formas metacíclicas contaminan las membranas mucosas o la herida causada por el insecto. Los tripomastigotes metacíclicos son capaces de parasitar múltiples células nucleadas del mamífero, gracias a un mecanismo que permite el reclutamiento de lisosomas en la cara interna del sitio de adhesión del parásito a la membrana celular. Esta fusión da lugar a una vacuola parasitófora, cuyo interior se acidifica y permite la liberación de los parásitos hacia el citosol, por activación de una proteína tipo porina secretada por los mismos. En el citosol, los tripomastigotes se diferencian en la forma replicativa amastigota, proliferan y forman un pseudoquiste de alta densidad celular que permite la diferenciación y liberación, al torrente sanguíneo, de tripomastigotes capaces de infectar nuevas células. Los tripomastigotes sanguíneos, una vez ingeridos por un insecto triatomino al alimentarse de la sangre de un mamífero infectado, completan el ciclo de vida del parásito (Tyler & Engman, 2001).

## 1.3 Características generales de los Tripanosomátidos

Los tripanosomátidos se distinguen de otros protozoarios flagelados por la presencia de una única mitocondria, el mitocondrión, que se ramifica a lo largo de todo el cuerpo celular y que posee una región especializada conocida como el kinetoplasto. El ADN mitocondrial se localiza en este kinetoplasto y corresponde a cerca del 20% o más del ADN celular total (Cazzulo, 1992; Lopes *et al.*, 2010). El ADN del kinetoplasto (kADN) está compuesto de moléculas circulares topológicamente relajadas y entrelazadas que forman una gran red. Existen dos tipos de anillos de kADN, los minicírculos y los maxicírculos. Usualmente hay miles de minicírculos, cuyo rango de tamaño oscila entre 0.5 y 10 kb, y algunas docenas de maxicírculos, cuyo tamaño varía entre 20 y 40 kb. Los maxicírculos son análogos al ADN mitocondrial de los eucariotas superiores y codifican dos ARNs ribosómicos, numerosas subunidades de los complejos respiratorios y algunos ARNs guías. Los minicírculos, por otro lado, codifican ARNs guías que modifican los transcritos de los maxicírculos a través de un mecanismo de edición que inserta y/o elimina residuos de uridinas, generando así ARN mensajeros maduros con marcos de lectura abiertos que pueden ser traducidos a proteínas (Lopes *et al.*, 2010).

Otra peculiaridad de todos los miembros de la familia Trypanosomatidae tiene que ver con la compartimentalización de las seis o siete primeras reacciones de la ruta glicolítica en el interior de los glicosomas, organelas tipo peroxisomas específicas para el orden Kinetoplastida (Cazzulo, 1992; Tielens & Van Hellemond, 1998; Michels *et al.*, 2000; Michels *et al.*, 2006). Además de las primeras enzimas de la glicólisis, los glicosomas albergan enzimas para la ruta biosintética de las pirimidinas y la ruta de recuperación de purinas, así como para la síntesis de éter lípidos y la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Lopes *et al.*, 2010; Michels *et al.*, 2000). Los glicosomas mejor estudiados han sido los de *T. brucei*, y se ha demostrado mediante análisis morfométricos que tales organelas, rodeadas por una capa fosfolipídica de 6-7nm de espesor, son homogéneas en tamaño, con un diámetro promedio alrededor de 0.27 $\mu$ m. No poseen un genoma propio y en general, a diferencia de otros microcuerpos y al menos en la familia Trypanosomatidae, no contienen enzimas como oxidasas productoras de peróxido de hidrógeno o catalasas (Opperdoes, 1987). La composición de glicosomas varía entre los diferentes estadios del ciclo de vida de los parásitos (Bauer & Morris, 2017) y las proteínas presentes en la densa matriz de los glicosomas están codificadas por el genoma nuclear y son sintetizadas por ribosomas libres en el citosol. Estas organelas adquieren sus proteínas de matriz mediante la importación desde el citosol, a través de rutas que dependen principalmente de dos secuencias de señalización específicas para el peroxisoma (PTS, por las siglas en inglés *Peroxisomal Targeting Signal*) que son reconocidas por receptores citosólicos específicos: las peroxinas (PEX). La mayor parte de las proteínas de la matriz glicosomal posee una secuencia tipo PTS1 en el extremo carboxilo terminal, que está constituida de tres residuos aminoacídicos (SKL) o sus variantes conservativas y que son reconocidas por el receptor PEX5. No obstante, existen proteínas, como por ejemplo la hexoquinasa, que poseen una secuencia señal diferente, conocida como PTS2, ubicada en el extremo amino terminal, que es una señal bipartita con la secuencia consenso [RK]-[LVI]-x5-[HQ]-[LA], reconocida por el receptor PEX7. Los receptores citosólicos, una vez reconocen la secuencia señal en las proteínas glicosomales, las dirigen hacia el complejo receptor de la membrana del glicosoma, comprendido por las proteínas PEX13 y PEX14, capaces de mediar la translocación de la proteína hacia la matriz de la organela (Galland *et al.*, 2007). Aunque es cierto que por lo general las proteínas destinadas a estas organelas emplean las secuencias PTS para su correcta importación, algunas de ellas, carentes de dichas secuencias, pueden ingresar a la matriz glicosomal ayudadas por proteínas que sí las poseen, evento conocido como “piggybacking” (Opperdoes & Szikora, 2006; Galland *et al.*, 2007).

Se piensa que la existencia de los glicosomas confiere a los miembros del grupo de los tripanosomátidos cierta plasticidad metabólica y esta hipótesis se basa en (1) las grandes variaciones del contenido enzimático presente entre los diferentes tripanosomátidos e incluso dentro de la misma especie al comparar los diferentes estadios del ciclo de vida; (2) la presencia de enzimas clave de muchas rutas metabólicas o parte de ellas en el interior de dichas organelas y (3) la rapidez y eficiencia con la que glicosomas con cierto repertorio enzimático pueden ser cambiados por una nueva población de glicosomas con repertorios diferentes cuando los parásitos pasan por eventos de diferenciación relacionados con el hospedador o con un compartimiento del mismo, que muchas veces se acompaña de drásticos cambios nutricionales (Haanstra *et al.*, 2016).

Otro rasgo característico de los tripanosomátidos es que estos poseen un mecanismo de transcripción inusual respecto a la mayoría de los organismos eucariotas que pone en evidencia su carácter de eucariotas “primitivos”, y es que sus genes no poseen regiones promotoras típicas para la ARN polimerasa II, por lo que los ARNm se expresan como grandes unidades policistrónicas de genes, que a diferencia de los procariotas, usualmente no codifican proteínas con funciones relacionadas. La maduración de los ARN mensajeros nucleares ocurre entonces por dos eventos acoplados conocidos como “*trans-splicing*” o *trans-empalme* y poliadenilación. Durante el *trans-splicing* las unidades policistrónicas de ARNm son separadas en ARNm individuales y luego ocurre la adición al extremo 5’

de una secuencia líder o mini-exón de 39 nucleótidos que previamente ha sido modificada con una estructura de capucha, mientras que en el extremo 3' se adiciona una cola de poli-adeninas, para luego ser exportados hacia el citoplasma y ser traducidos a proteínas (Vazquez, 2007; Lopes *et al.*, 2010).

#### 1.4 Metabolismo Intermediario

La mitocondria y los glicosomas, en conjunto con el espacio citoplasmático juegan un papel importante en muchas de las fases morfológicas de los tripanosomátidos, ya que los tres son compartimientos ocupados por numerosas enzimas y metabolitos responsables de la ocurrencia de diversas rutas metabólicas. Dado que estos protozoarios tienen un complejo ciclo de vida con diferentes formas entre el insecto vector y el mamífero hospedador, deben poseer cierta plasticidad metabólica, otorgada por algunas de las características singulares descritas con anterioridad, destacando entre ellas la presencia de los glicosomas.

En cultivos axénicos, los epimastigotes de *T. cruzi*, así como los estadios del invertebrado vector de otras especies relacionadas, consumen glucosa como principal fuente de carbono y energía, pudiendo también, dependiendo de ciertas condiciones ambientales, dirigir su metabolismo hacia el consumo de aminoácidos, la principal fuente de energía presente en el insecto vector (Cazzulo, 1992; Michels *et al.*, 2006). No obstante, y a diferencia de otros organismos eucariotas, el metabolismo de la glucosa en los tripanosomátidos no rinde como productos finales de la oxidación CO<sub>2</sub> y agua. En lugar de ello, la evidencia sugiere que ocurre una oxidación parcial de la glucosa, liberándose al medio productos como ácidos orgánicos característicos de los procesos fermentativos, a saber: succinato, acetato y alanina (Michels *et al.*, 2006). A este proceso se le conoce como fermentación aeróbica, mecanismo que permite el rápido cambio de la glicólisis aeróbica a glicólisis anaeróbica, sin un efecto Pasteur evidente, y que se cree está dado gracias a la compartimentalización de esta ruta en el interior de los glicosomas (Cazzulo, 1992).

En la matriz glicosomal de los epimastigotes se encuentran las enzimas responsables de la oxidación de la glucosa hasta 1,3-bisfosfoglicerato, y con ello la producción neta de energía ocurre en el citosol gracias a la reacción catalizada por la piruvato quinasa (PYK). Cabe destacar que la regulación de las enzimas Hexoquinasa (HK) y Fosfofructoquinasa (PFK) en estos parásitos presenta marcadas diferencias respecto a las de otros eucariotas al no estar reguladas por efectores alostéricos o intermediarios de reacción (Maugeri *et al.*, 2011). Dentro de la organela, los balances energético (ATP/ADP) y redox (NAD<sup>+</sup>/NADH) deben ser mantenidos, en vista de que no se han encontrado evidencias experimentales que sugieran el posible ingreso de estos compuestos a través de la membrana glicosomal. Para ello, la acción conjunta de enzimas como la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la piruvato fosfato diquinasa (PPDK) parece funcionar en el mantenimiento del balance ATP/ADP, mientras que el balance NAD<sup>+</sup>/NADH podría ser mantenido por la malato deshidrogenasa glicosomal y la fumarato reductasa dependiente de NADH glicosomal o por la lanzadera glicerol 3-fosfato y la oxidasa alternativa en el mitocondrion (Bringaud *et al.*, 2006; Michels *et al.*, 2006).

Además de las enzimas glicolíticas, se ha demostrado que los glicosomas albergan enzimas responsables de la catálisis de otras rutas metabólicas, entre ellas, y como otra ruta de consumo de glucosa, la rama oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato (PPP, por sus siglas en inglés *Pentose Phosphate Pathway*). Dicha ruta posee dos roles principales que son la reducción del NADP<sup>+</sup> a NADPH, necesario para las rutas biosintéticas, y la protección de la célula contra el estrés oxidativo causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*), así como la producción de ribulosa 5-fosfato, necesaria para la síntesis de ácidos nucleicos. Se ha demostrado que esta ruta es activa en la mayor parte de los estadios del ciclo de vida de muchas

especies de tripanosomátidos, dirigiendo cerca del 10% de la glucosa metabolizada hacia esta vía. No obstante, en condiciones de baja concentración de glucosa, la ruta de las PPP funciona para el mantenimiento de la homeóstasis celular de NADPH, al dirigir el metabolismo hacia la oxidación de la G6-P (Haanstra *et al.*, 2016). A diferencia de la mayoría de los eucariotas, donde esta ruta ha sido descrita con ubicación citosólica, en los tripanosomátidos posee una ubicación dual entre el citosol (80%) y los glicosomas (20%) (Maugeri & Cazzulo, 2004; Maugeri *et al.*, 2011; Stincone *et al.*, 2014).

## 1.5 Hexosas quinasas

La primera reacción de la ruta glicolítica en todos los organismos eucariotas es catalizada por la Hexoquinasa, responsable de la transferencia de un grupo fosforilo a la glucosa. Se clasifica dentro de una de las dos familias de glucosas quinasas: la familia Hexoquinasa (HK), cuyos miembros se subdividen en tres grupos: HK, A y B. La familia HK se caracteriza por tener como donador del grupo fosforilo al ATP, y los integrantes de los grupos que la conforman difieren entre sí respecto a su peso molecular (entre 100 y 60 kDa) y a la especificidad de sustrato. El grupo HK alberga las hexoquinasas pertenecientes a organismos eucariotas, conocidas también como las ATP: D-hexosa 6-fosfotransferasas, mientras que los grupos A y B están representados por enzimas pertenecientes a bacterias Gram-negativas, cianobacterias, protistas amitocondriados y tripanosomátidos (grupo A) y bacterias Gram-positivas y organismos crenarqueotas (grupo B), estos dos últimos grupos comprendidos por enzimas conocidas como glucoquinasas (GlcKs) capaces de fosforilar exclusivamente D-glucosa y cuyo nombre formal es ATP: D-glucosa 6-fosfotransferasas (Kawai *et al.*, 2005; Cáceres *et al.*, 2007).

En *T. cruzi* la hexoquinasa (*TcHK*) tiene una masa molecular de 52kDa. Dicha enzima posee una señal de importación glicosomal tipo PTS2, un punto isoeléctrico de alrededor de 9.7 (característico de las enzimas glicosomales) y una alta afinidad por la glucosa ( $K_M$  de 43 $\mu$ M). A diferencia de la hexoquinasa de otros organismos, la *TcHK* no es regulada alostéricamente por su producto (glucosa 6-fosfato (G6-P)) u otros efectores metabólicos; en lugar de ello, su actividad parece estar modulada por mecanismos histeréticos y algunos metabolitos como el pirofosfato inorgánico (PPi) (Cáceres *et al.*, 2003; Hudock *et al.*, 2006; Sanz-Rodríguez *et al.*, 2007; Acosta *et al.*, 2014). Además, la *TcHK*, de manera semejante a lo que ocurre con su homóloga en *T. brucei*, posee una estructura oligomérica compleja, pudiendo hallarse en forma de tetrámeros de cerca de 200kDa o hexámeros, lo que pudiese también tener un efecto regulatorio sobre su actividad y pudiese ser consecuencia de la compartimentalización dentro del glicosoma (Cáceres *et al.*, 2003; Chambers *et al.*, 2008).

En el mamífero hospedador se ha demostrado la existencia de 4 isoenzimas hexoquinasas, pertenecientes al grupo HK. Tres de ellas (I, II, III) con una masa molecular de 100kDa, emplean glucosa con elevada afinidad y son inhibidas por G6-P. La IV, de 50kDa, conocida como glucoquinasa (GlcK), se diferencia de las anteriores por la alta especificidad y baja afinidad por la glucosa, así como también por no estar sometida a inhibición por parte de los productos de la reacción catalítica (Sebastian *et al.*, 1999; Cáceres *et al.*, 2003; Kawai *et al.*, 2005). Estas isoenzimas tienen localización citoplasmática y son activas como monómeros (Sebastian *et al.*, 1999), en contraste con lo reportado para la hexoquinasa de algunos tripanosomátidos, cuya ubicación es glicosomal y la forma activa se presenta como oligómero. Puede notarse así que la *TcHK* posee similitudes con la enzima tipo IV de mamíferos, respecto a la masa molecular y a la carencia de regulación por G6-P, y al mismo tiempo comparte características con las enzimas tipo I, II y III en relación a su afinidad por la glucosa (Cáceres *et al.*, 2003). Estas diferencias permiten pensar en esta enzima como un posible blanco terapéutico para el diseño de fármacos que funcionen para erradicar el parásito en pacientes infectados (Rivera *et al.*, 2009).

No obstante, *T. cruzi* posee una segunda enzima capaz de fosforilar glucosa. Estudios previos han comprobado la existencia de una verdadera glucoquinasa (GlcK) activa en los glicosomas de los parásitos, y que se encuentra más estrechamente relacionada con las enzimas del grupo A de la familia Hexoquinasa. Esta GlcK es de 43kDa de peso molecular, tiene una etiqueta de importación glicosomal tipo PTS-1 en su extremo C-terminal, está presente en menor cantidad (9 veces menos) que la hexoquinasa, tiene especificidad de sustrato exclusiva para la glucosa, con una selectividad moderada para el anómero  $\beta$  de la D-glucosa, pero con menor afinidad que la HK ( $K_M$  de 1mM) y recibe el grupo fosforilo del ATP con una  $K_M$  de 0.36mM; además tampoco es inhibida por G6-P ni PPI (Cáceres *et al.*, 2007), pero si por la D-glucosamina (D-GlcN) de forma competitiva mixta ( $K_i$  de 45 $\mu$ M para la glucosa y 84.8 $\mu$ M para ATP) y no competitivamente por la D-N-Acetilglucosamina (D-GlcNAc) ( $K_i$  de 15 $\mu$ M y 39 $\mu$ M para la glucosa y ATP, respectivamente) (Mercado, 2010). El rol aparente de esta enzima, debido a sus características contrastantes con la HK, especialmente la baja afinidad por su sustrato, se propone como el aporte de G6-P a procesos no catabólicos como lo es la producción de glicoconjugados de la membrana plasmática en especies de *Leishmania*, o hacia la ruta de las pentosas fosfato, en condición de alta concentración de glucosa y cuando la actividad de la HK está regulada por la concentración de PPI (Cáceres *et al.*, 2007).

Ambas enzimas (HK y GlcK) se expresan en todos los estadios del parásito, sin embargo, la GlcK se expresa mucho menos en el amastigote, mientras que la HK se expresa de manera constante (Gottberg, 2011). Adicionalmente, trabajos experimentales sobre-expresando la *TcGlcK* en epimastigotes de *T. cruzi* con el sistema pTcINDEX, han demostrado que un exceso de la misma puede ser inhibitorio para el crecimiento de los parásitos, “estancando” el flujo glicolítico, y se ha propuesto que el papel de la GlcK quizá sea el de regular la actividad HK por fenómenos de oligomerización (Ramírez, 2016). No obstante, aún no se ha dilucidado el rol preciso que cumple la GlcK en el metabolismo energético del parásito.

## 1.6 Antecedentes

Cáceres y colaboradores en 2003 clonaron, secuenciaron y expresaron el gen de la hexoquinasa de *T. cruzi* empleando un sistema heterólogo en *E. coli*. Una vez purificada la enzima, la caracterizaron bioquímicamente midiendo sus constantes cinéticas, peso molecular, estado de oligomerización y punto isoeléctrico, comparándolas con las constantes de la enzima natural purificada a partir de fracciones enriquecidas con glicosomas del parásito obtenidos por centrifugación diferencial. Encontraron adicionalmente que, al igual que en otros tripanosomátidos, esta enzima no es regulada por sus productos (ADP y G6-P) sino por pirofosfato inorgánico (PPI).

En *Trypanosoma brucei* la enzima hexoquinasa de la forma sanguínea de este parásito fue sobre-expresada y sub-expresada por Albert y colaboradores en el año 2005, la primera mediante introducción de una copia ectópica dentro de un cassette con un promotor inducible por tetraciclina, y la segunda estrategia mediante interferencia por ARN empleando un cassette cromosomal con un promotor inducible por tetraciclina. En los resultados, al sobre-expresar la HK (20% más que los parásitos sin inducir) no se observó ningún efecto sobre: (1) la actividad de otras enzimas glicolíticas; (2) el consumo de glucosa y (3) las tasas de crecimiento y consumo de oxígeno. También realizaron experimentos de inhibición de la expresión de la hexoquinasa por ARN de interferencia, obteniendo que sólo cuando la actividad HK caía más del 50%, era posible observar un retardo en el crecimiento de los parásitos. Ambos resultados confirmaron que la HK no ejerce control de flujo glicolítico y que el parásito tiene un exceso de enzima que impide observar un mayor efecto fenotípico al ser manipulados genéticamente.

Acosta y colegas (2014), empleando epimastigotes de *T. cruzi*, reportaron un comportamiento histerético en mediciones cinéticas realizadas con la *TcHK* purificada y la fracción rica en glicosomas, señalando que puede tratarse de un mecanismo regulatorio de la actividad enzimática.

Finalmente, en el trabajo realizado por Valera en 2014, se describe con detalle el desarrollo de una línea celular de epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* cepa EP mediante la utilización del vector de expresión homóloga pTcINDEX con el que se consiguió sobre-expresar la hexoquinasa recombinante de este mismo organismo con una etiqueta de expresión de 6 histidinas en su extremo C-terminal. En el trabajo se estudió el efecto de dicha sobre-expresión sobre la morfología, viabilidad y localización sub-celular de la enzima en los parásitos inducidos. La expresión fue seguida por RT-PCR, inmunodetección por Western-Blot, inmunofluorescencia y actividad enzimática, determinando que las células transfectantes eran heterogéneas en cuando a los niveles de expresión de la enzima recombinante, que no existían efectos sobre la viabilidad y morfología de los cultivos inducidos y que la enzima era sobre-expresada de forma activa y se localizaba correctamente en los glicosomas.

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

## 2 Hipótesis

Puesto que la hexoquinasa cumple un rol esencial en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* al catalizar la primera reacción de la ruta glicolítica, se esperaría que la sobre-expresión de esta enzima no tuviese efectos deletéreos en el crecimiento de los mismos.

