



**Departamento de Biología**

*INFORME DEL JURADO NOMBRADO POR EL CONSEJO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES PARA CONSIDERAR EL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DEL BACHILLER*

**LUIS FELIPE ALEXARDY LABRADOR MONTERO**

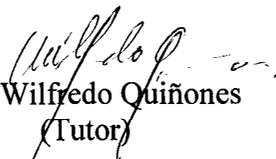
En Mérida a los tres días del mes de abril del 2008, a las 11:00 a.m., se reunieron los Profesores: **Wilfredo Quiñones (tutor)**, **Juan Luis Concepción** y **Ana Cáceres** de la Facultad de Ciencias, miembros del jurado nombrado por el Consejo de la Facultad de Ciencias, para revisar el Trabajo Especial de Grado que sobre el tema: **“Purificación y caracterización cinética de la fosfoglicerato kinasa B (PGKB) de *Trypanosoma cruzi*”**, presentó el Bachiller Luis Felipe Alexardy Labrador Montero, Titular de la Cédula de Identidad N° V-16.745.956, para optar al título de:

***LICENCIADO EN BIOLOGÍA***

en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes. Acto seguido se procedió a oír la exposición que sobre el tema arriba mencionado realizó el Bachiller Luis Felipe Alexardy Labrador Montero.

Después del correspondiente interrogatorio, el Jurado procedió a deliberar sobre la calificación del trabajo sometido a su consideración.

Finalmente el Jurado lo declaró aprobado con la Calificación de VEINTE (20) PUNTOS y recomendado para publicación.

  
Prof. Wilfredo Quiñones  
(Tutor)

  
Prof. Juan Luis Concepción

  
Prof. Ana Cáceres



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
LABORATORIO DE ENZIMOLOGIA DE PARASITOS

**Purificación y caracterización cinética de la  
fosfoglicerato kinasa B (PGKB) de  
*Trypanosoma cruzi***

Trabajo especial de grado presentado por

**Luis Felipe Labrador Montero**

Como requisito parcial para optar al título de

**Licenciado en Biología**

Tutor MSc. Wilfredo Quiñones

## **Agradecimientos**

De todo lo que he escrito a lo largo de mi vida, de mi carrera, creo que esto ha sido lo más difícil. ¿Cómo resumir en pocas líneas lo que siento? tantas cosas que agradecer.

Primero agradezco a mis padres por su ayuda incondicional, tanto moral como económica. Y a todos mis familiares, muchos de ellos aportaron ese granito de arena, el cual nunca olvidare y veo magnificado.

Por otra a todas aquellas personas que formaron parte de mi vida académica, en ese proceso de maduración, maduración que continua de aquí en adelante, ya que ahora es donde queda camino por recorrer. Entre esas personas se encuentran mi otra familia, la del “LEP”, los cuales me tendieron la mano ayudándome a crecer como científico y humano, como olvidarlos: Eli, Limari, Ximena, Gabriela Gottberg, el señor Silverio, David, Tibisay, mis compañeros, tesistas de pre y post grado: Guido, Hector, Cesar, Gabriela Cantos, Darío, Eglys, Gloria, Javier, Neudo, Duglas, Carolina, aprendimos juntos discutiendo, me ayudaron a corregir mis errores. A mi tutor, jurado, jefe y amigo: Wilfredo, fuiste guía y maestro, con paciencia me enseñaste muchas cosas. A Juan por presentarme mis errores de forma constructiva, enseñándome el valor del conocimiento, la importancia del saber. Y Ana que aparte de enseñarme, me ayudo a sentir confianza en mi mismo.

Al CDCH por financiar parte de mi tesis.

Se que aún hay muchos compañeros por nombrar, personas con las que he compartido muchos momentos, pero no quiero que esto parezca un censo y créanme los tengo presentes.