## 3 Objetivos

### 3.1 Objetivo General

Optimizar el sistema de expresión de la línea celular pTcINDEXHK para purificar la hexoquinasa recombinante de *Trypanosoma cruzi* en condiciones nativas.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar las condiciones de inducción de cultivos de epimastigotes recombinantes (pTcINDEXHK) de *Trypanosoma cruzi* en medio LIT.
- Cuantificar los niveles de expresión de la hexoquinasa recombinante (HK-(His)<sub>6</sub>) en epimastigotes recombinantes crecidos en medio LIT mediante medición de actividad enzimática y Western Blot.
- Estudiar el consumo de glucosa y aminoácidos en los cultivos de epimastigotes recombinantes crecidos en medio LIT bajo dos condiciones: inducidos y sin inducir.
- Evaluar la localización sub-celular de la HK-(His)<sub>6</sub> sobre-expresada en los epimastigotes recombinantes mediante Inmunofluorescencia.
- Purificar la HK-(His)<sub>6</sub> mediante una cromatografía de afinidad a metales (IMAC).
- Determinar las constantes cinéticas  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  para los anómeros  $\alpha$ -D-Glucosa y  $\alpha/\beta$ -D-Glucosa, así como para las hexosaminas N-Acetilglucosamina y D-Glucosamina.

## 4 Justificación

En vista de que la hexoquinasa de *T. cruzi* cataliza un importante paso de la ruta glicolítica en este parásito, la sobreexpresión y purificación de la enzima recombinante en un sistema homólogo permitiría no sólo dilucidar aspectos metabólicos de los parásitos recombinantes, sino también obtener la suficiente cantidad de proteína que podría ser utilizada ulteriormente para realizar estudios cristalográficos y diseño de fármacos que pudieran emplearse para el tratamiento de la enfermedad.

## 5 Metodología

### 5.1 Materiales

#### 5.1.1 Parásitos

Se empleó la línea celular de epimastigotes recombinantes de la cepa EP de *Trypanosoma cruzi* (pTcINDEXHK), obtenidos por Valera en 2014. Como control se utilizaron epimastigotes de la cepa EP de *T. cruzi* de genotipo silvestre (WT); ambas líneas celulares pertenecientes al Laboratorio de Enzimología de Parásitos, donde son mantenidas en medio LIT, en agitación constante a 28°C ó criopreservados en medio LIT con dimetilsulfóxido (DMSO) o 50% de Glicerol a -80°C.

#### 5.1.2 Medios de cultivo

Los parásitos fueron crecidos en medio de cultivo LIT (por sus siglas en inglés *Liver Infusion Tryptose*) modificado para parásitos recombinantes conteniendo 0.5% p/v de extracto de levadura; 0.002% p/v de hemina previamente diluida en NaOH 0.1N; 5% v/v de extracto de hígado de res; 5% v/v de suero fetal bovino (endotoxinas <10 EU/ml) (Qualified, Invitrogen); 1.5 % p/v de triptosa; 0.4% p/v de glucosa; 5.36 mM KCl; 35.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 154 mM NaCl. Suplementado con 0.006% de estreptomina y 0.01% de ampicilina. Al momento de la siembra de los parásitos recombinantes se agregaron al medio de cultivo los antibióticos de selección higromicina (hyg) y neomicina (G418), ambos a una concentración de 500µg/ml. El crecimiento se mantuvo en este medio con agitación constante a 28°C.

### 5.2 Métodos

#### 5.2.1 Curvas de crecimiento para los epimastigotes de *T. cruzi*

Las condiciones de crecimiento e inducción fueron determinadas según el protocolo establecido por Ramírez en 2016, mediante curvas de crecimiento comparativas tanto de los epimastigotes recombinantes inducidos como de los no inducidos, partiendo de inóculos con el mismo número de células (2,5x10<sup>6</sup> células/ml). Las curvas fueron establecidas mediante el registro periódico (cada 24h) de la absorbancia de los cultivos a 600nm en un espectrofotómetro Eppendorf Biophotometer Plus y conteo en cámara de Neubauer del número de parásitos por mililitro hasta alcanzar la fase estacionaria. Una vez alcanzada una densidad celular aproximada entre 5-10x10<sup>6</sup> células/ml, se indujo la producción de la enzima recombinante mediante la adición al medio del antibiótico inductor Tetraciclina (tet, 5µg/ml). La inducción se mantuvo hasta la fase estacionaria, añadiendo cada 24h el inductor en la misma concentración.

Por cada punto registrado en las curvas de crecimiento se tomaron fracciones de 5ml, se recogieron las células por centrifugación durante 15min a máxima velocidad (Eppendorf Centrifuge 5424) y luego de lavarlas con tampón normal (70mM Tris-HCl pH 7.4; 140mM NaCl y 100mM KCl) tres veces, resuspendiendo en 1ml, centrifugando y descartando el sobrenadante cada vez, se almacenaron a -80°C para su procesamiento posterior. De cada fracción se tomó 1ml del sobrenadante, correspondiente al medio de cultivo, que fue almacenado a -20°C hasta su uso. Los datos obtenidos fueron representados en gráficas D.O.<sub>600nm</sub> y #Células/ml en función del tiempo de crecimiento, promediando los resultados obtenidos de tres experiencias independientes.

## 5.2.2 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas en las muestras empleadas fue determinada mediante el método de mini-Bradford Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad) registrando la absorbancia de las muestras diluidas y mezcladas con el reactivo a 595nm, empleando albúmina de suero bovino como estándar.

## 5.2.3 Análisis por SDS-PAGE

La visualización de la proteína recombinante se llevó a cabo mezclando las fracciones obtenidas durante las diferentes experiencias con tampón de carga (62mM Tris-Base; 2% (p/v) SDS; 10% (v/v) Glicerol; 50mM DTT o 100mM 2-β mercaptoetanol y azul de Bromofenol, pH 6.8) e hirviendo durante 5min las muestras a cargar en geles de poliacrilamida al 12,5% según el protocolo establecido (Laemmli, 1970). Las proteínas separadas fueron teñidas con azul de Coomassie o fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa para inmunodetección por Western Blot.

## 5.2.4 Cuantificación de la expresión de la hexoquinasa en los parásitos recombinantes

### 5.2.4.1 Medición de la Actividad Enzimática

Como ponderación cuantitativa de la expresión de la hexoquinasa recombinante se midió su actividad por métodos espectrofotométricos, haciendo uso del sobrenadante del lisado de epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* no inducidos y en diferentes tiempos de inducción. Las muestras correspondieron a los sedimentos celulares almacenados a -80°C recogidos en los puntos a lo largo de las curvas de crecimiento, que una vez descongelados fueron mezclados con un tampón de lisis conteniendo 50mM de Tris-HCl; 0,1% Tritón X-100 y 500mM de KCl, en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (10μM leupeptina; 50μgml<sup>-1</sup> de inhibidor de tripsina; 1mM benzamidina; 50μM fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF); 100μM tosil-L-lisina clorometil cetona; 0.2μM pepstatina; 1μM E-64; 1μM quemostatina y 1μM bestatina). Luego de resuspender los sedimentos en el tampón de lisis, se añadió una mezcla de Nucleasas (Nuclease Mix, GE Healthcare) se incubó durante 30min en hielo, luego 15min a 37°C y 10min adicionales en hielo, para finalizar con una centrifugación a máxima velocidad durante 15min (Eppendorf Centrifuge 5424) donde los sobrenadantes fueron transferidos a tubos nuevos, mantenidos en hielo y empleados para los análisis ulteriores.

El sistema empleado para la detección de la enzima recombinante permitió acoplar la reacción de fosforilación de la glucosa a glucosa 6-fosfato (G6P) catalizada por la hexoquinasa, con la reducción de NADP<sup>+</sup> a NADPH catalizada por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; EC 1.1.1.49), que emplea como sustratos G6P y NADP<sup>+</sup>. La diferencia de absorbancia ( $\Delta A$ ) fue registrada a 340nm entre los 0 y 600seg en un espectrofotómetro UV-visible de arreglo de diodos Hewlett Packard 8452A, en cubetas de cuarzo de 1ml de capacidad, y la mezcla de reacción fue de 100mM de tampón TEA pH 7.6; 2.5mM ATP; 2.5mM MgCl<sub>2</sub>; 0.64mM NADP<sup>+</sup> y 5mM de glucosa en presencia de un volumen determinado de homogenato y 0.57U de G6PDH (G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides*, Sigma) todo a temperatura ambiente. Los valores de  $\Delta A$  registrados fueron convertidos a unidades de actividad empleando la ley de Lambert-Beer y los datos fueron reunidos en un gráfico de barras señalando los valores de actividad promedio de dos experimentos independientes versus el tiempo de crecimiento.

Además de cuantificar la expresión de la enzima recombinante de los parásitos inducidos y los no inducidos, se determinó la actividad G6PDH en cada punto de la curva, con el fin de determinar si su actividad era afectada por la sobre-expresión de la *TcHK*. La reacción fue medida en dirección de la oxidación de la glucosa 6-fosfato (G6P), monitoreando espectrofotométricamente la reducción del NADP<sup>+</sup> a 340nm, donde la diferencia de absorbancia ( $\Delta A$ ) fue medida entre los 0 y 240s. La mezcla de reacción fue de 100mM de tampón TEA, pH 7.6; 2.5mM MgCl<sub>2</sub>; 0.64mM NADP<sup>+</sup> y 1mM de G6P en presencia de un volumen que varió entre 5 y 10 $\mu$ l de cada homogenato de parásitos. Los valores de  $\Delta A$  registrados fueron convertidos a unidades de actividad empleando la ley de Lambert-Beer y los datos fueron reunidos en un gráfico de barras señalando los valores de actividad versus el tiempo de crecimiento.

#### 5.2.4.2 Western Blot Semicuantitativo

Una vez cuantificada la concentración de proteínas de los homogenatos obtenidos según apartados anteriores, fracciones de los mismos fueron separadas en base a su peso molecular en un gel de SDS-PAGE al 12%, cargando una concentración de 40 $\mu$ g totales de proteína por pozo. Las proteínas separadas fueron electrotransferidas hacia membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) empleando una unidad de transferencia *Semi-dry* (Amersham Biosciences) a 0.8 mA/cm<sup>2</sup> durante 90min, en tampón de transferencia (48mM Tris; 38mM glicina; 20% (v/v) metanol). Las membranas fueron bloqueadas en solución de bloqueo conteniendo 5% de leche descremada en PBS (80mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5 y 100mM NaCl) y 0.1% de Tween-20, durante toda la noche a 4°C. Luego de bloqueadas fueron lavadas 5 veces agitando durante 5min en PBS con 0,1% de Tween-20 cada vez.

A partir de las muestras recogidas durante un ensayo piloto, correspondientes a un cultivo inducido durante 72 h, se realizó una primera inmunodetección de la enzima recombinante y la nativa. Para ello las muestras correspondientes a los cuatro tiempos post-inducción separadas en dos geles idénticos fueron transferidas a dos membranas. Una de ellas fue incubada 1h a temperatura ambiente en agitación en solución incubación con 1% de leche descremada en PBS y el policlonal  $\alpha$ -*TcHK* (1/1000) producido en conejo. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó con  $\alpha$ -IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano picante (1/5000) (Fab) en las mismas condiciones del anticuerpo primario y el revelado se obtuvo con el sistema de detección ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) según las recomendaciones del fabricante. La otra membrana fue incubada en las mismas condiciones con el monoclonal  $\alpha$ -His-Tag (Promega) producido en ratón (1/3000) y con el secundario  $\alpha$ -IgG de ratón (1/4000) (Sigma) acoplado a peroxidasa de rábano picante. El revelado y procesamiento de las imágenes se llevó a cabo como lo descrito. Las membranas fueron escaneadas y procesadas empleando el sistema ChemiDoc™ Imaging Systems de Bio-Rad.

Ensayos posteriores para la inmunodetección de la HK nativa y recombinante contemplaron la incubación de las membranas con el policlonal  $\alpha$ -*TcHK* (1/1000), la incubación con el anticuerpo secundario y el revelado como se describió previamente. Luego las membranas fueron bloqueadas nuevamente e incubadas con el policlonal  $\alpha$ -*TcGlcK* (1/1000) producido en conejo, lavadas e incubadas con el  $\alpha$ -IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano picante (1/5000) y reveladas con el mismo sistema.

Las membranas fueron sometidas entonces a un “stripping” al ser incubadas a 50°C con un tampón compuesto de 100mM de 2-mercaptoetanol; 2% de SDS y 62,5mM de Tris-HCl a pH 6.7 durante

30min. Después de lavarlas 3 veces con tampón PBS en agitación durante 5min cada vez, las mismas fueron incubadas con el monoclonal  $\alpha$ -His-Tag (Promega) producido en ratón (1/1000) y con el policlonal  $\alpha$ -TcG6PDH producido en conejo (1/1000). El revelado se realizó de la misma forma descrita empleando como anticuerpos secundarios  $\alpha$ -IgG de ratón (1/4000) (Sigma) y  $\alpha$ -IgG de conejo (1/5000) acoplados a peroxidasa de rábano picante. Las imágenes obtenidas fueron procesadas y analizadas empleando las herramientas digitales ImageJ (NIH) e ImageLab (Bio-Rad) y los datos obtenidos del análisis fueron graficados en función del número de pixeles por área.

## 5.2.5 Determinación de la concentración de Glucosa y Amonio

El procedimiento seguido correspondió al realizado por Ramírez (2016) para la estimación del consumo de glucosa y producción de amonio en cultivos de epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* cepa EP. Fueron empleados los sobrenadantes de medio de cultivo almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  recogidos de los diferentes puntos de las curvas de crecimiento de los parásitos recombinantes descritas con anterioridad.

### 5.2.5.1 Determinación de la concentración de Glucosa

La glucosa fue cuantificada haciendo uso del kit de Glicemia enzimática AA de la línea líquida de Wiener Lab., de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial. El kit emplea un método colorimétrico donde la glucosa oxidasa se encarga de catalizar la oxidación de la glucosa presente en el medio con la producción concomitante de ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, siendo este último oxidado por la peroxidasa. Los electrones son transferidos a un aceptor cromático (rojo fenol), el cual produce una coloración de intensidad proporcional a la concentración de glucosa, que fue medida espectrofotométricamente a 505nm. Los cálculos pertinentes fueron realizados obteniendo la cantidad de glucosa en mg/dl, valores que fueron convertidos a unidades de milimolaridad (mM), normalizados respecto al logaritmo del #células/ml y promediados entre dos ensayos independientes para ser graficados en función del tiempo.

### 5.2.5.2 Determinación de la concentración de Amonio

La producción de amonio debida al consumo y degradación de aminoácidos fue determinada espectrofotométricamente empleando un sistema de detección comercial Ammonia Assay Kit (Sigma) según las recomendaciones del fabricante. Dicho sistema hace uso de la reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa, donde la cantidad de  $\text{NAD}^+$  producido a partir del NADH es proporcional a la cantidad de amonio presente en el medio. Las muestras fueron diluidas previo a la cuantificación y una vez realizados los cálculos respectivos se obtuvo la cantidad de amonio producido en mg/ml, valores que fueron transformados a unidades de milimolaridad (mM), normalizados con el logaritmo del #células/ml, promediados entre dos ensayos independientes y graficados en función del tiempo.

## 5.2.6 Localización sub-celular de la hexoquinasa recombinante (HK-(His)<sub>6</sub>) por Inmunofluorescencia

Con la finalidad de verificar la ubicación sub-celular de la enzima sobre-expresada en los parásitos recombinantes se realizó una inmunofluorescencia indirecta de las células inducidas durante 120h. En primer lugar se delimitaron los pozos a sensibilizar sobre láminas de vidrio para microscopía (8mm de

diámetro aproximadamente) con un lápiz punta de diamante. Dichas láminas fueron lavadas exhaustivamente con detergente, fueron dejadas durante 15min en ácido acético, luego 15min en alcohol etílico y finalmente 15min en agua destilada. Se dejaron secar a temperatura ambiente y cada pozo se sensibilizó con 10µl de 0,01% (p/v) de poli lisina, que fue dejada hasta secarse por completo.

Partiendo de un cultivo de epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* pTcINDEXHK sin inducir e inducidos durante 120h y de un cultivo de epimastigotes de la cepa EP de *T. cruzi* de genotipo silvestre (WT) con el mismo tiempo de crecimiento (168h), fueron tomadas fracciones de 1ml como base de trabajo. Las células fueron recogidas por centrifugación a 15000 rpm durante 10min (Eppendorf centrifuge 5424) y el sedimento fue resuspendido en 1ml de tampón fosfato salino isosmótico (PBSi: 39mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 274mM NaCl y 22mM KCl; pH 7.4). Las células fueron nuevamente recogidas por centrifugación a 3000 rpm durante 10min y este procedimiento de lavado fue repetido 3 veces. Luego de cada uno de los lavados se verificó la integridad celular por observación directa al microscopio. Finalizado el último lavado, las células se diluyeron (1/10) con PBSi con el fin de evitar aglomerados celulares durante la fijación. Una vez diluidas, éstas fueron fijadas con solución de fijación (PBSi con 4% de formaldehído) durante 3min (1:30min en agitación suave y 1:30min de centrifugación a máxima velocidad). Inmediato a la incubación con el formaldehído, las células fueron lavadas tres veces centrifugando durante 5min a 3000 rpm y resuspendiendo en PBSi cada vez, verificando la integridad celular en cada ocasión. Una vez completados los lavados, las células en suspensión fueron diluidas hasta obtener entre 5 y 10 células por campo. A cada pozo sensibilizado se agregó una gota de 10µl de células fijadas y diluidas y se dejó a temperatura ambiente hasta su completa evaporación. Los parásitos no adheridos a las láminas fueron eliminados mediante 5 lavados consecutivos con el mismo tampón PBSi (aprox. 20ml) para luego ser bloqueados durante toda la noche con 10µl de una solución de bloqueo que contenía PBSi, 3% Albúmina de Suero Bovino (BSA) y 50mM NH<sub>4</sub>Cl. Pasado el tiempo de bloqueo las láminas se lavaron con tampón PBSi y cada pozo se incubó con 10µl de una solución de permeabilización (PBSi y 0,1% Tritón X-100) durante 20min; dichos pozos fueron lavados para eliminar el detergente y seguidamente se incubaron con los anticuerpos primarios en solución de incubación (PBSi y 3% BSA) durante 1h a 37°C en cámara húmeda.

En primer lugar se incubó con el monoclonal  $\alpha$ -His-tag (Promega) producido en ratón (1/40). Pasado el tiempo de incubación las láminas fueron lavadas con abundante tampón PBSi y se incubó con el anticuerpo primario para la enzima marcadora, el policlonal  $\alpha$ -TcHK producido en conejo, en la misma dilución que el anticuerpo anterior. Después de lavar y empleando la misma solución, se incubó con  $\alpha$ -IgG de ratón acoplado a FITC producido en cabra y  $\alpha$ -IgG de conejo acoplado a Cy3 producido en cabra, ambos a la misma dilución (1/80); la incubación se realizó también en cámara húmeda a 37°C durante 1h. El ADN de las células fijadas fue marcado entonces incubando los pozos durante 30min con 10µl de una solución de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, 1/10 en PBSi) a 37°C en cámara húmeda; seguidamente las láminas fueron lavadas y dejadas en oscuridad. Las imágenes se obtuvieron gracias a la visualización en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 89i y empleando 10µl de PBS con 5% DABCO y 90% Glicerol para preservar la fluorescencia.

#### 5.2.7 Purificación de la HK-(His)<sub>6</sub> por cromatografía de afinidad a metales (His-Link, Promega)

Habiendo verificado la correcta ubicación sub-celular de la HK-(His)<sub>6</sub>, se decidió proceder con el protocolo de purificación. Fueron realizadas dos experiencias correspondientes con un ensayo preliminar de 300ml y un cultivo de 1L de la línea celular de epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP, crecidos en medio LIT suplementado con higromicina (Hyg) y neomicina (G418) (500µg/ml), mantenidos en agitación constante a 27°C e inducidos con 5µg/ml de tetraciclina

durante 96h, añadiendo el antibiótico inductor cada 24h una vez alcanzada la densidad celular adecuada (entre  $5-10 \times 10^6$  células/ml). Ambos cultivos, aunque en momentos diferentes, fueron procesados de la misma manera: completado el tiempo de inducción y habiendo llegado el cultivo a una densidad óptica correspondiente con la fase exponencial ( $D.O._{(600nm)} = 2,354$  (Eppendorf Biophotometer Plus)) se obtuvo la fracción rica en glicosomas mediante una centrifugación diferencial. Para tal fin los parásitos fueron sedimentados por centrifugación a  $17211g$  durante 15min a  $4^\circ C$ , el sobrenadante correspondiente al medio de cultivo fue descartado, las células fueron resuspendidas en 100ml de tampón A (25mM Tris-HCl, pH 7.4; 1M EDTA y 250mM de sacarosa) y sedimentadas nuevamente por centrifugación bajo las mismas condiciones (lavado). El sobrenadante fue descartado nuevamente y el sedimento celular, resuspendido en 20ml de tampón B (10mM HEPES, pH 7.2; 250mM sacarosa; 25mM NaCl; 2mM  $Na_2EDTA$  y 5mM ditiotreitól (DTT)) en presencia de un coctel de inhibidores de proteasas (1/1000) (10 $\mu$ M leupeptina; 50 $\mu$ gml<sup>-1</sup> de inhibidor de tripsina; 1mM benzamidina; 50 $\mu$ M fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF); 100 $\mu$ M tosil-L-lisina clorometil cetona; 0.2 $\mu$ M pepstatina; 1 $\mu$ M E-64; 1 $\mu$ M quemostatina y 1 $\mu$ M bestatina) se mezcló con carburo de silicio en una relación 1:1 (p/p húmedo). El homogenato fue obtenido por abrasión con el carburo de silicio en un mortero de porcelana mantenido en hielo, verificando la ruptura celular mediante observación al microscopio hasta obtener cerca del 90% de células rotas. Para eliminar el exceso de carburo de silicio, la mezcla parcialmente homogenizada fue centrifugada a 500g por 1min a  $4^\circ C$ ; el sedimento fue descartado y el sobrenadante (homogenato) fue sometido a una ronda de centrifugación a 3500g durante 10min a  $4^\circ C$ , cuyo sedimento correspondió a las células enteras, la fracción nuclear y la fracción granular gruesa (Células enteras + FN + FGG). El sobrenadante obtenido fue centrifugado nuevamente a 28710g durante 20min a  $4^\circ C$  y el sobrenadante, correspondiente a la fracción citosólica y microsomal, fue descartado, mientras que el sedimento correspondiente a la fracción rica en glicosomas (FRG) fue almacenado a  $-80^\circ C$  hasta su uso. Pequeños volúmenes de todas las fracciones obtenidas fueron separados para la medición de la actividad HK de la misma forma descrita en apartados anteriores. La latencia de los glicosomas fue determinada como el porcentaje de actividad obtenido a partir de la relación entre la actividad liberada luego de solubilizar la membrana glicosomal con un detergente y la obtenida con los glicosomas sin solubilizar ( $(Actividad\ con\ detergente - Actividad\ sin\ detergente)/Actividad\ con\ detergente \times 100\%$ ).

La mitad del sedimento de glicosomas obtenido fue resuspendida en 8ml de tampón de enalamiento (40mM Tris-HCl, 500mM KCl a pH 7.8) en presencia del coctel de inhibidores de proteasas (1/1000) y 0,1% de Tritón X-100. Esta mezcla fue sometida a un pulso de sonicación de intensidad 7 durante 20s, para luego ser centrifugada durante 15min a 3659g, y el sobrenadante obtenido fue empleado para los ensayos posteriores.

Ya que el fin primordial de este experimento consistió en obtener la enzima en condiciones nativas, la purificación se realizó aprovechando la interacción de la etiqueta de histidinas ubicada en el extremo C-terminal de la enzima recombinante con los iones Ni presentes en una columna His-Link (Promega, USA). Para ello, el sobrenadante correspondiente a la FRG obtenida fue cargado en una columna His-Link equilibrada con el tampón de enlazamiento a pH 7.8. La mezcla de la FRG y la resina fue incubada en agitación durante 2h a temperatura ambiente. Posteriormente se colectó la fracción correspondiente a lo que no tuvo interacción con la columna (Fracción no enlazada) y se lavó la misma con 20 volúmenes de una solución 10mM de imidazol en tampón de enlazamiento a pH 7.8 (L1). Luego se lavó de nuevo con 20 volúmenes de 25mM imidazol en tampón de enlazamiento (L2) y se procedió a la elución con 5 volúmenes de 50mM de imidazol en tampón de enlazamiento al mismo pH.

En cada fracción recogida fue medida la actividad específica HK luego de cuantificar la concentración de proteínas de la misma forma descrita en apartados anteriores. La pureza de la enzima

se evaluó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

#### 5.2.8 Determinación de la $K_M$ y $V_{m\acute{a}x}$ para los anómeros $\alpha$ -Glucosa, $\alpha/\beta$ -Glucosa y uso de otros amino-azúcares como sustratos

Esta determinación permitió conocer la especificidad de sustrato de la HK-(His)<sub>6</sub> purificada y activa, respecto a los anómeros de la D-glucosa ( $\alpha$ -glucosa y  $\alpha/\beta$ -glucosa) y la capacidad de esta enzima de usar como sustrato a otros aminoazúcares como la D-glucosamina (GlcN) y la N-acetilglucosamina (GlcNAc).

Para determinar la especificidad de la HK-(His)<sub>6</sub> respecto a los anómeros  $\alpha$ -D-glucosa y  $\beta$ -D-glucosa, la actividad hexoquinasa fue medida espectrofotométricamente a 340nm empleando el sistema de detección descrito con anterioridad, que usa G6PDH y mide la reducción del NADP<sup>+</sup>. Además de la  $\alpha$ -D-glucosa, se empleó una solución 10mM de  $\alpha$ -D-glucosa que fue calentada durante 10min a 60°C y mantenida en hielo con el propósito de desplazar el equilibrio anomérico hacia la formación del anómero  $\beta$  de la D-glucosa. Partiendo de dicha solución se probaron diferentes concentraciones del sustrato (desde 0,4 hasta 0,01mM), la mezcla de reacción contenía tampón 100mM TEA pH 7.6; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 2.5mM de ATP; 0.64mM NADP<sup>+</sup>; 0.57U de G6PDH (de *Leuconostoc mesenteroides*, Sigma) y 7.3 $\mu$ g de enzima recombinante purificada, correspondientes a 0.025U. Las constantes cinéticas  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  fueron determinadas mediante gráficos de Lineweaver-Burk y diagramas de Hanes-Wolff. La especificidad o preferencia de sustratos se determinó por comparación de los valores obtenidos bajo estas dos condiciones.

Para los otros dos amino-azúcares se probó una concentración inicial desde 1mM hasta 4mM para la N-Acetilglucosamina y de 1mM de D-Glucosamina, a fin de evidenciar la capacidad de la enzima recombinante de utilizarlas como sustratos además de la glucosa. Empleando una concentración fija de HK-(His)<sub>6</sub>, la actividad se registró mediante un sistema de detección de acoplamiento doble con las enzimas piruvato quinasa (PYK) y lactato deshidrogenasa (LDH). En dicho sistema el ADP producto de la reacción de fosforilación catalizada por la hexoquinasa ( $\text{glucosa} + \text{ATP} \rightarrow \text{G6P} + \text{ADP}$ ) es empleado por la PYK para la defosforilación del fosfoenol piruvato (PEP), rindiendo piruvato y ATP ( $\text{PEP} + \text{ADP} \rightarrow \text{Piruvato} + \text{ATP}$ ). El piruvato, a su vez, es transformado a lactato por acción de la LDH en presencia de NADH ( $\text{piruvato} + \text{NADH} \rightarrow \text{lactato} + \text{NAD}^+$ ). Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y la detección espectrofotométrica se realizó a 340nm. La mezcla de reacción fue de 1ml compuesto de 100mM de tampón TEA pH 7.6; 5mM de MgCl<sub>2</sub>; 2.5mM ATP; 0,15mM NADH, 1mM PEP; 0.296U/ml de PYK y 0.372U/ml de LDH como enzimas acoplantes; 7.3 $\mu$ g de enzima recombinante purificada, correspondientes a 0.025U y diferentes concentraciones de sustratos a partir de diluciones de una solución de 10mM. Una vez se determinó la capacidad de fosforilación, la concentración de sustratos se varió entre 1.8mM y 0.1mM buscando obtener las respectivas constantes cinéticas para los mismos de la forma ya descrita para este apartado.

## 6 Resultados

### 6.1 Análisis fenotípico de los epimastigotes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP

En los ensayos previos de caracterización de esta línea celular realizados por Valera en 2014 se determinó que los epimastigotes de *T. cruzi* pTcINDEXHK, inducidos y sin inducir, crecían igual que los de genotipo silvestre, sin embargo, en vista de que esta línea celular no era un clon, fue necesario repetir la evaluación del crecimiento de los parásitos recombinantes (clones) bajo las condiciones de no inducidos e inducidos. Para ello el crecimiento de la línea celular de epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP en medio líquido fue monitoreado hasta alcanzar la fase estacionaria. En un ensayo preliminar o prueba piloto, se estudió el crecimiento de un cultivo para el cual fueron registrados los valores de densidad óptica y densidad celular durante 144h con 72h de inducción, datos que se recogen en la figura 1A y B, en los cuales se observa que los parásitos en este tiempo de crecimiento alcanzaron la fase exponencial y no mostraron diferencias significativas en cuanto al crecimiento entre los cultivos inducidos y sin inducir (Fig. 1A). Sin embargo, cuando el seguimiento de los cultivos se hizo por conteo directo en cámara de Neubauer, en el último tiempo, correspondiente a las 144h de crecimiento o 72h post-inducción, se observó una diferencia en la masa celular alcanzada por el cultivo no inducido que corresponde al doble del registrado para el cultivo inducido.

Se tomaron también fracciones del cultivo en los tiempos post-inducción y en los lisados obtenidos se inmunodetectó por Western Blot la HK silvestre empleando un anticuerpo policlonal  $\alpha$ -TcHK, y la HK recombinante empleando un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -His-tag. En la figura 2 se observa que la HK-(His)<sub>6</sub> se expresa en todos los tiempos post-inducción. No obstante, para determinar si la enzima fue sobre-expresada de forma activa, los homogenatos obtenidos a partir de dicha prueba piloto fueron empleados para cuantificar la actividad HK. La figura 3 muestra los valores de actividad específica registrados, donde puede observarse un incremento de la actividad HK en los dos tiempos medidos (48h y 72h post-inducción). En vista de que el sistema de medición no permitió hacer distinción entre el conjunto de las actividades hexoquinasa nativa (HK nativa), glucoquinasa (GlcK) y hexoquinasa recombinante (HK-(His)<sub>6</sub>), fue necesario restar al valor de actividad obtenido para los parásitos inducidos el valor de actividad “basal” de los parásitos no inducidos, obteniendo entonces el total de la actividad HK sobre-expresada (Fig. 3B). Se observa que a las 144h se obtuvo cerca de 4 veces más actividad que a las 120h de crecimiento (2.4956 U/log#Células.ml<sup>-1</sup> vs 0.6198 U/log#Células.ml<sup>-1</sup>).

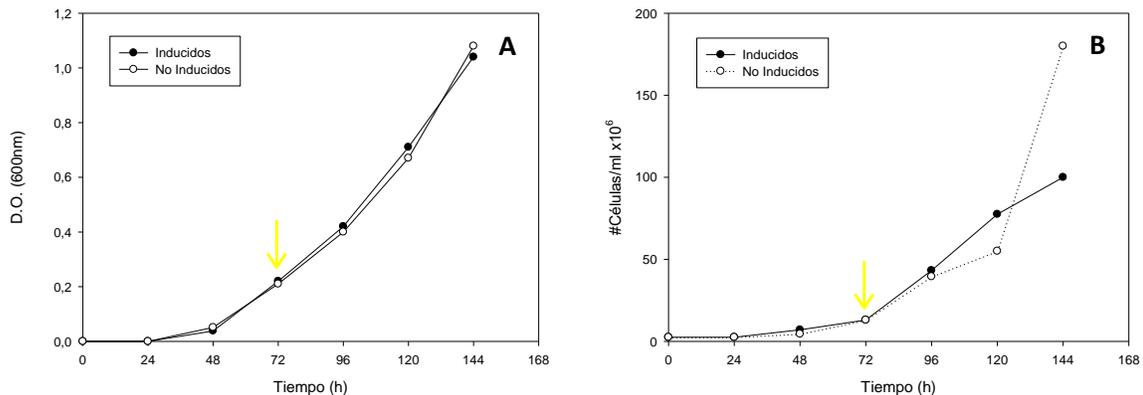


Figura 1. Curva de crecimiento de los epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP de la prueba piloto, inducidos con 5 $\mu$ g/ml de tetraciclina (círculos negros) y no inducidos (círculos blancos), crecidos en medio LIT con 500 $\mu$ g/ml de G418 e Hyg. (A) D.O. (600nm) vs Tiempo y (B) #Células/ml x 10<sup>6</sup> vs Tiempo. La flecha amarilla señala el tiempo cero (0h) de inducción.

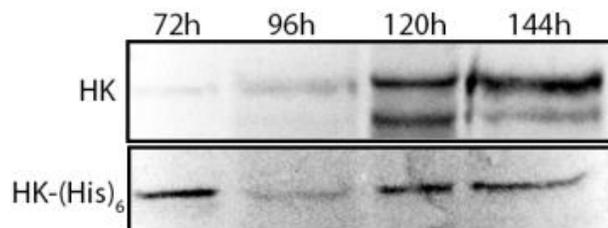


Figura 2. Inmunodetección por Western Blot de la HK nativa y recombinante empleando los anticuerpos  $\alpha$ -TcHK y  $\alpha$ -His-Tag en los homogenatos obtenidos a partir de epimastigotes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP de la prueba piloto, inducidos con 5 $\mu$ /ml de tetraciclina y crecidos en medio LIT durante 144h. Fueron cargados 40 $\mu$ g totales de proteína de todos los tiempos post-inducción.

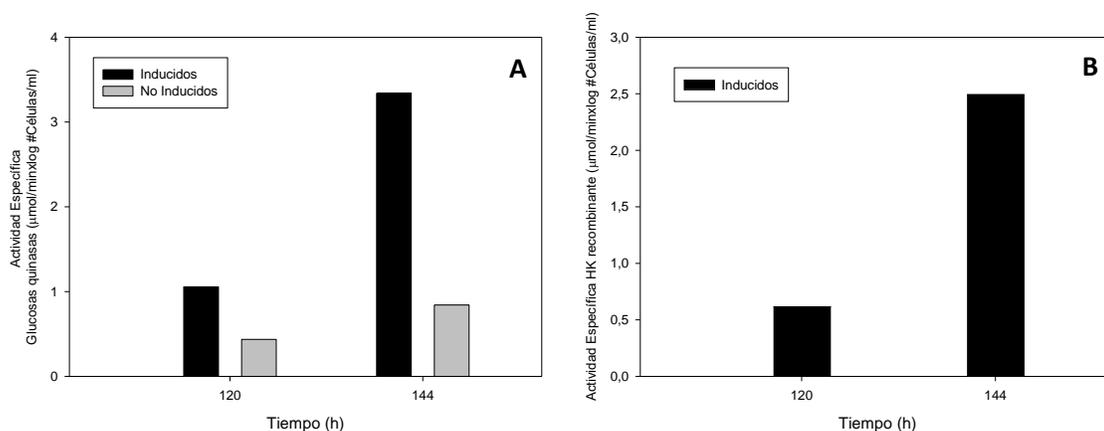


Figura 3. (A) Actividad específica Glucosase quinazas y (B) actividad específica HK-(His)<sub>6</sub> registrada para dos tiempos post-inducción (48h y 72h) del cultivo de epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP de la prueba piloto, no inducidos (barras grises) e inducidos con 5 $\mu$ g/ml de tetraciclina (barras negras).

Buscando corroborar si efectivamente la inducción de la HK afectaba de alguna manera el crecimiento de los parásitos, al menos después de las 144h de crecimiento o 72h de inducción, se realizaron curvas de crecimiento para las cuales se extendió el tiempo de cultivo hasta 192h, y los registros tanto de la absorbancia como del número de parásitos fueron tomados por triplicado. Los resultados obtenidos quedan señalados en la figuras 4A y B, donde puede observarse que los epimastigotes recombinantes crecidos en medio LIT alcanzan la fase estacionaria después de 192h de crecimiento y que no existen diferencias evidentes en relación a la absorbancia (Fig. 4A) o el número de células (Fig. 4B) al comparar el crecimiento de los parásitos no inducidos o inducidos durante 144h. Para evidenciar esto de forma cuantitativa se calcularon las tasas de crecimiento para ambas condiciones respecto al número de parásitos por mililitro de cultivo, obteniendo valores muy similares entre los parásitos inducidos ( $1.93 \times 10^6$  células/ml.h) y no inducidos ( $1.95 \times 10^6$  células/ml.h).

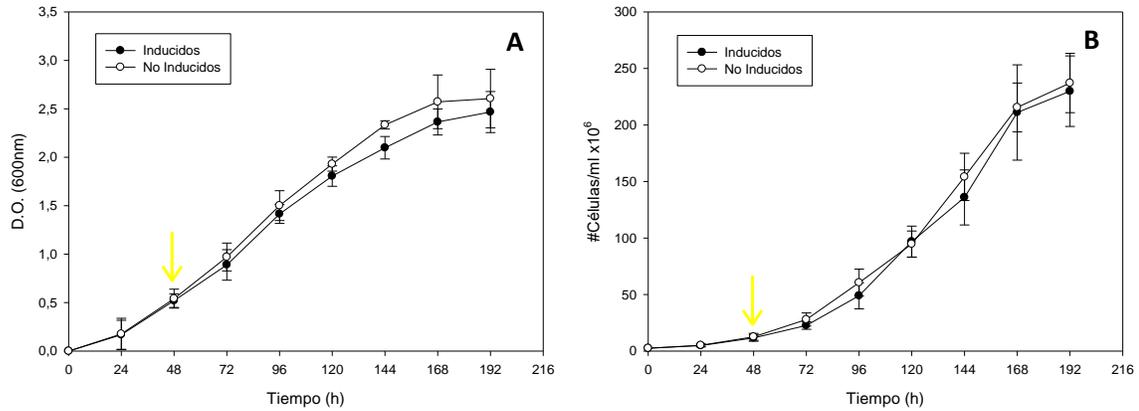


Figura 4. Curva de crecimiento de los epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP, inducidos con 5µg/ml de tetraciclina (círculos negros) y no inducidos (círculos blancos), crecidos en medio LIT con 500µg/ml de G418 e Hyg durante 192h. La flecha amarilla señala el tiempo cero (0h) de inducción. El error estándar se representa sobre cada punto en la gráfica y fue obtenido a partir de tres experimentos independientes. (A) D.O. (600nm) vs Tiempo y (B) #Células/ml x10<sup>6</sup> vs Tiempo.

Puesto que se corroboró que la sobre-expresión de la hexoquinasa no afecta el crecimiento de los parásitos, se procedió a determinar cuantitativamente la expresión de la enzima recombinante y se midió nuevamente la actividad enzimática HK, esta vez a lo largo de toda la curva de crecimiento. Además se midió también la actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y se realizó una detección serológica semicuantitativa por Western Blot, empleando anticuerpos monoclonales contra la etiqueta de histidina en el extremo C-terminal de la proteína recombinante y policlonales contra la hexoquinasa, glucoquinasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de *T. cruzi*, buscando evidenciar si la sobre-expresión de la HK de alguna forma afectaba la expresión de enzimas metabólicamente relacionadas, cuyo sustrato es el producto de la reacción catalizada por la HK (G6PDH) o es compartido por la misma (GlcK).

La cinética de inducción seguida por actividad enzimática, registrada para todos los puntos de las curvas de crecimiento tanto de los parásitos no inducidos como de los inducidos durante 144h, se muestra en la figura 5 como el promedio de dos ensayos independientes. Nuevamente se señalan por separado las actividades glucosas quinasas (Fig. 5A) y la actividad HK recombinante (Fig. 5B). Se observa cerca de 8 veces más actividad alrededor de las 144h de crecimiento, correspondientes con 96h de inducción de la HK-(His)<sub>6</sub>.

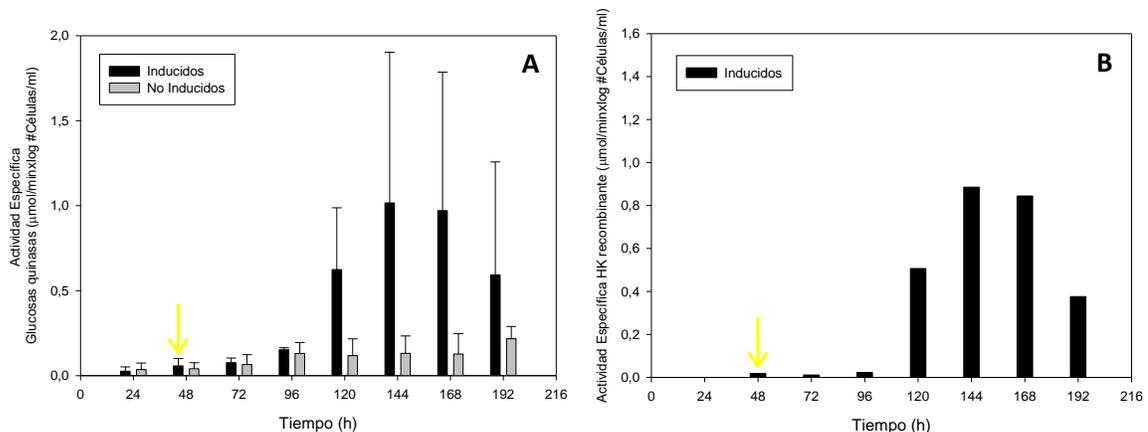


Figura 5. (A) Actividad específica Glucosas quinasas y (B) actividad específica HK-(His)<sub>6</sub> registrada para el cultivo de epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP no inducidos (barras grises) e inducidos con 5µg/ml de tetraciclina (barras negras) crecidos en medio LIT con 500µg/ml de G418 e Hyg durante 192h. El error estándar se

representa sobre cada punto en la gráfica y fue obtenido a partir de dos experimentos independientes. La flecha amarilla indica el momento de la inducción (0h).

Los valores de actividad G6PDH registrados para los homogenatos obtenidos a partir de los puntos de una de las curvas de crecimiento están recogidos en la figura 6. La actividad para el punto correspondiente a las 24h no pudo ser determinada por el limitado volumen de dicha muestra. Puede observarse un aumento aparente de la actividad posterior a las 72h de crecimiento, en especial para los parásitos no inducidos. No obstante, cuando los parásitos inducidos alcanzan la fase estacionaria la expresión de esta enzima parece disminuir, observándose menos de la mitad del valor de los parásitos no inducidos para las 168h de crecimiento.