## Abreviaturas

1,3BPG	1,3-bifosfoglicerato
2PGA	2-fosfoglicerato
3PGA	3-fosfoglicerato
ADH	Alanina deshidrogenasa
ADP	Adenosina difosfato
AE	Actividad Específica
ALAT	Alanina amino transferasa
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
Asp	Ácido aspártico
Asn	Asparagina
Arg	Arginina
BSA	Albúmina de suero bovino
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
FRD	Fumarato reductasa
G3P	Glicerol-3-fosfato
G3PDH	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa

GPI	Glicosilfosfatidilinositol
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
HK	Hexokinasa
ISDH	Isocitrato deshidrogenasa
$K_{is}$	Constante de inhibición para el complejo EI
$K_{ii}$	Constante de inhibición para el complejo ESI
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
LDH	Lactato deshidrogenasa
Lys	Lisina
Leu	Leucina
MDH	Malato deshidrogenasa
$NAD^+$	Nicotina adenina dinucleótido oxidado
NADH	Nicotina adenina dinucleótido reducido
$NADP^+$	Nicotina adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotina adenina dinucleótido fosfato reducido
$Na_2EDTA$	Acido etilendiamina tetra-acético
$Na_2EGTA$	Acido etilenglicol-bis-( $\beta$ -aminoetil eter)-N,N'-tetra-acético
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxikinasa
PFK	Fosfofructokinasa
PGI	Fosfoglucosa isomerasa

PGK	Fosfoglicerato kinasa
PGM	Fosfoenolpiruvato mutasa
PPi	Pirofosfato inorgánico
PK	Piruvato kinasa
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de acrilamida en presencia de SDS
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TAO	Oxidasa alternativa de <i>Trypanosoma</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
Val	Valina
$V_{\max}$	Velocidad máxima

## Resumen

*Trypanosoma cruzi* presenta tres isoenzimas de la fosfoglicerato kinasa (PGK) (E.C. 2.7.2.3). Estas tres isoenzimas están tanto en el glicosoma (PGK<sub>A</sub> y PGK<sub>C</sub>) como en el citosol (PGK<sub>B</sub>) de epimastigotes de *T. cruzi*. La isoenzima PGK<sub>B</sub>, fue purificada por precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular. Se alcanzó un factor de purificación de 640 veces. El pH óptimo determinado fue de 5,5 y la fuerza iónica de 0,116 M. Respecto a la caracterización cinética, posee un  $K_m$  de 0,625 mM y una  $V_{max}$  de 236,96 U/mg para el 3-fosfoglicerato, y de 99  $\mu$ M y 426,6 U/mg, para el ATP. La actividad de esta enzima no es afectada por la Turbecidina monofosfato, AMP ni PPI. La suramina inhibe la actividad de la PGK<sub>B</sub>, a través de un mecanismo mixto, con una  $K_{is}$  para el complejo Enzima-Inhibidor (EI) de 3,89  $\mu$ M, y de 218  $\mu$ M para el complejo Enzima-Sustrato-Inhibidor (ESI), con respecto al ATP. Para el 3PGA, el  $K_{ii}$  determinado fue de 17,21  $\mu$ M y el  $K_{is}$  de 9,19  $\mu$ M. El  $IC_{50}$  de la suramina sobre epimastigotes en medio de cultivo fue de 240  $\mu$ M. La secuencia de aminoácidos del sitio activo de la PGK<sub>B</sub> de *T. cruzi* fue comparada con las secuencias de las PGK de diversos organismos, observándose sólo un cambio en el aminoácido 308. Respecto a la estructura primaria existen mayores diferencias, presentando poca identidad

entre las secuencias de aminoácidos de estas proteínas, con un 45 % de identidad entre la PGK<sub>B</sub> de *T. cruzi* y la PGK humana. En vista de las diferencias cinéticas y de estructura primaria entre la enzima del parásito y la del hospedador vertebrado, la PGK<sub>B</sub> podría representar un potencial blanco terapéutico. Con respecto al papel fisiológico que estaría cumpliendo la isoenzima PGK<sub>B</sub>, podría inferirse, considerando sus bajos valores de K<sub>m</sub> con respecto a las otras PGK de Tripanosomátides, que esta isoenzima funciona en dirección gluconeogénica en lugar de glicolítica.