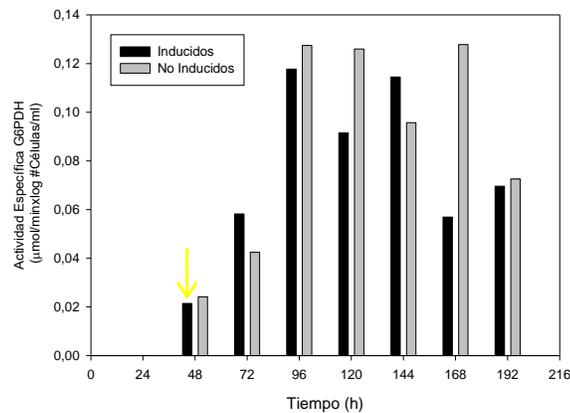


Fig. 6. Actividad específica Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) registrada para el cultivo de epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP no inducidos (barras grises) e inducidos con 5µg/ml de tetraciclina (barras negras) crecidos en medio LIT con 500µg/ml de G418 e Hyg durante 192h. La flecha amarilla indica el momento de la inducción (0h)

En adición a la cuantificación de la expresión por medición de la actividad específica, la presencia de la enzima recombinante fue constatada por inmunodetección en los lisados empleados para la medición de la actividad HK. Los anticuerpos empleados permitieron detectar la HK (nativa y recombinante), GlcK y G6PDH. El peso molecular de las enzimas detectadas pudo estimarse gracias al empleo de marcadores de peso molecular preteñidos que fueron transferidos a las membranas de nitrocelulosa previo a la incubación con los anticuerpos respectivos. En la figura 7 puede observarse un aumento en la señal de la banda señalada como HK a medida que transcurren los tiempos post-inducción. Una vez detectada la HK, dichas membranas fueron bloqueadas e incubadas para la inmunodetección de la GlcK y posteriormente fueron sometidas a un “stripping” para inmunodetectar la G6PDH. Las figuras 8 y 9 muestran los resultados obtenidos donde se observa que la expresión de la GlcK y de la G6PDH permaneció constante, independientemente de la sobre-expresión de la HK recombinante en los parásitos inducidos.

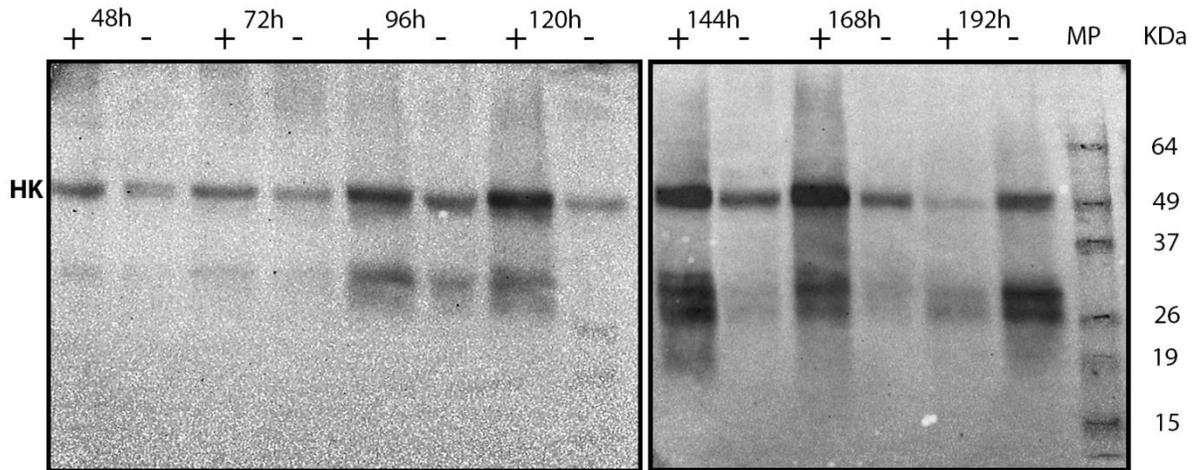


Figura 7. Inmunodetección por Western Blot de la HK nativa y recombinante empleando los anticuerpos  $\alpha$ -TcHK en los homogenatos obtenidos a partir de epimastigotes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP inducidos con 5 $\mu$ /ml de tetraciclina (+) y no inducidos (-) crecidos en medio LIT con 500 $\mu$ g/ml de G418 e Hyg durante 192h. El momento de inducción corresponde a las 48h para los parásitos inducidos. Se cargaron 40 $\mu$ g totales de proteínas por carril.

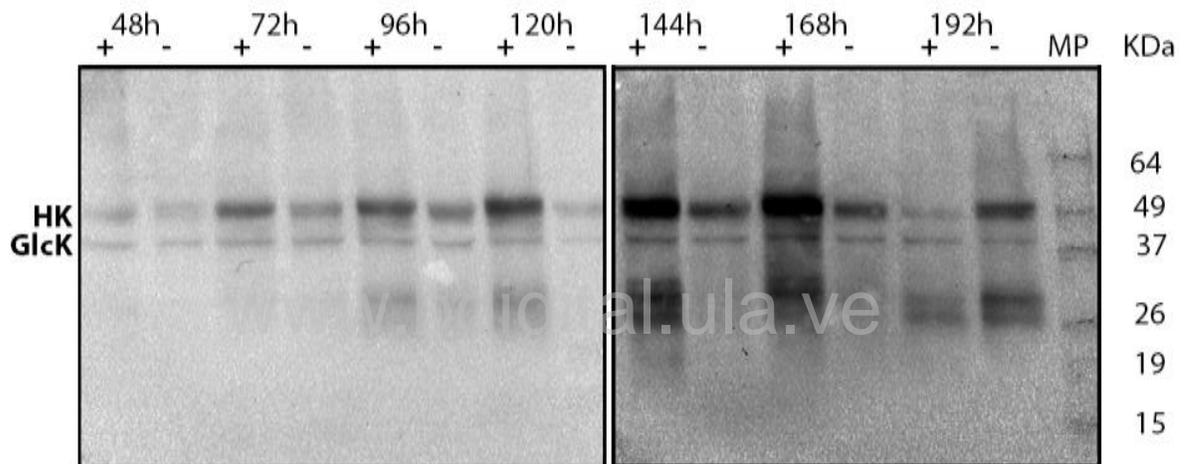


Figura 8. Inmunodetección por Western Blot de la HK nativa, recombinante y de la GlcK, empleando los anticuerpos  $\alpha$ -TcHK y  $\alpha$ -TcGlcK en los homogenatos obtenidos a partir de epimastigotes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP inducidos con 5 $\mu$ /ml de tetraciclina (+) y no inducidos (-) crecidos en medio LIT con 500 $\mu$ g/ml de G418 e Hyg durante 192h. El momento de inducción corresponde a las 48h para los parásitos inducidos. Se cargaron 40 $\mu$ g totales de proteínas por carril.

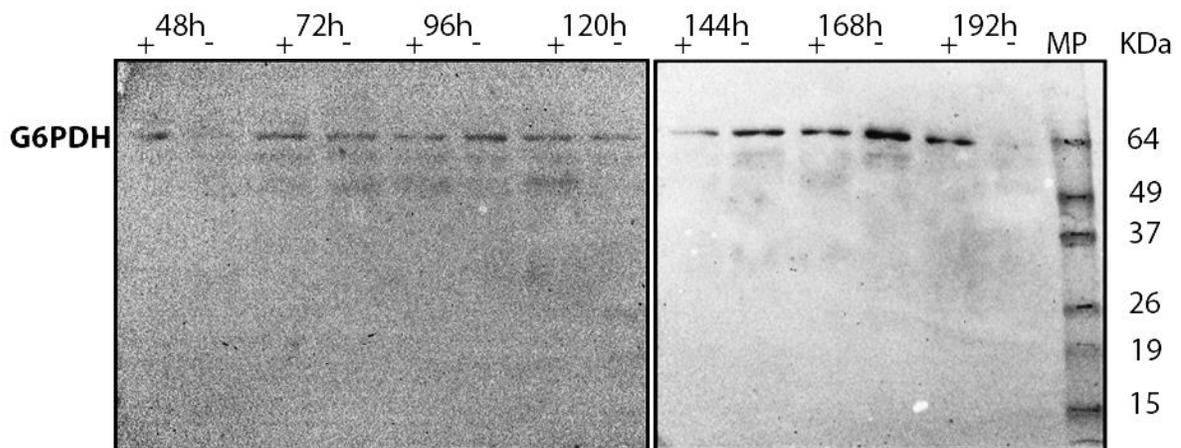


Figura 9. Inmunodetección por Western Blot de la G6PDH y de la HK-(His)<sub>6</sub>, empleando los anticuerpos  $\alpha$ -TcG6PDH y  $\alpha$ -His-tag en los homogenatos obtenidos a partir de epimastigotes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP inducidos con 5 $\mu$ /ml de

tetraciclina (+) y no inducidos (-) crecidos en medio LIT con 500µg/ml de G418 e Hyg durante 192h. El momento de inducción corresponde a las 48h para los parásitos inducidos. Se cargaron 40µg totales de proteínas por carril.

Con el objeto de obtener datos semicuantitativos de los niveles de expresión de la HK-(His)<sub>6</sub> en los parásitos inducidos respecto de los no inducidos, se analizaron las bandas observadas en la figura 8 respecto al número de píxeles por área mediante los programas ImageJ (NIH) e ImageLab (Bio-Rad), ya que la expresión de la GlcK permaneció constante durante el tiempo de crecimiento y sin importar la condición de sobre-expresión. Los datos densitométricos de HK fueron normalizados utilizando GlcK y los resultados obtenidos fueron agrupados en la figura 10. Se observan diferencias en los análisis de densitometría arrojados por ambos programas con referencia al número de píxeles<sup>2</sup> para los tiempos correspondientes a las 120h (Fig. 10A) y 144h (Fig. 10B) de crecimiento. Del mismo modo, los valores obtenidos en dichos análisis fueron comparados con respecto a las dos condiciones estudiadas y la relación entre éstas de acuerdo con los dos programas empleados, se graficó como se observa en la figura 11. De acuerdo con estos resultados, la enzima recombinante es sobre-expresada tres veces más que la enzima nativa en los parásitos no inducidos, según lo observado en la curva del análisis realizado empleando el programa ImageLab. A pesar de los valores obtenidos para la relación de expresión empleando estos programas (cerca de 8 veces la expresión de la HK recombinante a las 144h, medida por actividad enzimática, comparada con las 3 veces obtenidas por el programa ImageLab), existe una correlación casi perfecta entre los análisis cuantitativo y semicuantitativo de la expresión de la HK-(His)<sub>6</sub>.

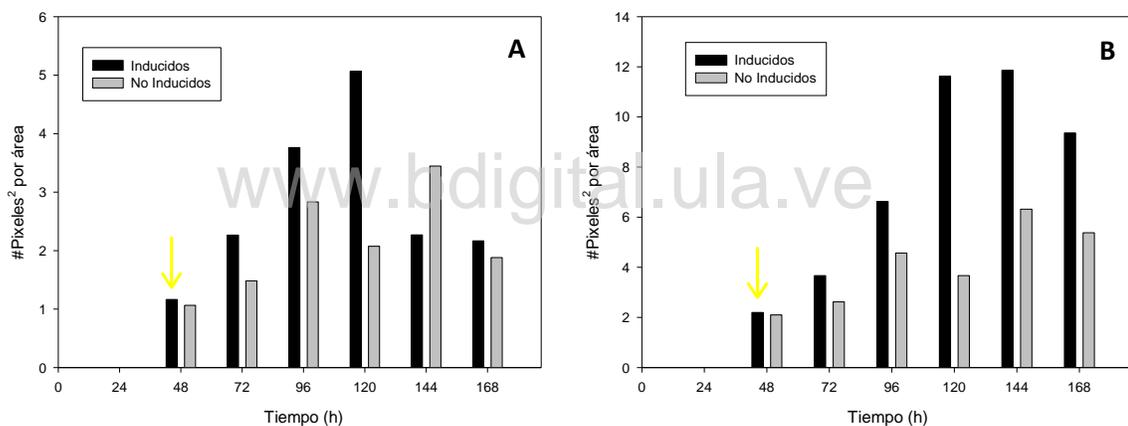


Figura 10. Análisis semicuantitativo de la expresión de HK-(His)<sub>6</sub> en epimastigotes de *T. cruzi* pTcINDXHK cepa EP inducidos con 5µg/ml de tetraciclina y no inducidos crecidos en medio LIT con 500µg/ml de G418 e Hyg durante 192h, en base a las bandas obtenidas por inmunodetección y respecto al número de píxeles<sup>2</sup> utilizando los programas ImageJ (A) e ImageLab (B). Los valores fueron normalizados en relación con la expresión de GlcK. La flecha indica el momento de inducción.

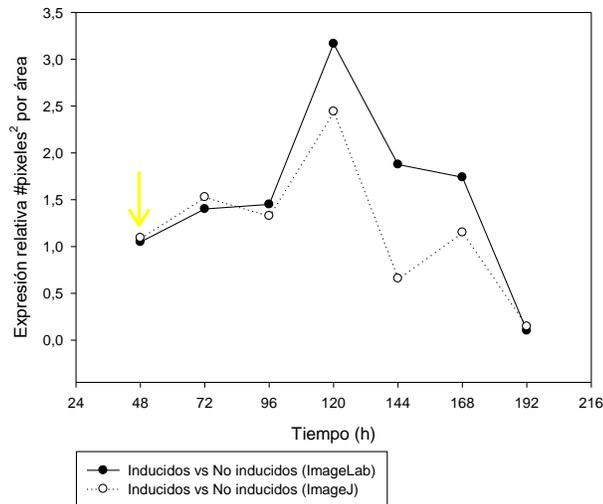


Figura 11. Relación de la expresión de HK-(His)<sub>6</sub> en epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP inducidos con 5µg/ml de tetraciclina respecto a los no inducidos, luego del análisis densitométrico con los programas ImageJ (círculos blancos) e ImageLab (círculos negros). Los valores fueron normalizados con los de la expresión de GlcK. La flecha amarilla indica el momento de la inducción.

### 6.1.1 Efecto de la sobreexpresión de la HK-(His)<sub>6</sub> en el consumo de glucosa y aminoácidos

Posteriormente se evaluó en ambas condiciones de cultivo de la línea celular recombinante el consumo de glucosa y aminoácidos. Las muestras empleadas correspondieron a los sobrenadantes de medios de cultivo separados en cada punto de la curvas de crecimiento para los parásitos inducidos y no inducidos, y los datos fueron normalizados respecto al número de parásitos totales para cada punto. Los resultados muestran una disminución de la concentración de glucosa en el tiempo inversamente proporcional al número de células en cultivo, que además fue relativamente más rápida para los parásitos no inducidos ( $0.011 \pm 0.003 \text{ mM de Glucosa/h}$ ) respecto a los inducidos ( $0.014 \pm 0.002 \text{ mM de Glucosa/h}$ ) (Fig. 12A y B); sin embargo, la glucosa es consumida por completo al mismo tiempo en ambas condiciones. Las tasas de producción de amonio son relativamente equivalentes entre ambas condiciones de crecimiento, siendo la tasa calculada para los parásitos inducidos  $0.017 \pm 0.0035 \text{ mM NH}_4/\text{h}$  y  $0.015 \pm 0.005 \text{ mM NH}_4/\text{h}$  para los no inducidos, y directamente proporcionales al número de células por mililitro de cultivo.

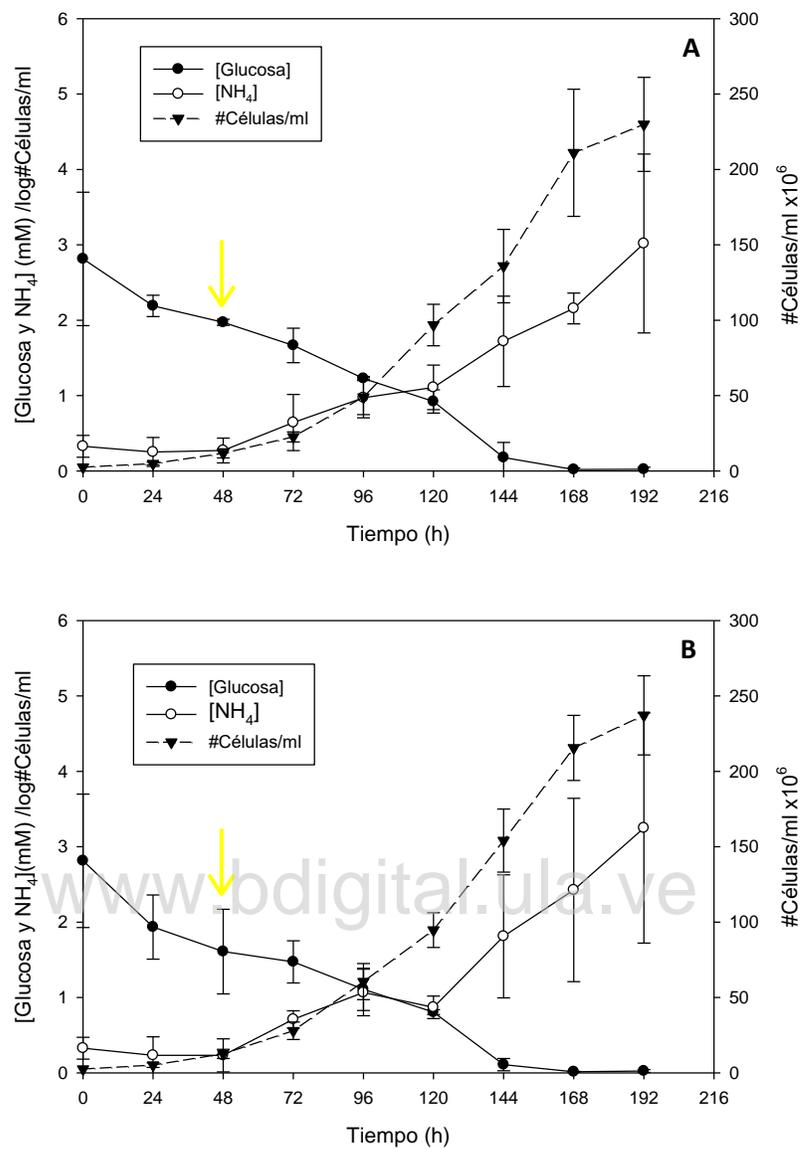


Figura 12. Consumo de Glucosa (círculos blancos), producción de Amonio (círculos negros) y #Células/ml (triángulos negros) de un cultivo de epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP crecidos en medio LIT con 500 $\mu\text{g/ml}$  de G418 e Hyg durante 192h. (A) Parásitos inducidos con 5 $\mu\text{g/ml}$  de tetraciclina y (B) Parásitos no inducidos. El error estándar se representa sobre cada punto en la gráfica y fue obtenido a partir de dos experimentos independientes. La flecha amarilla indica el momento de la inducción (0h).

### 6.1.2 Localización sub-celular de la hexoquinasa recombinante (HK-(His)<sub>6</sub>) por Inmunofluorescencia

Para finalizar con la caracterización fenotípica de la línea celular recombinante de *T. cruzi* pTcINDEXHK, y partiendo del hecho de que la enzima fue sobre-expresada al menos 8 veces más en los parásitos inducidos que en los no inducidos, la siguiente interrogante tuvo que ver con la correcta importación de la misma hacia el interior de la matriz glicosomal. Para ello se llevó a cabo un protocolo de inmunomicroscopía, mediante el cual fue posible aprovechar la etiqueta de expresión de seis histidinas ubicada en el extremo C-terminal de la HK recombinante. La figura 14 recoge los resultados obtenidos luego de incubar parásitos recombinantes fijados con formaldehído y permeabilizados con Tritón X-100, inducidos durante 120h (168h de crecimiento), con los anticuerpos TcHK y  $\alpha$ -His-tag, para marcar las proteínas nativa y recombinante respectivamente. Dicha incubación

se realizó también a epimastigotes recombinantes no inducidos y epimastigotes de genotipo silvestre (WT) crecidos durante el mismo período de tiempo y bajo las mismas condiciones. El revelado se logró incubando con el anticuerpo secundario acoplado a Cy3 que marcó la enzima HK nativa en color rojo, y el secundario acoplado a FITC que marcó la enzima recombinante en color verde. Una vez realizada la fusión entre las imágenes puede notarse que el patrón punteado de la enzima recombinante coincide con el de la enzima marcadora, la HK nativa, por lo que se puede decir que la enzima co-localiza en el glicosoma de los parásitos recombinantes. Se observa también la carencia de señal HK-(His)<sub>6</sub> en los parásitos no inducidos y los de genotipo silvestre, ambos incubados también con el anticuerpo  $\alpha$ -His-tag.

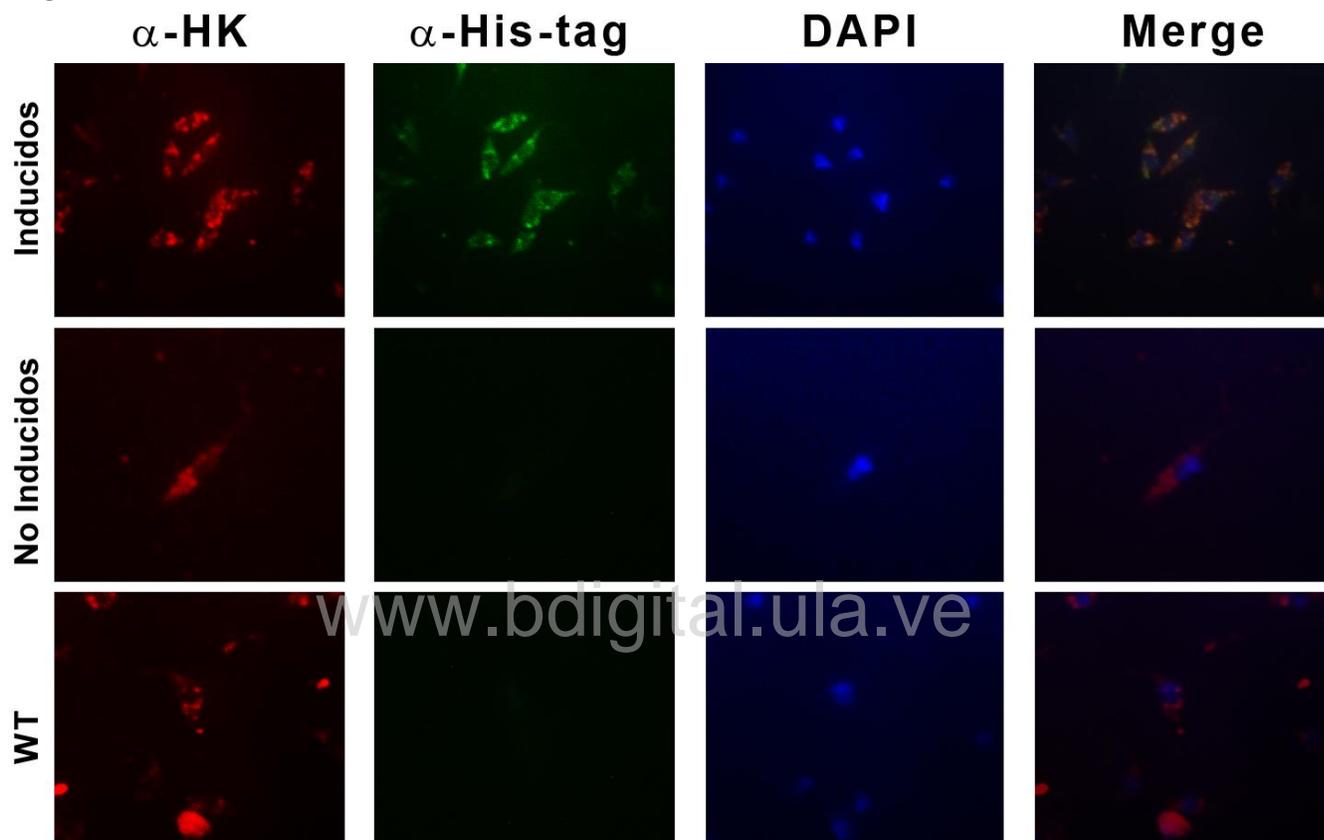


Figura 13. Localización sub-celular de la HK-(His)<sub>6</sub> en epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP fijados con formaldehído y permeabilizados con Tritón X-100, no inducidos e inducidos con 5 $\mu$ g/ml de tetraciclina después de 120h de inducción o 168h de crecimiento en medio LIT con 500 $\mu$ g/ml de G418 e Hyg. Los epimastigotes de *T. cruzi* cepa EP (WT) se emplearon como control y fueron crecidos en las mismas condiciones.

## 6.2 Caracterización cinética de la enzima recombinante HK-(His)<sub>6</sub>

Con la intención de conseguir altas cantidades de la enzima recombinante activa y pura se realizó la centrifugación diferencial de un homogenato obtenido a partir de un cultivo de parásitos inducidos durante 96h (144h de crecimiento). Buscando estandarizar las condiciones tanto de la centrifugación como de la purificación, se realizó un experimento preliminar empleando 300ml de cultivo y en base a éste se tomó la decisión de obtener una fracción rica en glicosomas (FRG) a partir de un volumen mayor, correspondiente a 1L de parásitos recombinantes. La fracción rica en glicosomas obtenida a partir de ambas centrifugaciones diferenciales fue solubilizada e incubada con una resina His-Link, cuyos iones níquel (Ni) fueron capaces de interactuar con las histidinas en la etiqueta de expresión ubicada en el extremo C-terminal de la enzima recombinante en cuestión. En cada paso de elución de la columna, la aparición de la HK-(His)<sub>6</sub> fue seguida por medición de su actividad específica.

La FRG obtenida a partir de los parásitos recombinantes crecidos para el estudio preliminar (300ml de cultivo) fue procesada con la finalidad de determinar la concentración de imidazol a la cual podía obtenerse la mayor cantidad de enzima pura, empleado para ello un gradiente de elución que varió desde 75mM hasta 600mM del compuesto. La tabla 1 reúne los resultados de esta purificación y agrupa los datos relacionados con este gradiente de elución; no obstante no incluye los valores referenciales de actividad para el homogenato de parásitos, ni la respectiva concentración de proteínas, ya que éstos no pudieron ser determinados durante el desarrollo experimental.

Tabla 1. Ensayo preliminar de purificación de la HK-(His)<sub>6</sub> por cromatografía de afinidad a metales a partir de la fracción rica en glicosomas (FRG) de epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP crecidos durante 144h en medio LIT con 500µg/ml de G418 e Hyg e inducidos durante 96h con 5µg/ml de tetraciclina.

Fracción	Volumen (ml)	Actividad Total (U)*	Proteínas totales (mg)	% Recuperación	Actividad específica (U/mg)	Factor de Purificación
Fracción Rica en Glicosomas (FRG)	6	150	**	100	**	-
Fracción No Enlazada (FNE)	6	9,8	15,6	6,5	0,63	-
Lavado 1 (10mM imidazol)	12	16,9	0,3	11,3	52,2	82,9
Lavado 2 (50mM imidazol)	10	62	1,0	41,3	62,6	99,7
Eluído 1 (75mM imidazol)	5	2,3	0,2	1,5	11,7	18,6
Eluído 2 (100mM imidazol)	5	0,8	0,3	0,6	2,9	4,6
Eluído 3 (200mM imidazol)	5	0,4	0,02	0,2	16,4	26
Eluído 4 (400mM imidazol)	5	0,3	0,04	0,2	7,8	12,5
Eluído 5 (600mM imidazol)	5	0	0	0	0	0

\* Una unidad se define como 1µmol de NADP<sup>+</sup> reducido por minuto a 25°C.

\*\* No Determinado

Es de notar, observando los valores representados en la tabla 1, que el mayor número de unidades totales de enzima fue obtenido en los volúmenes del lavado con 50mM de imidazol a pH 7.8, que corresponde a poco más de 40% de recuperación de la enzima recombinante. Dichos resultados concuerdan con lo que puede apreciarse en la figura 15, que representa el gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie en el cual fueron cargados cada uno de los volúmenes recogidos durante la elución de la HK-(His)<sub>6</sub> en el experimento preliminar. En esta figura el carril representado como el lavado con 50mM contiene una banda relativamente pura, mientras que sólo pueden apreciarse bandas difusas y muy tenues entre los 75mM y 100mM de imidazol.

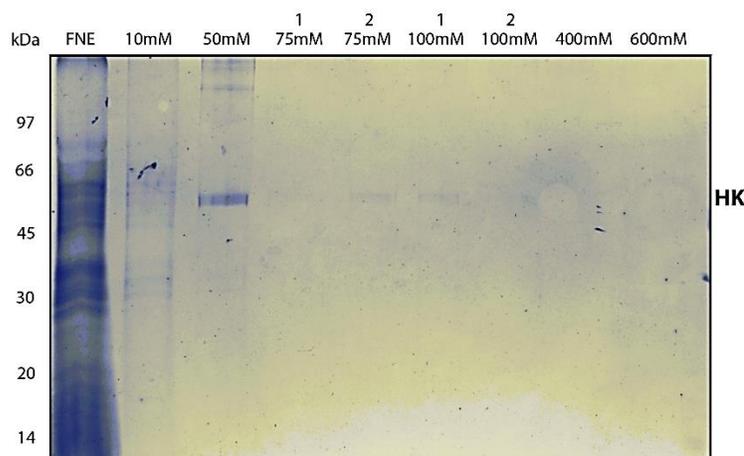


Figura 14. Purificación de la HK-(His)<sub>6</sub> por cromatografía de afinidad a metales a partir de la fracción rica en glicosomas (FRG) de epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP crecidos durante 144h en medio LIT con 500µg/ml de G418 e Hyg e inducidos durante 96h con 5µg/ml de tetraciclina (ensayo preliminar). Fracción no enlazada (FNE) y concentraciones crecientes de Imidazol. Fueron cargados 15µl de cada fracción colectada. Los números 1 y 2 corresponden a los volúmenes colectados escogidos para cargar en el gel. Gel al 12% de acrilamida, teñido con azul de Coomassie.

Habiendo estandarizado *grosso modo* la purificación de la HK-(His)<sub>6</sub>, se convino en emplear un mayor volumen de parásitos con el fin de obtener la suficiente cantidad de proteína que permitiese realizar los estudios cinéticos pertinentes. Dicho cultivo fue tratado de la misma forma que como en la experiencia previa, y la mitad de la FGR obtenida fue homogenizada para la purificación. La latencia para la hexoquinasa conseguida en este trabajo fue de 73%.

En relación con el procedimiento de purificación se modificaron los pasos de elución de la enzima de forma que pudiese obtenerse concentrada en un menor volumen y con mayor grado de pureza. Para ello se realizaron dos lavados previos con 20 volúmenes de 10mM y 25mM de imidazol y se buscó eluir la enzima con 5 volúmenes de una solución 50mM de imidazol. Al igual que durante la experiencia anterior, la aparición de la HK-(His)<sub>6</sub> fue seguida por registro de la actividad enzimática y cada fracción obtenida durante el proceso fue mezclada con tampón de carga y separada por electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. La tabla 2 y la figura 16 muestran los resultados obtenidos durante esta segunda purificación.

Tabla 2. Purificación de la HK-(His)<sub>6</sub> por cromatografía de afinidad a metales a partir de la fracción rica en glicosomas (FRG) de epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP crecidos durante 144h en medio LIT con 500µg/ml de G418 e Hyg e inducidos durante 96h con 5µg/ml de tetraciclina.

Fracción	Volumen (ml)	Actividad Total (U)*	Proteínas totales (mg)	% Recuperación	Actividad específica (U/mg)	Factor de Purificación
Homogenato	20	154,3	510,0	100,0	0,3	*
Fracción Rica en Glicosomas (FRG)	8	164,0	167,2	100,0	1,0	3,3
Fracción No Enlazada (FNE)	8	27,0	133,6	17,5	0,2	0,7
Lavado 1 (10mM Imidazol)	20	23,3	4,6	15,1	5,1	16,9
Lavado 2 (25mM Imidazol)	20	41,7	19,2	27,0	2,2	7,2
Eluído 1 (50mM Imidazol)	5	11,6	3,7	7,5	3,2	10,4

\* Una unidad se define como 1µmol de NADP<sup>+</sup> reducido por minuto a 25°C.

Puede apreciarse que según los valores de actividad registrados en la tabla 2, poco más de 100 unidades de enzima fueron recuperadas a partir de la columna de purificación His-Link, obteniéndose la mayor cantidad de proteína eluída durante el segundo lavado con 25mM de imidazol (41.7 U<sub>T</sub>), correspondiente a un 27% de recuperación, con un rendimiento de purificación de 19.2mg de HK a partir de 510mg de proteínas totales del homogenato. Sin embargo se obtuvo importante número de unidades de enzima tanto en la fracción no enlazada como en ambos lavados. Por otra parte, los mayores valores de actividad específica fueron obtenidos para la fracción medida del primer lavado (10mM Imidazol), señalando que en el mismo se obtuvo la enzima unas 17 veces más pura, valor seguido por el eluído con 50mM, con un factor de purificación de 10.

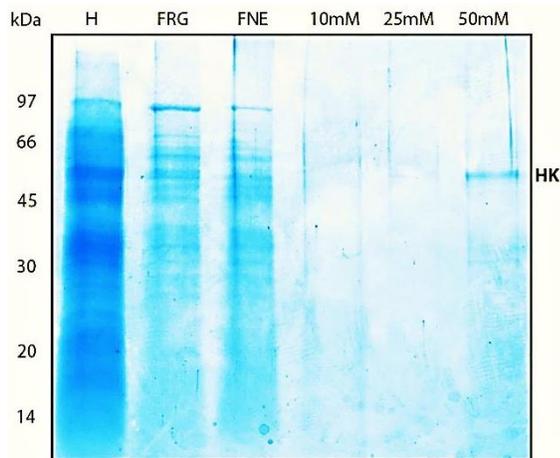


Figura 16. Purificación de la HK-(His)<sub>6</sub> por cromatografía de afinidad a metales a partir de la fracción rica en glicosomas (FRG) de epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP crecidos durante 144h en medio LIT con 500µg/ml de G418 e Hyg e inducidos durante 96h con 5µg/ml de tetraciclina. Homogenato (H); fracción rica en glicosomas (FRG); fracción no enlazada (FNE); lavado con 10mM Imidazol (Lavado 1); lavado con 25mM Imidazol (Lavado 2) y elución con 50mM de Imidazol (Eluído 1). Fueron cargados 15µl de cada fracción colectada. Gel al 12% de acrilamida, teñido con azul de Coomassie.

En el gel de poliacrilamida presentado en la figura 16 fueron cargados volúmenes de todas las fracciones colectadas durante los pasos de purificación, concretamente el homogenato, la fracción rica en glicosomas, la fracción no enlazada, los lavados con 10mM y 25mM y la fracción eluída con 50mM de imidazol luego de haberla concentrado por centrifugación en un cono de concentración. Puede observarse, alrededor de los 50kDa, la aparición de una banda pura en el carril del eluído con 50mM de imidazol, banda que también puede apreciarse en los carriles del homogenato y la FRG.

### 6.2.1 Determinación de las constantes $K_M$ y $V_{máx}$ para los anómeros D- $\alpha$ -glucosa y D- $\alpha/\beta$ -glucosa

Una vez se comprobó la purificación de una enzima recombinante activa, se inició la tarea de caracterizarla en términos cinéticos con el fin de comparar sus constantes con datos ya reportados de la enzima natural; para ello se realizaron mediciones con diferentes concentraciones de glucosa, buscando determinar las constantes  $K_M$  y  $V_{máx}$  de la enzima recombinante en relación con este sustrato.

Inicialmente fue necesario estandarizar una concentración o número de unidades de enzima purificada por cubeta para luego comenzar a realizar mediciones espectrofotométricas variando la concentración de glucosa desde 0.4 hasta 0.01mM. Como se describió anteriormente, el sistema empleado para la medición de esta reacción consistió en el acoplamiento con la G6PDH, midiendo la reducción del NADP<sup>+</sup> a 340nm a lo largo de 600s de reacción. Los datos obtenidos fueron graficados en una curva de concentración de glucosa versus velocidad registrada como micro moles (µmoles) de

sustrato consumido por minuto en relación con la concentración proteínas (U/mg). La siguiente figura (Fig. 17) presenta el gráfico de la curva en conjunto con los dos métodos de regraficación empleados para la determinación de las constantes cinéticas para el anómero  $\alpha$  de la D-Glucosa (Fig. 17B y C). Puede observarse en la figura 17A que la enzima posee un comportamiento Michaeliano, describiendo una hipérbola rectangular al graficar la velocidad contra la concentración del sustrato. En las figuras 17B y C se enseñan los métodos de regraficación utilizados para hallar el valor de los parámetros cinéticos, obteniendo una  $K_M$  de  $33\mu\text{M}$  con el diagrama de Hanes-Wolff y de  $42.5\mu\text{M}$  con el diagrama de Lineweaver-Burk, hallando a su vez un valor de velocidad  $V_{m\acute{a}x}$  de  $0.807\text{U/mg}$  y  $0.871\text{U/mg}$  según cada diagrama, respectivamente.

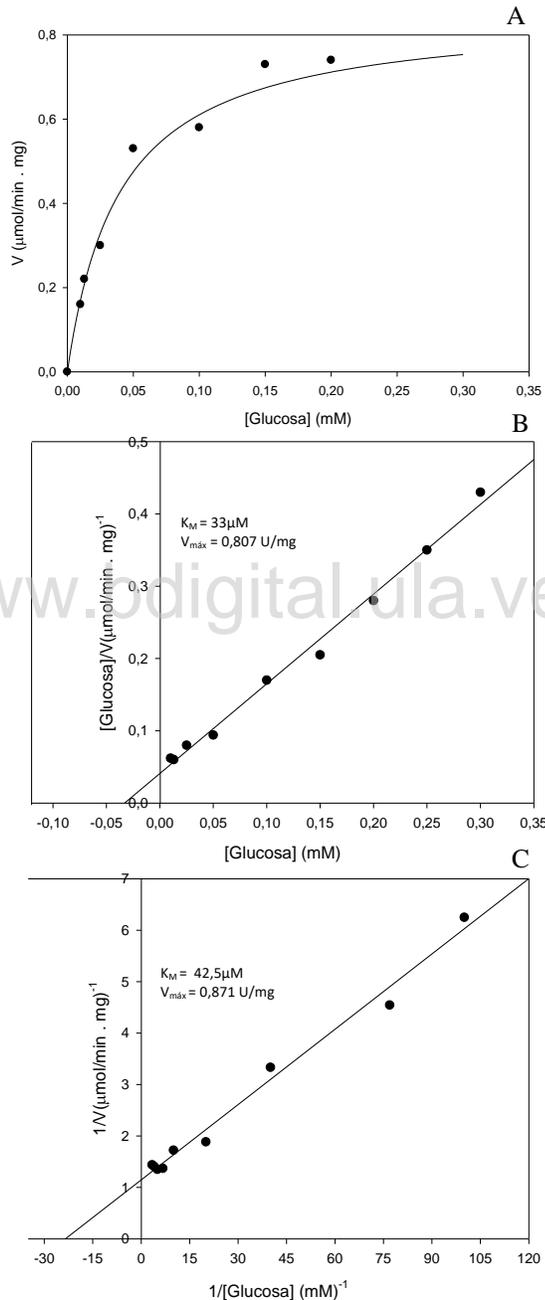
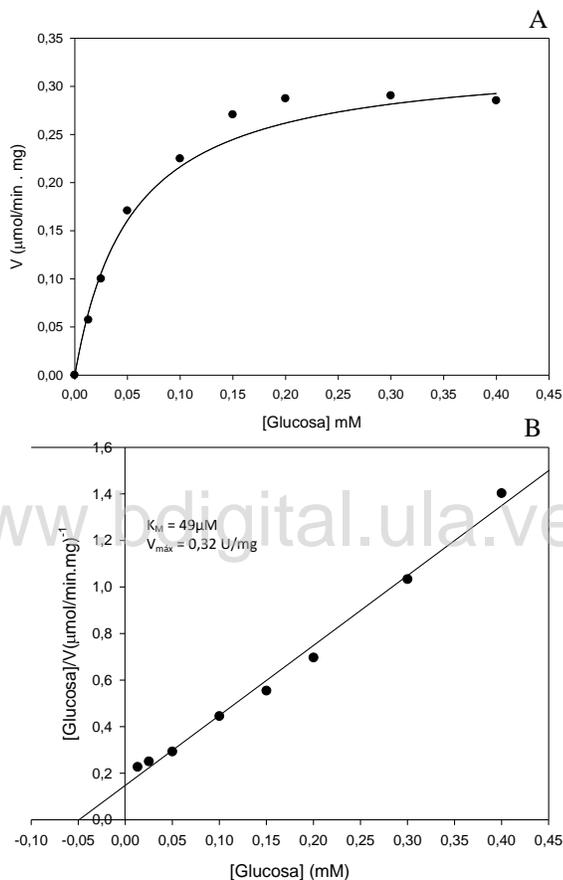


Figura 17. (A) Gráfico de Michaelis-Menten: velocidad ( $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ ) de la HK-(His)<sub>6</sub> purificada, en relación con la concentración de D- $\alpha$ -Glucosa (mM). (B) Diagrama de Hanes-Wolff (regraficación) para la obtención de las constantes cinéticas  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  en relación a la cinética para el anómero  $\alpha$  de la D-Glucosa. (C) Diagrama de Lineweaver-Burk (regraficación) para la obtención de las constantes cinéticas  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  en relación a la cinética para el anómero  $\alpha$  de la D-Glucosa.

Seguidamente, utilizando las mismas condiciones de medición, quiso estudiarse la “preferencia” de la enzima por la glucosa en relación a sus anómeros (D- $\alpha$  y D- $\beta$ ), para lo cual se sometió una solución de D- $\alpha$ -Glucosa a calentamiento durante 10min a 60°C y luego se mantuvo en hielo con la finalidad de desplazar el equilibrio anomérico hacia la formación de D- $\beta$ -Glucosa, obteniendo así una mezcla de  $\alpha$  (33%) y  $\beta$  (66%) glucosa, preponderando el anómero  $\beta$ . La figura 18 agrupa los resultados obtenidos para esta cinética al emplear 9 concentraciones desde 0.01 hasta 0.4mM de dicha mezcla. En la figura 18A puede apreciarse un comportamiento Michaeliano para la enzima al graficar la velocidad de la misma vs. concentración de los anómeros, y de las figuras 18B y C se desprenden los resultados conseguidos para las constantes, habiendo obtenido un valor de  $K_M$  para la mezcla de anómeros de 49 $\mu$ M y 74.33 $\mu$ M, con una  $V_{m\acute{a}x}$  de 0.32U/mg y 0.39U/mg según los diagramas de Hanes-Wolff y Lineweaver-Burk, respectivamente.