## Abstract

*Trypanosoma cruzi* presents three isoenzymes of the phosphoglycerate kinase (PGK) (E.C. 2.7.2.3). These three isoenzymes are both in the glycosome (PGK<sub>A</sub> and PGK<sub>C</sub>) and in the cytosol (PGK<sub>B</sub>) of epimastigotes of *T. cruzi*. The isoenzyme PGK<sub>B</sub>, was purified by rainfall by sulfate of ammonium, chromatography of ionic exchange and chromatography of molecular exclusion. There was reached a factor of purification of 640 times. The ideal certain pH performed 5,5 and the ionic force of 0,116 M. With regard to the kinetic characterization, it possesses a  $K_m$  from 0,625 mM and a  $V_{max}$  of 236,96 U/mg for 3-phosphoglycerate, and of 99  $\mu$ M and 426,6 U/mg, for the ATP. The activity of this enzyme is not affected for the Turbecidin monophosphate, neither AMP or PPI. The suramin disables the activity of the PGK<sub>B</sub>, across a mixed mechanism, with a  $K_{is}$  for the complex Enzyme - inhibitor (EI) of 3,89  $\mu$ M, and of 218  $\mu$ M for the complex Enzyme-Substrate-Inhibitor (ESI), with regard to the ATP. For 3PGA, the certain  $K_{ij}$  was of 17,21  $\mu$ M and the  $K_{is}$  of 9,19  $\mu$ M. The  $IC_{50}$  of the suramin on epimastigotes in the middle of culture was of 240  $\mu$ M. The sequence of amino acids of the active site of the PGK<sub>B</sub> of *T. cruzi* was compared with the sequences of the PGK of diverse organisms, a change being observed only in the amino acid 308. With regard to the primary structure major differences exist, presenting low identity

between the sequences of amino acids of these proteins, with 45 % of identity between the PGK<sub>B</sub> of *T. cruzi* and the PGK humans. In view of the kinetic differences and the primary structure between the enzyme of the parasite and that of the host vertebrate, the PGK<sub>B</sub> might represent a potential therapeutic target. With regard to the physiological role that would be fulfilling the isoenzyme PGK<sub>B</sub>, it might be inferred, considering his low values of K<sub>m</sub> with regard to other PGK of Tripanosomatides, which it is isoenzyme works in gluconeogenic direction instead of glycolytic.

## Índice general

	Pág.
<i>Trypanosoma cruzi</i>	1
Clasificación taxonómica	1
Características	1
Ciclo de vida	6
La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis Americana	9
Tratamientos	10
Búsqueda de nuevos tratamientos	12
Metabolismo energético de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
Glicosoma y glicólisis	13
Metabolismo intermediario	15
Fosfoglicerato kinasa	23
Fosfoglicerato kinasa B (PGK <sub>B</sub> ) de <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
Criterios para determinar blancos terapéuticos y utilidad de drogas	31
Hipótesis	34
Objetivos	35
Metodología	36
Material biológico	36

Fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial	36
Determinación de proteínas mediante el método de Lowry	37
Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	38
Esquema general de la purificación	39
Determinación de la actividad enzimática	41
Estudios cinéticos	41
Determinación de pH óptimo	42
Determinación de fuerza iónica óptima	43
Inhibición de la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> por el efecto de la suramina	43
Análisis de parámetros cinéticos	44
Resultados	46
Análisis estructural de la PGK de varios organismos	46
Purificación	47
Determinación de algunos parámetros físico químicos que afectan la actividad de la isoenzima PGK <sub>B</sub>	51
Caracterización cinética	56
Cinética de inhibición	57
Discusión	62
Purificación	62
Características físico químicas	64
Parámetros cinéticos y análisis comparativo	65
Cinética de inhibición	69

Conclusiones	73
Referencias	75

## Índice de figuras

	Pág.
Modelo esquemático de epimastigote de <i>T. cruzi</i>	6
Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas	10
Estructura del nifurtimox y benznidazole	12
Modelo metabólico para la forma sanguínea de <i>Trypanosoma brucei</i>	17
Modelo metabólico para la forma procíclica de <i>Trypanosoma brucei</i>	21
Modelo del metabolismo energético de <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
Esquema de reacción catalizada por la PGK	24
Estructura del complejo ternario ADP/ATP Mg <sup>+2</sup> , 3PGA/1,3BPGA y PGK	26
Gel de purificación	48
Papel metabólico de la PGKB en el <i>T. cruzi</i>	48