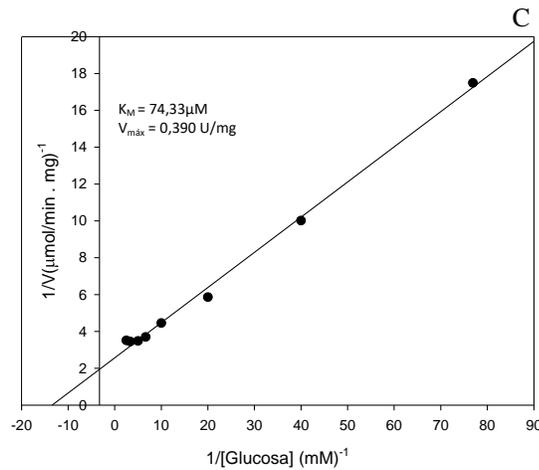


Figura 18. (A) Gráfico de Michaelis-Menten: velocidad ( $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ ) de la HK-(His)<sub>6</sub> purificada, en relación con la concentración de D- $\alpha/\beta$ -Glucosa (mM). (B) Diagrama de Hanes-Wolff (regraficación) para la obtención de las constantes cinéticas  $K_M$  y  $V_{máx}$  en relación a la cinética para la mezcla anomérica de  $\alpha/\beta$  de la D-Glucosa. (C) Diagrama de Lineweaver-Burk (regraficación) para la obtención de las constantes cinéticas  $K_M$  y  $V_{máx}$  en relación a la cinética para la mezcla anomérica de  $\alpha/\beta$  de la D-Glucosa.

Según estos resultados, de acuerdo con el diagrama de Hanes-Wolff realizado en base a los datos obtenidos a partir de las cinéticas para los anómeros de la glucosa, el valor de la constante Michaeliana  $K_M$  para la mezcla de anómeros de glucosa fue alrededor de 1.5 veces superior al obtenido para la D- $\alpha$ -Glucosa, mientras que la velocidad máxima para el anómero  $\alpha$  fue 2.5 veces superior a la del anómero  $\beta$  (valores muy similares a los conseguidos al comparar las constantes obtenidas por el método de Lineweaver-Burk).

### 6.2.2 Determinación de la capacidad de uso de amino-azúcares como sustrato

El siguiente estudio realizado permitió determinar la capacidad de la HK recombinante purificada para fosforilar otro tipo de azúcares, concretamente la hexosaminas N-Acetilglucosamina y D-Glucosamina. Inicialmente se midió actividad HK con altas concentraciones de ambos azúcares, teniendo como resultado que esta enzima es capaz de fosforilar D-Glucosamina pero incapaz de fosforilar N-Acetilglucosamina, habiendo probado 1mM, 2mM y 4mM de este último compuesto.

Así pues, se estudió el comportamiento cinético de la enzima en relación con la D-Glucosamina; para ello se probaron 8 concentraciones del amino-azúcar, variando desde 1.8mM hasta 0.1mM. En la figura 19 se aprecian los resultados obtenidos para esta cinética, donde puede observarse un comportamiento Michaeliano (Fig. 19A), evidente como una hipérbola rectangular. Así mismo según los métodos de regraficación utilizados, Hanes-Wolff (Fig. 19B) y Lineweaver-Burk (Fig. 19C), el valor de las constantes relacionado con este sustrato correspondió a una  $K_M$  de 863 $\mu\text{M}$  y 500 $\mu\text{M}$ , con una  $V_{máx}$  de 1.27U/mg y 0.938U/mg, respectivamente. Comparando el valor de la constante de afinidad encontrado para el anómero D- $\alpha$ -glucosa con el de la D-Glucosamina, según las constantes obtenidas con el método de Hanes-Wolff, la hexoquinasa recombinante de *T. cruzi* posee una  $K_M$  26.15 veces más alta para la D-Glucosamina que para la D- $\alpha$ -Glucosa. La velocidad máxima de esta enzima para la D-Glucosamina fue 1.6 veces mayor, haciendo la comparación entre este parámetro para ambos sustratos.

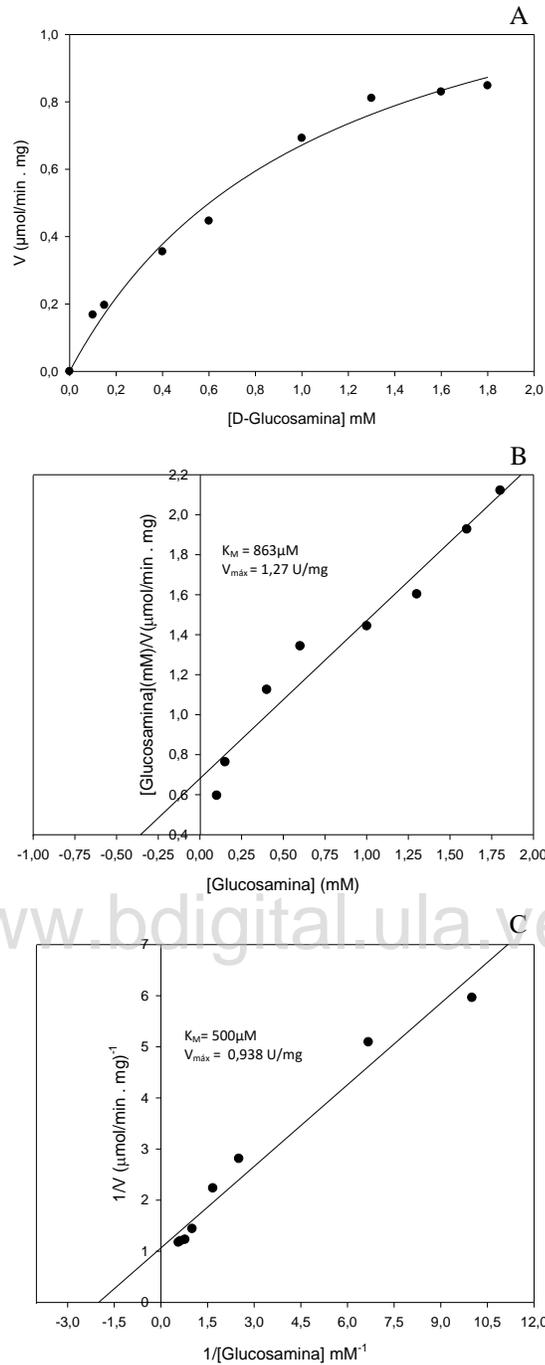


Figura 19. (A) Gráfico de Michaelis-Menten: velocidad ( $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ ) de la HK-(His)<sub>6</sub> purificada, en relación con la concentración de D-Glucosamina (mM). (B) Diagrama de Hanes-Wolff (regraficación) para la obtención de las constantes cinéticas  $K_M$  y  $V_{m\acute{\text{a}}\text{x}}$  en relación a la cinética para la D-Glucosamina. (C) Diagrama de Lineweaver-Burk (regraficación) para la obtención de las constantes cinéticas  $K_M$  y  $V_{m\acute{\text{a}}\text{x}}$  en relación a la cinética para la D-Glucosamina.

## 7 Discusión

*Trypanosoma cruzi* posee un ciclo de vida digenético con cuatro estadios morfológicos: los tripomastigotes sanguíneos y amastigotes intracelulares en el mamífero, y las formas tripomastigotas metacíclicas y los epimastigotes en el insecto (Brenner, 1973; Tyler & Engman, 2001; De Souza, 2002). Por lo tanto durante su ciclo de vida el parásito consigue ambientes drásticamente distintos, a los cuales se adapta a través de la diferenciación celular y cambios en su metabolismo. Cuando se multiplica en el insecto vector, donde los metabolitos preponderantes en su hemolinfa son aminoácidos como la L-prolina, los epimastigotes utilizan mayoritariamente aminoácidos, aunque en cultivos axénicos éstos consumen preferencialmente glucosa y sólo cuando ésta se agota en el medio de cultivo, los parásitos cambian su metabolismo al consumo de aminoácidos, como paso previo a su diferenciación a tripomastigotes metacíclicos. De manera similar los otros estadios del ciclo de vida, no sólo de *T. cruzi*, sino de otros tripanosomátidos relacionados, utilizan la glucosa como fuente principal de carbono y energía (Bringaud *et al.*, 2006).

De modo que la glicólisis, ruta catabólica encargada de la oxidación de la glucosa, juega un papel muy importante en el metabolismo energético de *T. cruzi*, ya que no sólo representa una vía productora de ATP sino también de precursores que sirven otras rutas biosintéticas, como la vía de las pentosas fosfato, que además contribuye a la formación de NADPH (Maugeri & Cazzulo, 2004). El primer paso de la ruta glicolítica es catalizado por la hexoquinasa (*TcHK*), esta enzima fosforila la glucosa a expensas de ATP como molécula donadora del grupo fosforilo. Estudios previos se han centrado en la caracterización bioquímica y molecular de la *TcHK*; entre los primeros reportes de sus constantes cinéticas están los publicados por Racagni y Machado en 1983, quienes a partir de la fracción granular fina obtenida por centrifugación diferencial de epimastigotes de *T. cruzi*, realizaron las mediciones cinéticas de la enzima en relación con una amplia gama de sustratos. Un año después, en 1984, Urbina y Crespo se dieron a la tarea de estudiar el comportamiento cinético de la *TcHK* parcialmente purificada a partir de una fracción enriquecida de glicosomas, determinando algunos parámetros cinéticos y reportando que su actividad no es regulada por su producto, la glucosa 6-fosfato, ni por la D-fructosa 6-fosfato, D-fructosa 1,6-difosfato, D-glucosa 1,6-difosfato, fosfoenol piruvato, L-malato o citrato. Más adelante, Adroher y colaboradores en 1990, también estudiaron las propiedades cinéticas de la *TcHK* pero a partir de extractos celulares de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos, describiendo también parte del comportamiento metabólico del parásito durante el crecimiento en medio de cultivo. Posteriormente, Cáceres y colaboradores en 2003 reportaron el clonaje, la secuenciación y expresión del gen *TcHK* en un sistema heterólogo en *E. coli*, a partir del cual la enzima recombinante fue purificada, aunque con bajo rendimiento. Adicionalmente purificaron a homogeneidad la enzima natural a partir de epimastigotes de *T. cruzi* y compararon sus propiedades cinéticas con las determinadas para la enzima recombinante. Sin embargo, este sistema de expresión resultó ser muy ineficiente para la obtención de cantidades de enzima activa que permitieran hacer estudios más exhaustivos, como ensayos de inhibición con librerías de drogas, identificación de otras moléculas que pudieran regular su actividad y su interacción con otras quinasas presentes en el glicosoma como la glucoquinasa (*GlcK*) (Cáceres *et al.*, 2003).

Este trabajo se enfocó específicamente en la sobre-expresión de la enzima en epimastigotes de la cepa EP de *T. cruzi*. Para ello se empleó la línea celular pTcINDEXHK, desarrollada por Valera en el año 2014, que porta un cassette de expresión (pTcINDEX) que incluye la secuencia del gen *TcHK* (fusionado a una etiqueta de histidinas en el extremo 3') en un sitio de expresión inducible bajo el control de promotor de T7, regulado por el operador de tetraciclina. Esta línea celular también expresa constitutivamente la ARN polimerasa del bacteriófago T7 y el represor de la tetraciclina a partir del episoma pLEW (Taylor & Kelly, 2006; Taylor *et al.*, 2011; Ramírez, 2016; Valera, 2014).

La mencionada aproximación experimental nos permitió sobre-expresar la HK-(His)<sub>6</sub> a partir del cultivo de los epimastigotes recombinantes en una relación de hasta 8 veces respecto a la enzima natural, y además purificarla fácilmente de una fracción enriquecida de glicosomas a través de una columna de afinidad a metales por elución con imidazol. A continuación se presenta la discusión de los resultados obtenidos en base a la caracterización fenotípica de los parásitos y a la caracterización bioquímica de la enzima recombinante obtenida a partir de éstos.

### 7.1 Análisis fenotípico de los epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP

Los primeros experimentos contemplados en este proyecto correspondieron a ensayos preliminares cuyo objetivo era el reconocimiento de algunas de las características de los parásitos en cultivo. El hallazgo inicial fue que la sobre-expresión de la enzima no parecía ser deletérea para las células y que éstas, después de 144h de crecimiento, aún no alcanzaban la fase estacionaria y lograban expresar hasta 4 veces más actividad HK, que de acuerdo con la inmunodetección por Western Blot, correspondía con actividad recombinante (HK-(His)<sub>6</sub>) (ver Fig. 2 y 3).

Posteriormente, tres ensayos independientes demostraron fehacientemente que las tasas de crecimiento, además de las de consumo de glucosa y aminoácidos, no se ven alteradas durante el crecimiento de los parásitos, aún al sobre-expresar cerca de 8 veces más la enzima recombinante. Es interesante percatarse de que el comportamiento metabólico de los epimastigotes recombinantes inducidos y no inducidos, bajo las condiciones de cultivo aquí descritas, resultó equivalente al de los epimastigotes de genotipo silvestre descrito por Adroher y colaboradores en 1990: en el seguimiento del cultivo líquido a medida que los parásitos crecen y alcanzan la fase exponencial y estacionaria, los niveles de glucosa disminuyen, contrario a lo que ocurre con la producción de amonio, que aumenta a medida que se agota la glucosa y cuyo máximo coincide con el pico de la fase estacionaria de los epimastigotes y con la mayor cantidad de células metacíclicas diferenciadas. La producción de amonio es una medida indirecta del catabolismo de aminoácidos y este comportamiento ha sido revisado con anterioridad en cultivos de *T. cruzi* (Cannata & Cazzulo, 1984; Cazzulo, 1992, 1994). Se piensa que éste se activa cuando se agota la glucosa en el medio, momento que por lo general coincide con el comienzo de la fase estacionaria en el crecimiento de los parásitos y que tiene que ver con la metaciclogénesis (Barisón *et al.*, 2017). Diferentes autores han estudiado las enzimas responsables de la transferencia de los grupos amino desde los aminoácidos hacia metabolitos intermediarios en *T. cruzi*, como son la alanina amino transferasa (Duschak & Cazzulo, 1991), la aspartato amino transferasa y la glutamato deshidrogenasa dependiente de  $-NAD^+$  y de  $-NADP^+$  (Cazzulo *et al.*, 1977; Duschak & Cazzulo, 1991), que aportan la evidencia necesaria para justificar la liberación de amonio al medio de cultivo (Adroher *et al.*, 1990).

El comportamiento observado para las tasas de crecimiento y consumo de glucosa en los parásitos recombinantes pTcINDEXHK inducidos y sin inducir, coincide con lo reportado por Albert y colaboradores en 2005, quienes estudiaron el flujo glicolítico de *T. brucei* y transfectaron tripomastigotes sanguíneos con un vector que contenía una copia adicional del gen *TbHK* bajo el control de un promotor inducible por tetraciclina. Al sobre-expresar la enzima obtuvieron 20% más de actividad HK en relación con los parásitos no inducidos, pero no observaron diferencias cuantificables respecto a la actividad de otras enzimas (Fosfofructoquinasa (PFK) o Enolasa (ENO)), a la producción de piruvato, al consumo de oxígeno o a la tasa de crecimiento. Empleando ARN de interferencia, los autores consiguieron disminuir los niveles de expresión de la *TbHK*, determinando que sólo después de disminuir más de 50% de la actividad HK ocurría un efecto notable sobre la reducción en el crecimiento de los parásitos. Con estos resultados concluyeron que la HK en *T. brucei* se encuentra en

exceso en los glicosomas pero no ejerce control en el flujo glicolítico o sobre el crecimiento en condiciones normales.

Ahora bien, respecto a las tasas de consumo de glucosa, que aparentemente no se vieron alteradas durante el crecimiento independientemente de la condición de inducidos o sin inducir, según Visser y Heijnen en 2002, de acuerdo con los teoremas empleados para el análisis del control de flujo metabólico, se asume que las velocidades o tasas de flujo de una ruta metabólica son proporcionales al nivel o cantidad de enzima y que el control de la ruta está distribuido entre las diferentes enzimas, lo que reemplaza el concepto de paso limitante, de tal modo que las tasas o velocidades de reacción son función de los niveles de enzima, la concentración de metabolitos y los niveles de componentes extracelulares. La velocidad de cada paso es proporcional a la cantidad de enzima por lo que si se incrementa en un factor igual a todas las enzimas en la ruta, la velocidad de las reacciones debería incrementar en ese mismo factor, lo que significa que el flujo general de la ruta incrementaría también en cierto factor y las concentraciones de los metabolitos involucrados permanecerían intactos. Podría suponerse que el incremento de una sola enzima, si ésta contribuye significativamente al control de flujo, podría afectar de alguna manera el flujo de una ruta, bien sea en un pequeño factor o evidente como la acumulación de algún metabolito intermediario. No obstante, en este trabajo se observa que un incremento de 8 veces la cantidad de HK no tiene efecto sobre el crecimiento de los parásitos, sobre sus tasas de consumo de glucosa y aminoácidos, ni sobre la expresión de enzimas relacionadas como la GlcK y la G6PDH (PPP), por lo que podría pensarse que existe algún mecanismo interno que regula la actividad HK, bien se trate de una concentración de ATP limitante dentro del glicosoma, la asociación con otra enzima de la matriz glicosomal que ejerza actividad regulatoria o mediante alguna modificación post-traducciona.

En el mismo orden de ideas, se ha determinado para la forma sanguínea de *T. brucei* que por debajo de una concentración de glucosa extracelular de 5mM, el control del flujo glicolítico es ejercido casi en su totalidad por el transportador de glucosa de la membrana plasmática (Ter Kuile & Opperdoes, 1991; Bakker *et al.*, 2000) y que por encima de esta concentración, el control del flujo está distribuido bien sea entre el transporte de glucosa a través de la membrana glicosomal y la fosforilación de la glucosa por la hexoquinasa (Ter Kuile & Opperdoes, 1991) o entre cuatro enzimas particulares, a saber: aldolasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), fosfoglicerato quinasa (PGK) y glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (Bakker *et al.*, 1995; Bakker *et al.*, 1999; Bakker *et al.*, 2000). Estos trabajos quitan protagonismo a las quinatas restantes en la ruta, es decir, a la hexoquinasa (HK), a la fosfofructo quinasa (PFK) y a la piruvato quinasa (PYK), que a menos de ser fuertemente inhibidas (93-97%), no ejercen control alguno sobre el flujo glicolítico (Bakker *et al.*, 1999; Albert *et al.*, 2005); lo que las hace, según los estudios de control de flujo metabólico, enzimas poco llamativas como blancos para el diseño de drogas. Una alternativa para corroborar si la sobre-expresión de la HK no tiene ningún efecto en el metabolismo de los parásitos podría ser el seguimiento de alguna de las enzimas anteriormente señaladas, en particular la GAPDH, que ha sido etiquetada como una enzima “cuello de botella” para la glicólisis en otros eucariotas (Shestov *et al.*, 2014), incluida la forma procíclica de *T. brucei* (Núñez-Mujica, 2009).

Entonces surge la gran interrogante respecto al destino de la enzima sobre-expresada en la línea celular recombinante de *T. cruzi*, ya que ésta, aparentemente en natural exceso dentro de los glicosomas (Albert *et al.*, 2005), al ser sobre-expresada no consigue aumentar la tasa de consumo de glucosa de los parásitos en cuestión, ni modificar la expresión de la glucoquinasa o la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Para continuar más adelante es necesario establecer algo importante en relación con los resultados encontrados en este trabajo: (1) la HK-(His)<sub>6</sub> es sobre-expresada de forma activa, lo que pudo evidenciarse con la cinética de inducción presentada como gráficos de actividad vs tiempo en las

figuras 5A y B; (2) la enzima recombinante y la enzima natural son inmunodetectadas por Western Blot, por lo que se observa un aumento en la señal de la banda de aproximadamente 50kDa a medida que transcurren los tiempos de inducción, y (3) la HK-(His)<sub>6</sub> es correctamente importada hacia el interior de los glicosomas, de acuerdo con la inmunofluorescencia indirecta donde logró marcarse la enzima recombinante y se evidenció el patrón característico de los glicosomas perfectamente comparable con el de la enzima marcadora.

Dirigiendo la atención hacia la inmunodetección por Western Blot de la enzima natural y recombinante, es menester señalar lo que parece ser un aumento en la degradación de la enzima recombinante, dado que se observa la aparición de bandas de menor peso molecular a medida que transcurren los tiempos post-inducción en los parásitos inducidos y en menor medida en los no inducidos. Puede especularse que la HK sufra alguna clase de modificación post-traducciona que module su actividad y que ésta se exprese en mayor cantidad que la cuantificada por medición de la actividad específica, pero ocurra degradación durante el crecimiento. Sin embargo, tal degradación puede corresponder a un evento controlado, y es que la misma se observa en los tiempos correspondientes con la fase estacionaria. Previamente ha sido descrito para la piruvato fosfato diquinasa (PPDK), la enzima auxiliar glicosomal más abundante que trabaja para la síntesis de ATP a partir de fosfoenol piruvato (PEP), pirofosfato inorgánico (PPi) y ADP, que la enzima es fosforilada en la Tyr-481 durante la fase estacionaria y que posteriormente sufre un corte proteolítico que conlleva a su inactivación (González-Marcano *et al.*, 2014). De hecho, se encontró que la HK puede ser fosforilada *in vitro* por la proteína quinasa A (PKA), cuya secuencia primaria contiene una secuencia de importación glicosomal tipo PTS-1. Así que esta modificación post-traducciona podría conllevar a la degradación controlada de la TcHK, lo cual está relacionado con el cambio hacia un metabolismo de consumo de aminoácidos (Bao *et al.*, 2008).