## Índice de Tablas y graficas

	Pág.
$K_m$ determinadas de la PGK, para ambos sustratos, de varios organismos	28
Porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos de PGK en tripanosomátides, levadura y humana	47
Tabla de purificación	49
Perfil de elusión de la DEAE celulosa	50
Perfil de elusión de la Sephacryl S-200	51
Variación de la actividad enzimática con respecto a la cantidad de enzima	52
Determinación de la fuerza iónica óptima	53
Determinación del pH óptimo de la isoenzima PGK <sub>B</sub> de <i>T. cruzi</i>	54
Residuos de aminoácidos presentes en el sitio activo de la PGK de varios organismos	55
Determinación de las constantes cinéticas de la PGK <sub>B</sub> , para el ATP	56
Determinación de las constantes cinéticas de la PGK <sub>B</sub> , para el 3PGA	57
Determinación de la constante de inhibición, de la suramina, con respecto al ATP	58
Determinación de la constante de inhibición de la suramina, con respecto el 3PGA	59
Efecto de la suramina sobre el crecimiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	60

## ***Trypanosoma cruzi***

### **Clasificación taxonómica**

*T. cruzi* (Chagas 1909), es un parásito protozoario, agente etiológico de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana. Pertenece al grupo Euglenozoa, orden Kinetoplastida, suborden Trypanosomatina, Familia Trypanosomatidae, y subgénero Schizotrypanum (Maslov *et al.*, 1995)

### **Características**

*Trypanosoma cruzi*, como todos los Kinetoplastidae, presenta una serie de características que lo diferencian de otros organismos eucariotas. Entre las características más resaltantes están: la presencia de un ADN mitocondrial densamente empaquetado denominado kinetoplasto, los glicosomas (organelas similares a peroxisomas), un mecanismo de procesamiento de ARN conocido como trans-splicing, organelas como acidocalcisomas y reservosomas, entre otras (De Souza, 2002).

Estos parásitos presentan una estructura única entre los protozoarios: un citoesqueleto interno formado por polímeros de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, que se extiende por toda la membrana, excepto en la parte posterior del parásito,

donde se ubica el bolsillo flagelar y se llevan a cabo los eventos de endocitosis y exocitosis. La asociación del citoesqueleto con la membrana proporciona rigidez, manteniendo la forma de la célula, controla el movimiento de las macromoléculas intermembranales y de las estructuras intracelulares (De Souza, 2002; Cevallos *et al.*, 2003).

Asociado a la membrana se encuentra un flagelo que emerge de una invaginación denominada el bolsillo flagelar (De Souza, 2002). El flagelo de *T. cruzi* presenta una estructura básica, mostrando un patrón de los microtubulos del axonema de 9+2. El reservorio alrededor de la base del flagelo ha sido considerado como un sitio de secreción y/o excreción (De Souza, 2002). El movimiento del flagelo se propaga a lo largo del cuerpo celular, llevando a la impresión visual de ondulación de la membrana. La naturaleza de la conexión entre el flagelo y el cuerpo celular es incierta, sin embargo, Vickman (citado por De Souza, 2002) observó que los tripanosomas al dividirse en sangre con citrato producen en la célula hija un flagelo completamente libre, mientras que en las células paternas el flagelo permanece unido, sugiriendo que los iones  $\text{Ca}^{2+}$  quelados por el citrato son necesarios para la adhesión y desarrollo del flagelo, mas no para el mantenimiento de la unión. Este efecto ha sido reportado para la suramina, la cual inhibe ATPasas y es antagonista de los purinoreceptores P2 (Pubill *et al.*, 2001, Bisaggio *et al.*, 2006). La activación de estos purinoreceptores

causa una afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  que produce varios cambios en la actina del citoesqueleto y/o en las proteínas enlazadoras de actina. Dicha modificación en la distribución de los componentes de la superficie celular altera la adhesión del flagelo al cuerpo celular y también la motilidad celular (Bisaggio *et al.*, 2006).

Otra de las características resaltantes de *T. cruzi*, y otros miembros de la familia Trypanosomatidae, es que poseen un único mitocondrion (mitocondria ramificada) que se extiende a lo largo del cuerpo celular. En la matriz mitocondrial se encuentra un complejo arreglo de fibras de ADN que forman el kinetoplasto, que equivale entre el 20 y 25 % del ADN total del parásito (De Souza, 2002). El kinetoplasto está conformado por moléculas circulares llamadas minicírculos, que miden entre 100 y 2500 pb y cuyo número puede variar entre 5000 y 10000 moléculas por célula, y los maxicírculos con una longitud de 30 a 50 Kb y aproximadamente 50 moléculas por célula. Los minicírculos codifican pequeños ARN guías que intervienen en la edición de los ARN mensajeros mitocondriales, mientras que los maxicírculos equivalen al ADN mitocondrial de los otros eucariotes que codifica proteínas, ARN ribosomales y ARN de transferencia mitocondriales (Cevallos *et al.*, 2003). Estudios bioquímicos indican la existencia de ciertas proteínas como la topoisomerasa tipo II, la ADN polimerasa P (encargada de reparar daños en el ADN), proteínas

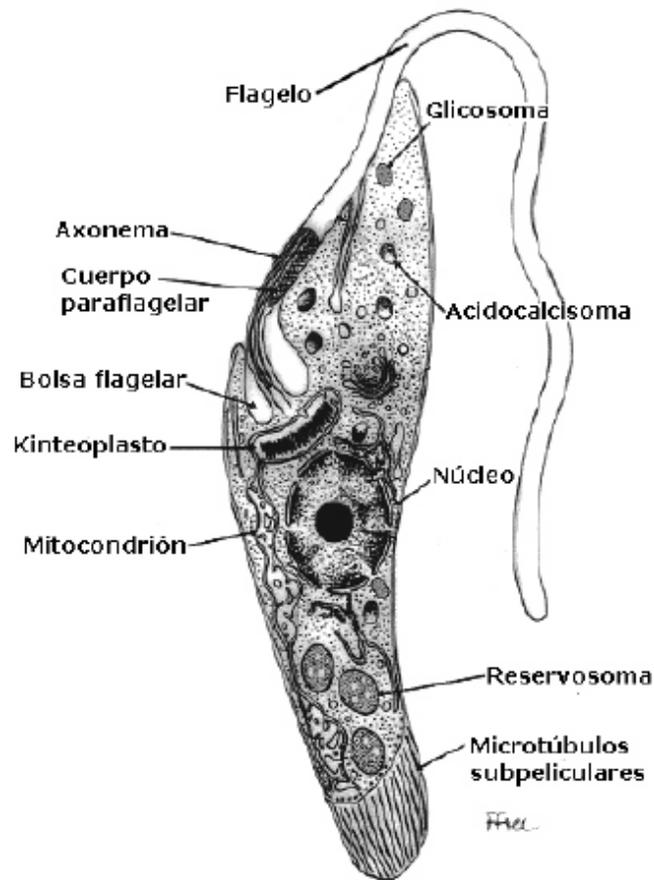
condensadoras del ADN del kinetoplasto, proteínas mitocondriales de choque térmico asociadas al kinetoplasto de *T. cruzi* (De Souza, 2002).

En los tripanosomátidos se han descrito las tres ADN polimerasas existentes en el resto de los eucariotas, sin embargo, no se conocen las secuencias promotoras para la ARN polimerasa II. Los genes nucleares se transcriben de forma policistrónica y luego los ARNs mensajeros son procesados para generar moléculas monocistrónicas. El procesamiento ocurre por trans-splicing, donde un ARN no codificante llamado spliced leader (SL-ARN) que tiene una estructura CAP en su extremo 5' es donado o transferido al extremo 5' del ARN mensajero inmaduro mediante la participación del spliciosoma. Simultáneamente es añadida la cola poli-A al extremo 3', de esta manera se genera un ARNm maduro (Das *et al.*, 2004).

Los acidocalcisomas, son organelas electro densas y cuyo interior es ácido, tienen un diámetro de aproximadamente  $200 \pm 90$  nm y almacenan grandes cantidades de calcio, magnesio, polifosfatos y principalmente pirofosfato (PPi), el cual al hidrolizarse provee la energía a pasos metabólicos como el catalizado por la piruvato fosfato dikinasa en el glicosoma, y una pirofosfatasa traslocadora de protones a nivel del acidocalcisoma. Por otra parte el calcio está involucrado en varios procesos, como por ejemplo la invasión de células del hospedador, entre otras. En amastigotes de *T. cruzi* se encontró que los acidocalcisomas están

localizados próximos a la membrana celular y en tripomastigotes cerca al flagelo (Zhong *et al.*, 1998), esta organización sugiere alguna interacción con componentes del citoesqueleto y también está relacionada con la adaptación a condiciones de estrés (Docampo *et al.*, 2001).