En muchas especies de tripanosomátidos han sido descritas enzimas pertenecientes a rutas autofágicas (Brennan *et al.*, 2011; Brennan *et al.*, 2012), que juegan un papel especial durante la diferenciación de las formas del ciclo vital de los parásitos al contribuir con la degradación de organelas (conocida como pexofagia en el caso de los glicosomas) y con el reciclaje de proteínas dentro de la célula. La pexofagia da paso a nuevos glicosomas dotados de un nuevo conjunto enzimático, lo que puede indicar que existen mecanismos de inducción-represión metabólica de las enzimas glicolíticas que modulan la expresión de las enzimas entre los distintos estadios (Adroher *et al.*, 1990; Michels *et al.*, 2006; Ebikeme *et al.*, 2008). Una vez que los glicosomas son degradados, nuevas organelas pueden surgir y proliferar mediante el crecimiento y división de glicosomas pre-existentes y también a través de la biogénesis *de novo* a partir del retículo endoplasmático. Se ha reportado en *T. brucei* que la contribución de cada mecanismo es influenciada por la disponibilidad de glucosa (Bauer & Morris, 2017). Estas observaciones podrían explicar la aparición de las bandas de menor peso molecular de la TcHK, cuya intensidad incrementa en los mayores tiempos pos-inducción (fase estacionaria), que pudiesen ser consecuencia de la metacicloogénesis y por ende de la remodelación de los glicosomas.

Además de la inmunodetección de la TcHK, se inmunodetectaron la GlcK, como una banda de aproximadamente 40kDa (Cáceres *et al.*, 2007), y la G6PDH como una banda de más o menos 60kDa (Igoillo-Esteve & Cazzulo, 2006) en todos los tiempos de crecimiento de los parásitos inducidos y no inducidos. El grosor aparentemente constante de las bandas observadas indica que la expresión de estas enzimas se mantuvo constante a lo largo del crecimiento y sin distinción de la condición de inducción. La actividad G6PDH fue registrada para todos los puntos de la curva de crecimiento, sin embargo, los resultados no son concluyentes dado que se trata de valores obtenidos a partir de un único experimento. A pesar de ello, la actividad de esta enzima parece aumentar un poco cuando los parásitos se

encuentran en fase exponencial, especialmente en los parásitos no inducidos, pero sin una clara diferencia entre los inducidos y no inducidos; este fenómeno se asemeja al observado en la línea celular recombinante de *T. cruzi* capaz de sobre-expresar GlcK empleados por Ramírez en 2016.

Retomando las afirmaciones anteriores podemos continuar diciendo que es bien sabido por diferentes métodos que la hexoquinasa de *T. cruzi* se localiza dentro del glicosoma (Racagni *et al.*, 1983; Urbina & Crespo, 1984; Adroher *et al.*, 1990; Cáceres *et al.*, 2003). Dos hechos ponen de manifiesto que la HK-(His)<sub>6</sub> sobre-expresada durante este estudio fue correctamente importada hacia la luz glicosomal: (1) los parásitos no dejaron de crecer en comparación con el cultivo no inducido y (2) la inmunofluorescencia indirecta señala su presencia en compartimientos esféricos bien definidos en el citosol de los parásitos, con ausencia de señal tanto en las células no inducidas como en las de genotipo silvestre de la cepa EP de *T. cruzi*.

En promastigotes de *Leishmania donovani*, a comienzos del 2010, se logró estudiar el efecto de la expresión de la HK con la secuencia de importación PTS-2 truncada ( $\Delta$ HK-GFP), fusionada con la proteína fluorescente verde (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*) sobre el crecimiento de los parásitos, y se comparó con la sobre-expresión del gen nativo de *L. donovani* también fusionado con la GFP. El análisis del crecimiento se realizó en relación a la cantidad de glucosa y se determinó que ésta tenía un efecto tóxico dosis-dependiente en las células que expresaban  $\Delta$ HK-GFP al compararla con los parásitos que expresaban la HK-GFP. Se observó que los parásitos con la  $\Delta$ HK-GFP fallaban en la co-localización dentro de los glicosomas en comparación con los que expresaban la HK-GFP y que poseían niveles superiores de glucosa 6-fosfato (G6-P) en el tiempo. Ya que en el citosol la concentración de ATP no es un factor límite, la enzima  $\Delta$ HK fue capaz de fosforilar grandes cantidades de glucosa, lo que resultó en una mayor toxicidad, ya que a mayor concentración de G6-P mayor turgor por osmolaridad en la célula, lo que se tradujo en un efecto negativo sobre el crecimiento (Kumar *et al.*, 2010). En el caso concreto de *T. cruzi*, ya que la enzima fue expresada con una etiqueta de expresión en su extremo C-terminal con el fin de no interferir con el fenómeno de importación, y que los parásitos recombinantes inducidos arrojaron una señal al ser incubados con el anticuerpo  $\alpha$ -His-tag, se concluye que la HK-(His)<sub>6</sub> fue correctamente importada hacia la luz glicosomal.

## 7.2 Caracterización cinética de la enzima recombinante (HK-(His)<sub>6</sub>)

### 7.2.1 Purificación por cromatografía de afinidad a metales

Con el ensayo de la inmunofluorescencia pudo confirmarse la correcta importación de la HK-(His)<sub>6</sub> al interior de los glicosomas y se dio por terminada la caracterización fenotípica de los epimastigotes recombinantes de *T. cruzi* pTcINDEXHK cepa EP. Seguidamente, la HK-(His)<sub>6</sub> pudo ser purificada a partir de una fracción enriquecida de glicosomas, obtenida por centrifugación diferencial de los epimastigotes luego de 96h de inducción. Tal y como se realizó al principio de este trabajo fue necesario hacer una evaluación preliminar del experimento, en aras de estandarizar *grosso modo* la purificación de la enzima. Los resultados obtenidos tras dicha evaluación permitieron determinar que la HK-(His)<sub>6</sub> podía ser purificada exitosamente a través de una columna de afinidad a metales y por desplazamiento competitivo con 50mM de imidazol a pH 7.8, en un solo paso de purificación. El empleo de 50mM de imidazol para la elución de la hexoquinasa recombinante de *T. cruzi* ha sido reportado con anterioridad al sobre-expresarla en *E. coli* (Cáceres *et al.*, 2003), por lo que este hallazgo confirmó aquellos resultados y permitió la subsecuente toma de decisiones en cuanto a la purificación final.

Habiendo determinado las condiciones de purificación se realizó otra centrifugación diferencial, pero esta vez la liberación de la actividad HK fue seguida a lo largo del procedimiento experimental, hallándose un 73% de latencia, valor que se encuentra en el rango reportado por diferentes autores para la misma enzima (Kiara & Njogu, 1983; Urbina & Crespo, 1984; Taylor & Gutteridge, 1987; Sanz-Rodríguez, *et al.*, 2007). La purificación contempló dos lavados previos a la elución con dos concentraciones inferiores a 50mM de imidazol, con la intención de obtener la proteína más pura que lo observado en el gel de la primera purificación, donde se aprecian bandas de mayor peso molecular que acompañan a la proteína recombinante purificada (ver figura 14). Si bien el procedimiento experimental fue seguido buscando mantener las condiciones de la purificación inicial, la enzima falló en unirse a la resina tan eficientemente como la primera vez que se ensayó, obteniéndose gran cantidad de unidades en ambos lavados (de 10mM y 25mM de imidazol), con el mayor rendimiento de purificación en el lavado con 10mM y la mayor cantidad de unidades en el lavado con 25mM de imidazol.

Vale la pena mencionar que luego de esta segunda purificación constatamos que la solución tampón empleada para el equilibrado de la columna y para la elución de la proteína se encontraba a un pH mayor que el registrado (9.1 en vez de 7.8), debido a una falla en el instrumento de medición. Se ha determinado que un rango de pH demasiado alcalino favorece la unión de otros grupos funcionales aminoacídicos que se desprotonan, disminuyendo la selectividad de la columna hacia los polipéptidos de histidina (Cheung *et al.*, 2012); en concreto, los aminoácidos cuyas cadenas laterales pueden participar en esta interacción con la columna a un pH mayor que 9 son Cys, Glu y Asp. El hecho de que estos aminoácidos hayan estado desprotonados y en interacción con la columna pudo haberse traducido en una menor cantidad de proteína etiquetada unida a la columna, siendo liberada en parte con la fracción no enlazada y desplazándose fácilmente con pequeñas concentraciones de imidazol como la de los lavados. Afortunadamente este error experimental no parece haber sido perjudicial para la continuación del trabajo, dado que, como muchas enzimas glicosomales, la hexoquinasa de *T. cruzi* posee un punto isoeléctrico calculado de alrededor de 9.67 (Cáceres *et al.*, 2003) por lo que no sería descabellado afirmar que su actividad no se vio comprometida durante la purificación. El exceso de la proteína debido a la sobre-expresión dentro de las organelas separadas fue tal que permitió obtenerla con una pureza relativamente alta (ver Fig. 16) a pesar del pH.

### 7.2.2 Determinación de las constantes $K_M$ y $V_{m\acute{a}x}$

Una vez obtuvimos la enzima pura nos dimos a la tarea de caracterizarla en función de sus constantes cinéticas  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  para los anómeros  $\alpha$  y una mezcla de  $\alpha/\beta$  de la D-Glucosa, buscando no sólo reportar dichos valores, sino también dilucidar ciertos aspectos relacionados con el catabolismo de este carbohidrato en el interior de los glicosomas de *T. cruzi*. Para la determinación de las constantes, luego de haber adquirido los datos para las curvas de velocidad vs concentración de sustrato y haber comprobado que la enzima tiene un comportamiento Michaeliano, empleamos dos métodos de re-graficación, a saber: los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk y el método de Hannes-Wolff. Según Copeland (2000), el método gráfico de Hannes-Wolff tiene un porcentaje de desviación respecto a los valores reales de las constantes de 1.33% y 0.97% para la  $K_M$  y la  $V_{m\acute{a}x}$ , respectivamente, mientras que el método de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk, al emplear todos los datos de una curva experimental, se desvía 36.92% y 20.72% de los valores reales de la  $K_M$  y la  $V_{m\acute{a}x}$ . Basándonos en esta información, el análisis se efectuará empleando los valores de las constantes obtenidas para cada sustrato por el método de Hannes-Wolff.

Las investigaciones relacionadas con la caracterización cinética de la TcHK señalan una  $K_M$  para la glucosa que oscila entre 35 $\mu$ M y 90 $\mu$ M. A continuación una tabla resumen donde se presentan

las constantes halladas por los diferentes autores y la relación de éstas con la aquí reportada. Puede observarse que la constante descrita por Adroher y colaboradores para la enzima de los epimastigotes se asemeja a la obtenida en este estudio, sin embargo, el único reporte de la velocidad máxima es el de Urbina y colaboradores, cuyo valor representa la mitad del obtenido por nosotros. A pesar de lo anterior, destacaremos el hecho de que todas las constantes descritas hasta la fecha han sido calculadas en base al método de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk, así que si comparamos el valor de la  $K_M$  afirmada por Cáceres en 2003 (43 $\mu$ M) con el hallado con el mismo método por nosotros (42.5 $\mu$ M), encontraremos mucha mayor similitud entre ambos.

Tabla 3. Resumen de las constantes cinéticas  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  de la TcHK para la  $\alpha$ -D-Glucosa reportadas hasta el presente.

Enzima	Constante Cinética		Relación $K_m$	Referencia
	$K_M$ ( $\mu$ M)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)		
Natural	90	-	2,7	Racagni <i>et al.</i> , 1983
	40	0,44	1,2	Urbina <i>et al.</i> , 1984
	35,4	-	1,1	Adroher <i>et al.</i> , 1990
	46,3*	-	1,4	Adroher <i>et al.</i> , 1990
	43	-	1,3	Cáceres <i>et al.</i> , 2003
Recombinante	60	-	1,8	Cáceres <i>et al.</i> , 2003
	33	0,807	-	Parada, 2018

\*De tripomastigotes metacíclicos

Dado que el sistema de expresión que empleamos en el desarrollo del trabajo aquí presentado proporciona a la enzima en cuestión todas las condiciones necesarias para su correcta traducción, plegamiento e importación, podría decirse que las constantes evaluadas están muy cerca de los valores reales, tomando en cuenta que la etiqueta de expresión podría influir de alguna manera en el comportamiento cinético de la TcHK, aunque como lo muestran los resultados no parece tener ningún efecto.

Ahora bien, de acuerdo con lo expuesto en la sección anterior de resultados, la TcHK aquí purificada aparentemente posee cierta preferencia en cuanto a la especie anomérica de su sustrato. En efecto, la constante de afinidad para la mezcla  $\alpha/\beta$ -D-glucosa que encontramos es 1.5 veces mayor que la hallada para la  $\alpha$ -D-glucosa, pero la velocidad máxima es mayor para éste último anómero. Estos resultados coinciden perfectamente con lo demostrado para las hexoquinasas de mamíferos y levaduras (Salas *et al.*, 1965; Bailey *et al.*, 1968; Sener *et al.*, 1985) y concuerdan con la observación realizada por Cordeiro y colaboradores en 2007, que, estudiando la estructura cristalina de la glucoquinasa, evidenciaron algunos factores estructurales determinantes para la especificidad anomérica de las enzimas fosforiladoras de hexosas.

Esta diferencia de afinidad no se observa únicamente para la hexoquinasa, los mismos autores citados han indicado también que la glucoquinasa posee mayor afinidad por el anómero  $\beta$  de la glucosa y fueron éstos (Cordeiro y sus colaboradores en 2007) los que especularon acerca del mecanismo subyacente a la discriminación anomérica de estas dos enzimas, exponiendo que la HK de *T. cruzi* posee una secuencia de tres aminoácidos altamente conservados, que forma parte de la secuencia distintiva de las hexoquinasas de diferentes organismos; estos tres aminoácidos no se encuentran en la cadena peptídica de la GlcK y por cristalografía se observa que la configuración del anómero  $\beta$  posee características que le impiden unirse favorablemente a la enzima, por lo que la HK resulta ser más afín al anómero  $\alpha$ . Del mismo modo, la TcGlcK al no poseer tales residuos es incapaz de hacer el reconocimiento del anómero  $\alpha$ , lo que la hace más afín al anómero  $\beta$ .

### 7.2.3 Determinación de la capacidad de fosforilación de hexosaminas

Además de evaluar las constantes cinéticas respecto a la glucosa y sus anómeros, también quisimos indagar en la capacidad de fosforilación de hexosaminas de la *TcHK* purificada, ya que diversos autores se han dado a la tarea de estudiar el metabolismo de las hexosaminas de diferentes especies de tripanosomátidos y han determinado que la hexoquinasa puede jugar un papel especial en el metabolismo de las mismas para la producción de intermediarios de glicosilación de proteínas (Katzin & Colli, 1983; Buscaglia *et al.*, 2004; Mendonca *et al.*, 2005; Buscaglia *et al.*, 2006; Turnock & Ferguson, 2007; Nadereret, 2008; Ebikeme *et al.*, 2008; Nakayasu *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2017), ya que así como es cierto para la mayoría de los organismos eucariotas, los tripanosomátidos poseen una superficie celular o cubierta rica en glicoconjugados, algunos de los cuales juegan un importante papel en la supervivencia e infectividad de estos protozoarios (Mendonca *et al.*, 2005; Turnock & Ferguson, 2007).

En este trabajo demostramos que la *TcHK* recombinante es incapaz de fosforilar N-Acetilglucosamina, aun empleando altas concentraciones de sustrato, pero fosforila D-Glucosamina con una  $K_M$  de 863 $\mu$ M y 1.27U/mg de  $V_{m\acute{a}x}$ . Racagni y Machado (1983) probaron también este sustrato con la *TcHK* nativa purificada a partir de formas epimastigotas, obteniendo una  $K_M$  de 600 $\mu$ M, sin determinación de la velocidad máxima.

Turnock y Ferguson (2007) determinaron que la composición de los azúcares nucleótidos es diferente entre las especies de tripanosomátidos y que incluso varía de acuerdo al estadio del ciclo vital. Comprobaron mediante un método de cromatografía líquida-ionización por electro-spray-espectrometría de masas en tanda, que muchas de las glicoproteínas de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*, poseen en su repertorio glucosídico azúcares como UDP-Glucosa, UDP-Galactofuranosa, GDP-Manosa, UDP-N-Acetilglucosamina y GDP-Fucosa. Entonces, la HK aparentemente juega un papel importante también para la producción de estos conjugados o sus intermediarios y los autores presentan dos posibles rutas de rescate de GDP-Manosa y UDP-N-Acetilglucosamina que involucran la fosforilación de Manosa y de Glucosamina por la hexoquinasa, además de la fosforilación de la glucosa (círculos azules, Fig. 20).

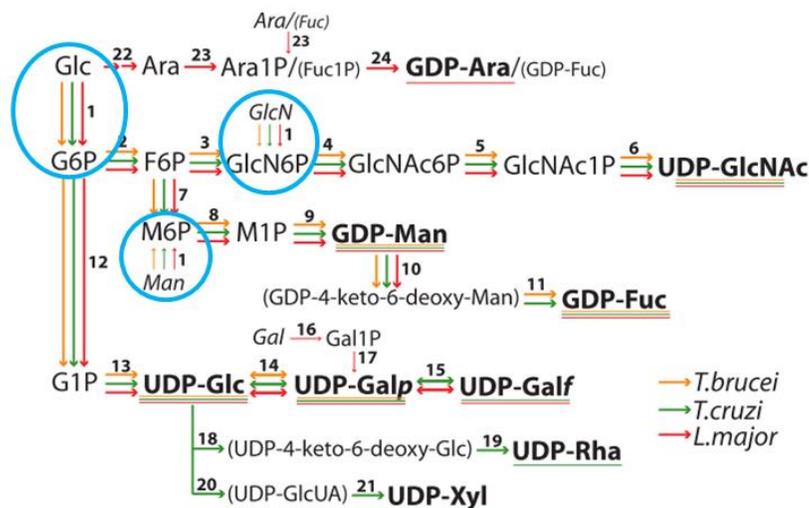


Figura 20. Resumen de las rutas de biosíntesis de los azúcares-nucleótidos en los parásitos tripanosomátidos. Los azúcares-nucleótidos empleados para la biosíntesis de glicoconjugados se encuentran en la sangre. Los intermediarios biosintéticos de

los azúcares-nucleótidos están entre paréntesis. Las rutas de rescate están en letras mayúsculas. Los números se refieren a las enzimas y a los genes conocidos o candidatos: **1** hexoquinasa, **2** glucosa 6-fosfato isomerasa, **3** glucosamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa, **4** glucosamina-fosfato N-acetiltransferasa, **5** fosfoacetilglucosamina mutasa, **6** UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa, **7** fosfomanosa isomerasa, **8** fosfomanomutasa, **9** manosa1-fosfato guaniltransferasa, **10** GDP-manosa-4,6-deshidratasa, **11** GDP-L-fucosa sintetasa, **12** fosfoglucomutasa, **13** UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa, **14** UDP-galactosa4-epimerasa, **15** UDP-galactopiranos mutasa, **16** galactoquinasa, **17** UTP-hexosa-1-fosfato uridiltransferasa o UDP-glucosa hexosa1-1fosfato uridiltransferasa, **18** UDP-glucosa 4,6-deshidratasa, **19** UDP-4-ceto-6-deoxiglucosa reductasa, **20** UDP-glucosa-6-deshidrogenasa, **21** UDP-glucuronato descarboxilasa, **22** ruta desconocida, **23** fucosa (arabinosa) quinasa, **24** arabinosa-1-fosfato guaniltransferasa. El color de las flechas y el subrayado indica la presencia de la enzima correspondiente y el azúcar-nucleótido en *T. brucei* (naranja), *T. cruzi* (verde) y *L. major* (rojo). Tomado de Turnock y Ferguson, 2007. Los círculos azules indican las reacciones catalizadas por la hexoquinasa.

### ¿Hexoquinasa o Glucoquinasa?

Dentro de los glicosomas de *T. cruzi*, como se ha destacado anteriormente, se encuentran dos enzimas capaces de catalizar la transferencia de un grupo fosforilo al carbono 6 de la D-glucosa a expensas de ATP: la hexoquinasa y la glucoquinasa. La presencia de estas dos enzimas en el interior de estas organelas representa un tema controversial dado que no ha sido esclarecida la función particular de la glucoquinasa, también presente en algunas especies de *Leishmania* y ausente en la contraparte africana del parásito, *T. brucei*. Ambas enzimas poseen características físicas y bioquímicas diferentes, bien sea en cuanto al peso molecular, especificidad y afinidad por su sustrato y metabolitos reguladores, por lo que uno podría suponer que debe existir alguna razón metabólicamente relevante que explique tales diferencias. Algunas de ellas podrían sustentarse en los hechos siguientes: (1) la *TcGlcK* se encuentra en menor proporción que la *TcHK* (9 veces menos, aproximadamente); (2) la *TcHK* tiene una constante de afinidad 30 veces menor por la glucosa que la *TcGlcK*, presentando una selectividad moderada por el anómero  $\alpha$  de la D-glucosa, mientras que la *TcGlcK* parece ser moderadamente más selectiva hacia el anómero  $\beta$ ; (3) la *TcHK* es capaz de fosforilar distintas hexosas, entre ellas algunas hexosaminas; la *TcGlcK*, por el contrario, es específica para la D-glucosa y es inhibida por N-Acetilglucosamina y D-Glucosamina.