Los reservosomas son otras organelas, que aparentemente corresponden a vesículas pre-lisosomales donde se almacenan proteínas endocitadas y además contienen la cruzipaina (una cisteín-proteasa). Estas proteínas degradadas, son empleadas por el parásito para la obtención de energía a través de la oxidación de aminoácidos (Docampo, 2001; Soares, 1999).



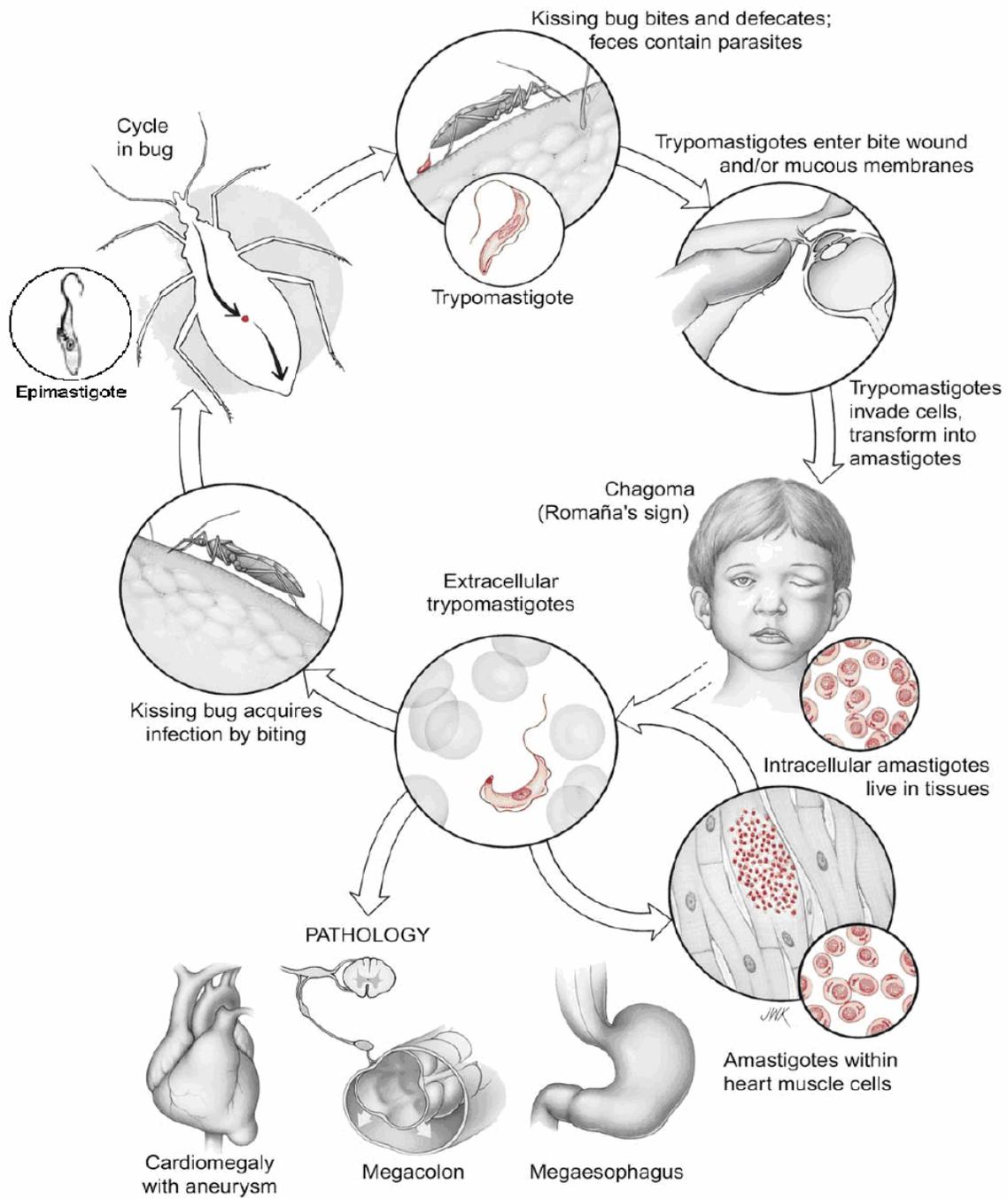
**Figura 1.** Modelo esquemático de un epimastigote de *T. cruzi*.