Podría asegurarse que la HK y GlcK de *T. cruzi* no se encuentran en competencia por su sustrato, dado que la tasa de anomerización espontánea de la glucosa es muy baja a pH fisiológico y ya que existen enzimas específicas para mediar la anomerización de la glucosa (las mutarotasas) (Salas *et al.*, 1965; Cordeiro *et al.*, 2007) (aunque aún no hay reportes específicos para *T. cruzi*); además de la gran diferencia en cuanto a la afinidad por la glucosa. Salas y compañía en 1965, establecieron que la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) de levaduras es específica para el anómero  $\beta$  de la glucosa 6-fosfato, el producto de la reacción catalizada por la HK/GlcK. Si la función de la GlcK en *T. cruzi* es la de dirigir G6-P hacia la vía de las pentosas fosfato, una buena evidencia de ello sería su afinidad por el anómero  $\beta$ , suponiendo que la G6PDH de estos parásitos posea las mismas características que las de las levaduras.

Los resultados obtenidos sobre las constantes cinéticas de la *TcHK* para las hexosaminas demuestran que la enzima no es importante sólo para la ruta glicolítica, sino que también es esencial para mantener las rutas de síntesis *de novo* de azúcares nucleótidos a partir de la UDP-Glucosa, y también para la síntesis de la UDP-N-Acetil-glucosamina. Todos estos azúcares nucleótidos son los sustratos para la glicosilación de proteínas de superficie, las cuales constituyen el glicocálix del parásito, que cumple funciones en la protección e infectividad celular. Ya que las hexosaminas aquí probadas son inhibidores de la actividad *TcGlcK*, es probable que la función de las dos enzimas análogas no se encuentre solapada, destacando la participación de la HK en diferentes rutas de interés metabólico para los parásitos (ver Fig. 21). No obstante, estudios posteriores con las enzimas HK y

GlcK de *T. cruzi* podrían aportar valiosa información, si se buscara determinar si la GlcK ejerce algún efecto inhibitorio *in vitro* sobre la HK o viceversa.

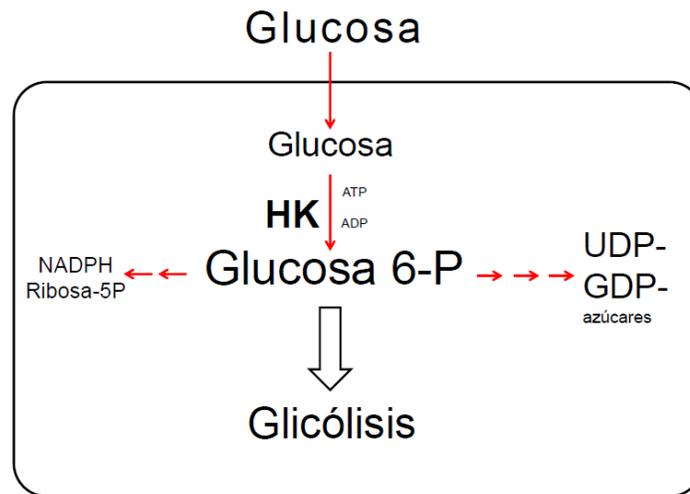


Figura 21. Esquema resumen de los diferentes destinos del producto de la reacción catalizada por la *TcHK* (glucosa 6-fosfato) en los glicosomas de los epimastigotes. Se muestra la participación de la enzima tanto en la ruta glicolítica para la síntesis de ATP e intermediarios de procesos biosintéticos, como en la contribución de la vía de las pentosas fosfato (PPP) para la producción de NADPH y componentes de ácidos nucleicos, y en la síntesis *de novo* de diferentes azúcares nucleótidos que forman parte del glucocalix de los parásitos.

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

## 8 Conclusiones

- Empleando el sistema de expresión homóloga pTcINDEX en *Trypanosoma cruzi* para inducir la sobre-expresión de la TcHK, puede obtenerse hasta 8 veces más en relación con la enzima nativa.
- La sobre-expresión de la TcHK en los epimastigotes recombinantes pTcINDEXHK de la cepa EP de *T. cruzi* no produce efectos cuantificables sobre el crecimiento, el consumo de glucosa, la producción de amonio o la expresión de las enzimas GlcK y G6PDH.
- La TcHK recombinante sobre-expresada en los parásitos mutantes co-localiza con la enzima nativa en el interior de los glicosomas de los parásitos inducidos durante 96h.
- La HK-(His)<sub>6</sub> de *T. cruzi* expresada con el sistema homólogo pTcINDEX en los epimastigotes mutantes es purificada en un solo paso por cromatografía de afinidad a metales mediante desplazamiento competitivo con 50mM de imidazol.
- La HK recombinante es más afín al anómero  $\alpha$  de la D-glucosa que al anómero  $\beta$ , pero la velocidad máxima alcanzada por la enzima es menor para éste último.
- La TcHK sobre-expresada es incapaz de fosforilar N-Acetilglucosamina, pero fosforila D-Glucosamina con una constante de afinidad 26 veces superior a la del anómero  $\alpha$  de la D-glucosa.

www.bdigital.ula.ve

## 9 Bibliografía

- Acosta, H., Cáceres, A., González-Marcano, E., Quiñones, W., Avilán, L., Dubourdieu, M., & Concepción, J. L. (2014). Hysteresis and positive cooperativity as possible regulatory mechanisms of *Trypanosoma cruzi* hexokinase activity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *198*(2), 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.01.003>
- Adroher, F.-J., Osuna, A., & Lupiáñez, J. A. (1990). Differential Energetic Metabolism during *Trypanosoma cruzi* Differentiation II. Hexokinase, phosphofructokinase and pyruvate kinase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *94*, 71–82.
- Albert, M. A., Haanstra, J. R., Hannaert, V., Van Roy, J., Opperdoes, F. R., Bakker, B. M., & Michels, P. A. M. (2005). Experimental and in silico analyses of glycolytic flux control in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(31), 28306–28315. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502403200>
- Alves, M. J. M., Kawahara, R., Viner, R., Colli, W., Mattos, E. C., Thaysen-Andersen, M., ... Palmisano, G. (2017). Comprehensive glycoprofiling of the epimastigote and trypomastigote stages of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Proteomics*, *151*, 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.05.034>
- Bailey, J. M., Fishman, P. H., & Pentchev, P. G. (1968). Studies on Mutarotases. *The Journal of Biological Chemistry*, *243*(18), 4827–4831.
- Bakker, B. M., Michels, P. a M., Opperdoes, R., Westerhoff, H. V, & Opperdoes, F. R. (1999). What Controls Glycolysis in Bloodstream Form *Trypanosoma brucei*? *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(21), 14551–14559.
- Bakker, B. M., Westerhoff, H. V., & Michels, P. A. M. (1995). Regulation and control of compartmentalized glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *27*(5), 513–525. <https://doi.org/10.1007/BF02110191>
- Bakker, B. M., Westerhoff, H. V, Opperdoes, F. R., & Michels, P. A. M. (2000). Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *106*, 1–10.
- Bao, Y., Weiss, L. M., Braunstein, V. L., & Huang, H. (2008). Role of Protein Kinase A in *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, *76*(10), 4757–4763. <https://doi.org/10.1128/IAI.00527-08>
- Barisón, M. J., Rapado, L. N., Merino, E. F., Furusho, E. M., Mantilla, B. S., Marchese, L., ... Silber, A. M. (2017). Metabolomics profiling reveals a finely tuned , starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Journal of Biological Chemistry*, *229*(21), 8964–8977. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.778522>

- Bauer, S., & Morris, M. T. (2017). Glycosome biogenesis in trypanosomes and the de novo dilemma. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(4), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005333>
- Bio-Rad. (n.d.). Quick Start Bradford Protein Assay. Instruction Manual. Retrieved November 13, 2017, from <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110065A.pdf>
- Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*, *27*, 347–382. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.27.100173.002023>
- Brennand, A., Gualdrón-López, M., Coppens, I., Rigden, D. J., Ginger, M. L., & Michels, P. A. M. (2011). Autophagy in parasitic protists: Unique features and drug targets. *Molecular & Biochemical Parasitology*, *177*, 83–99. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.02.003>
- Brennand, A., Rico, E., & Michels, P. A. M. (2012). Autophagy in Trypanosomatids. *Cells*, *1*, 346–371. <https://doi.org/10.3390/cells1030346>
- Bringaud, F., Riviere, L., & Coustou, V. (2006). Energy metabolism of trypanosomatids : Adaptation to available carbon sources. *Molecular & Biochemical Parasitology*, *149*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.03.017>
- Buscaglia, C. A., Campo, V. A., Di Noia, J. M., Torrecilhas, A. C. T., Cláudia, R., Marchi, D., ... Almeida, I. C. (2004). The Surface Coat of the Mammal-dwelling Infective Trypomastigote Stage of *Trypanosoma cruzi* Is Formed by Highly Diverse Immunogenic Mucins. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*, 15860–15869. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314051200>
- Buscaglia, C. A., Campo, V. A., Frasch, A. C. C., & Di Noia, J. M. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins : host-dependent coat diversity. *Nature Reviews: Microbiology*, *4*(March), 229–236.
- Cáceres, A. J., Portillo, R., Acosta, H., Rosales, D., Quiñones, W., Avilan, L., ... Concepción, J. L. (2003). Molecular and biochemical characterization of hexokinase from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *126*(2), 251–262. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00294-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00294-3)
- Cáceres, A. J., Quiñones, W., Gualdrón, M., Cordeiro, A., Avilán, L., Michels, P. A. M., & Concepción, J. L. (2007). Molecular and biochemical characterization of novel glucokinases from *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *156*(2), 235–245. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.08.007>
- Cannata, J. J. B., & Cazzulo, J. J. (1984). The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *79B*(3), 297–308.
- Cazzulo, J. J. (1992). Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *The FASEB Journal*, *6*, 3153–3161.
- Cazzulo, J. J. (1994). Intermediate Metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *26*(2), 157–165.

- Cazzulo, J. J., Juan, S. M., & Segura, E. L. (1977). Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 56(3), 301–303. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(77\)90020-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(77)90020-7)
- Chagas disease (American trypanosomiasis)*. (2017). Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
- Chambers, J. W., Kearns, M. T., Morris, M. T., Morris, J. C., & Street, N. C. (2008). Assembly of heterohexameric trypanosome hexokinases reveals that hexokinase 2 is a regulable enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 283(22), 14963–14970. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802124200>
- Cheung, R. C. F., Wong, J. H., & Ng, T. B. (2012). Immobilized metal ion affinity chromatography : a review on its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 1411–1420. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4507-0>
- Copeland, R. A. (2000). *Enzymes* (Second Ed.). Wiley-VCH.
- Cordeiro, A. T., Cáceres, A. J., Vertommen, D., Concepción, J. L., Michels, P. A. M., & Versées, W. (2007). The Crystal Structure of *Trypanosoma cruzi* Glucokinase Reveals Features Determining Oligomerization and Anomer Specificity of Hexose-phosphorylating Enzymes. *Journal of Molecular Biology*, 372(5), 1215–1226. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.07.021>
- Coura, J. R., & Borges-Pereira, J. (2010). Chagas disease : 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*, 115, 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.03.008>
- De Souza, W. (2002). Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, 8(4), 269–285. <https://doi.org/10.2174/1381612023396276>
- Duschak, V. G., & Cazzulo, J. J. (1991). Subcellular localization of glutamate dehydrogenases and alanine aminotransferase in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Letters*, 83, 131–135. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1778428](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1778428)
- Ebikeme, C. E., Peacock, L., Coustou, V., Riviere, L., & Bringaud, F. (2008). N-acetyl D-glucosamine stimulates growth in procyclic forms of *Trypanosoma brucei* by inducing a metabolic shift. *Parasitology*, 135(5), 585–594. <https://doi.org/10.1017/S0031182008004241>
- Galland, N., Demeure, F., Hannaert, V., Verplaetse, E., Vertommen, D., Smissen, P. Van Der, ... Michels, P. A. M. (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. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.01.006>
- González-Marcano, E., Mijares, A., Quiñones, W., Cáceres, A., & Concepción, J. L. (2014). Post-translational modification of the pyruvate phosphate dikinase from *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology International*, 63(1), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.09.007>

- Gottberg, G. (2011). *Expresión De La Enzima Glucoquinasa En Tripanosomátidos*. Universidad de Los Andes.
- Haanstra, J. R., González-Marcano, E. B., Gualdrón-López, M., & Michels, P. A. M. (2016). Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(5), 1038–1048. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.015>
- Hemmige, V., Tanowitz, H., & Sethi, A. (2012). Trypanosoma cruzi infection : a review with emphasis on cutaneous manifestations. *International Journal of Dermatology* 2012, 51(5), 501–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05380.x>
- Hudock, M. P., Sanz-Rodríguez, C. E., Song, Y., Chan, J. M. W., Zhang, Y., Odeh, S., ... Oldfield, E. (2006). Inhibition of Trypanosoma cruzi hexokinase by bisphosphonates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(1), 215–223. <https://doi.org/10.1021/jm0582625>
- Igoillo-Esteve, M., & Cazzulo, J. J. (2006). The glucose-6-phosphate dehydrogenase from Trypanosoma cruzi : Its role in the defense of the parasite against oxidative stress. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 149, 170–181. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.05.009>
- Katzin, A., & Colli, W. (1983). Lectin receptors in tr ypanosoma cruzi an N-Acetyl-D-Glucosamine-containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage. *Biochimica et Biophysica Acta*, 727, 403–411.
- Kawai, S., Mukai, T., Mori, S., Mikami, B., & Murata, K. (2005). Hypothesis: structures, evolution, and ancestor of glucose kinases in the hexokinase family. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), 320–330. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.320>
- Kiara, J. K., & Njogu, R. M. (1983). Comparison of glycolysis in intact and digitonin-permeabilized bloodstream trypomastigotes of Trypanosoma brucie. *International Journal of Biochemistry*, 15(11), 1379–1383.
- Kumar, R., Gupta, S., Srivastava, R., Sahasrabudhe, A. A., & Gupta, C. M. (2010). Expression of a PTS2-truncated hexokinase produces glucose toxicity in Leishmania donovani. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 170(1), 41–44. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.11.002>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lopes, A. H., Souto-Padrón, T., Dias, F. A., Gomes, M. T., Rodrigues, G. C., Zimmermann, L. T., ... Vermelho, A. B. (2010). Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. *The Open Parasitology Journal*, 4(1), 30–59. <https://doi.org/10.2174/1874421401004010030>
- Maugeri, D. A., Cannata, J. J. B., & Cazzulo, J. J. (2011). Glucose metabolism in Trypanosoma cruzi. *Essays In Biochemistry*, 51, 15–30. <https://doi.org/10.1042/BSE0510015>

- Maugeri, D. A., & Cazzulo, J. J. (2004). The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiology Letters*, *234*, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.03.018>
- Mendonca, L., Todeschini, A. R., Heise, N., & Previato, J. O. (2005). Protozoan parasite-specific carbohydrate structures. *Current Opinion in Structural Biology*, *15*, 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.08.011>
- Mercado Polanco, D. A. (2010). *Mecanismos de Regulación de la Enzima Glucoquinasa de Epimastigotes de Trypanosoma cruzi*. Universidad de Los Andes.
- Michels, P. A. M., Bringaud, F., Herman, M., & Hannaert, V. (2006). Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1763*, 1463–1477. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.019>
- Michels, P. A. M. M., Hannaert, V., & Bringaud, F. (2000). Metabolic aspects of glycosomes in Trypanosomatidae - New data and views. *Parasitology Today*, *16*(11), 482–489. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01810-X](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01810-X)
- Naderer, T., Wee, E., & Mcconville, M. J. (2008). Role of hexosamine biosynthesis in *Leishmania* growth and virulence. *Molecular Microbiology*, *69*(4), 858–869. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06314.x>
- Nakayasu, E. S., Yashunsky, D. V, Nohara, L. L., Torrecilhas, A. C. T., Nikolaev, A. V, & Almeida, I. C. (2009). GPIomics: global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Systems Biology*, *5*(261), 1–18. <https://doi.org/10.1038/msb.2009.13>
- Núñez-Mujica, G. D. (2009). *Control y regulación de la glicólisis de Trypanosoma cruzi y Trypanosoma brucei: Un enfoque teórico*. Universidad de Los Andes.
- Opperdoes, F. R. (1987). Compartmentation of Carbohydrate Metabolism in Trypanosomes. *Annual Review of Microbiology*, *41*, 127–51.
- Opperdoes, F. R., & Szikora, J. P. (2006). In silico prediction of the glycosomal enzymes of *Leishmania major* and trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *147*(2), 193–206. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.02.010>
- Racagni, G., & Machado de Domenech, E. E. (1983). Characterization of *Trypanosoma cruzi* Hexokinase. *Molecular & Biochemical Parasitology*, *9*, 181–188.
- Ramírez Gutiérrez, A. C. (2016). *Sobreexpresión de la enzima Glucoquinasa usando el sistema homólogo pTcINDEX en epimastigotes de Trypanosoma cruzi cepa EP*. Universidad de Los Andes.
- Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas Disease. *The Lancet*, *375*, 1388–402. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1422-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1422-3_3)

- Rassi Jr, A., Rassi, A., & Marcondes de Rezende, J. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26, 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>
- Rivera, G., Bocanegra-Garcia, V., Ordaz-Pichardo, C., Noguera-Torres, B., & Monge, A. (2009). New Therapeutic Targets for Drug Design Against *Trypanosoma cruzi*, Advances and Perspectives. *Current Medicinal Chemistry*, 16(25), 3286–3293. <https://doi.org/10.2174/092986709788803303>
- Salas, M., Viñuela, E., & Sols, A. (1965). Spontaneous and Enzymatically Catalyzed Glucose and Anomeric of Related Anomerization Specificity of Enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 240(2), 561–568.
- Sanz-Rodríguez, C. E., Concepción, J. L., Pekerar, S., Oldfield, E., & Urbina, J. A. (2007). Bisphosphonates as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* hexokinase: Kinetic and metabolic studies. *Journal of Biological Chemistry*, 282(17), 12377–12387. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607286200>
- Sanz-Rodríguez, C. E., Concepción, J. L., Pekerar, S., Oldfield, E., & Urbina, J. A. (2007). Bisphosphonates as Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Hexokinase. Kinetic and Metabolic studies. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(17), 12377–12387. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607286200>
- Sebastian, S., Wilson, J. E., Mulichak, A., & Garavito, R. M. (1999). Allosteric regulation of type I hexokinase: A site-directed mutational study indicating location of the functional glucose 6-phosphate binding site in the N-terminal half of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 362(2), 203–210. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.1043>
- Sener, A., Giroix, M.-H., Dufrane, S. P., & Malaisse, W. J. (1985). Anomeric specificity of hexokinase and glucokinase activities in liver and insulin-producing cells. *Biochemical Journal*, 230, 345–351.
- Shestov, A. A., Liu, X., Ser, Z., Cluntun, A. A., Hung, Y. P., Huang, L., ... Locasale, J. W. (2014). Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step. *eLife*, 3(July2014), 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.03342>
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Mirjam, M. C., Campbell, K., Cheung, E., ... Ralser, M. (2014). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*, 1–39. <https://doi.org/10.1111/brv.12140>
- Taylor, M. B., & Gutteridge, W. E. (1987). *Trypanosoma cruzi*: Subcellular distribution of glycolytic and some related enzymes of epimastigotes. *Experimental Parasitology*, 63(1), 84–97. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(87\)90081-6](https://doi.org/10.1016/0014-4894(87)90081-6)
- Taylor, M. C., Huang, H., & Kelly, J. M. (2011). *Genetic Techniques in Trypanosoma cruzi. Chagas Disease* (1st ed., Vol. 75). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00011-3>
- Taylor, M. C., & Kelly, J. M. (2006). pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for

- Trypanosoma cruzi. *BMC Biotechnology*, 18, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-32>
- Teixeira, A. R. L., Nitz, N., Guimaro, M. C., Gomes, C., & Santos-Buch, C. A. (2006). Chagas disease. *Postgraduate Medical Journal*, 82(974), 788–798. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.047357>
- Ter Kuile, B. H., & Opperdoes, F. R. (1991). Glucose uptake by Trypanosoma brucei. Rate-limiting steps in glycolysis and regulation of the glycolytic flux. *Journal of Biological Chemistry*, 266(2), 857–862.
- Tielens, A. G. M., & Van Hellemond, J. J. (1998). Differences in Energy Metabolism Between Trypanosomatidae. *Parasitology Today*, 14(7). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(98\)01263-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-4758(98)01263-0)
- Turnock, D. C., & Ferguson, M. A. J. (2007). Sugar Nucleotide Pools of Trypanosoma brucei , Trypanosoma cruzi, and Leishmania major. *Eukaryotic Cell*, 6(8), 1450–1463. <https://doi.org/10.1128/EC.00175-07>
- Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001). The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited. *International Journal for Parasitology*, 31(5–6), 472–481. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9)
- Urbina, J. A., & Crespo, A. (1984). Regulation of energy metabolism in Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi epimastigotes, I. Hexokinase and phosphofructokinase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 11(C), 225–239. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(84\)90068-9](https://doi.org/10.1016/0166-6851(84)90068-9)
- Valera Vera, E. A. (2014). *Expresión en un sistema homólogo de la hexoquinasa de Trypanosoma cruzi empleando el vector pTcINDEX*. Universidad de Los Andes.
- Vazquez, M. P. (2007). The Genetics and Genomics of Trypanosoma cruzi. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 1–11.
- Visser, D., & Heijnen, J. J. (2002). The Mathematics of Metabolic Control Analysis Revisited. *Metabolic Engineering*, 4, 114–123. <https://doi.org/10.1006/mben.2001.0216>