### **Ciclo de vida**

El ciclo biológico comienza cuando el vector de la familia de los redúvidos, como *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* o *Panstrongylus megistus* infectado, se alimenta del hospedador vertebrado y defeca, depositando adyacente al lugar de la picada los tripomastigotes metacíclicos

(la forma infectiva). La secreción salival del insecto induce picazón, provocando que la víctima se frote las heces cargadas de parásitos, facilitando su entrada por la herida ocasionada (Baron, 1996). Inmediatamente después de entrar al hospedador los tripomastigotes son capaces de infectar gran variedad de células, incluyendo células gliales en el sistema nervioso central, músculo cardíaco, en el intestino, el tracto urogenital y el sistema de retículo endotelial (Burleigh *et al.*, 1995). El parásito invade la célula, transformándose en amastigote en el citosol, que es la forma replicativa en el vertebrado (Ortega, 1992). Estos amastigotes sufren un proceso de fisión binaria cada 12 horas, justo antes de ocurrir la lisis de la célula infectada los parásitos pasan a su forma tripomastigote sanguínea, y son liberados en el torrente sanguíneo y distribuidos por todo el cuerpo, expandiendo la infección. También pueden ser ingeridos por el vector, transformándose a epimastigotes, los cuales se mantienen en el intestino medio del insecto replicándose activamente (Sher *et al.*, 1985). Después de 8 o 10 días los parásitos se diferencian a tripomastigotes metacíclicos y migran a la ampolla rectal del insecto, donde posteriormente son excretados en las heces y orina, comúnmente al tomar otra ingesta de sangre (De Souza, 2002).

# *Trypanosoma cruzi*



"Parasitic Diseases" 4th Ed. © Apple Trees Productions, LLC., Pub. P.O. Box 260, New York, NY 10032

**Figura 2.** Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

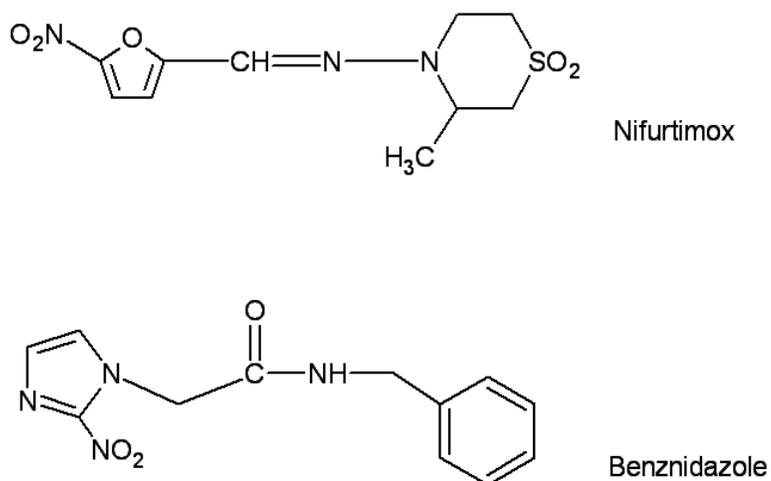
## **La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana**

Esta enfermedad es una de las principales causas de cardiomiopatía en Latinoamérica, se distribuye desde el norte de México hasta Argentina, aunque se han diagnosticado casos en Estados Unidos (Schiffier, 1984; Woody, 1955). Se estima que hay 15 millones de personas infectadas y otras 28 millones se encuentran bajo riesgo de infección, según el informe de la Organización mundial de la salud en 2006, ocasionando anualmente 41200 nuevos casos y unas 12500 muertes (W.H.O. 2007). En contraste con la mayor parte de Sudamérica, la tasa de incidencia en Chile y Uruguay actualmente está por debajo del 1 % en niños con edades menores a 10 años, y la transmisión esencialmente fue eliminada en estos países, mediante el control del vector transmisor (Reiche *et al.*, 1996).

La primera fase de la enfermedad, conocida como fase aguda, generalmente se manifiesta con una inflamación de la piel en el lugar de entrada del parásito, presentándose de 6 a 10 días después de la infección y generalmente viene acompañada de una inflamación de los nódulos linfáticos, adenopatía que puede persistir durante uno o dos meses. Puede presentarse fiebre, edema generalizado, hepatoesplenomegalia moderada, miocarditis (con o sin crecimiento del corazón) e incluso puede producirse meningoencefalitis. Luego de la fase aguda viene un periodo asintomático o



1960, en la actualidad está discontinuado, actúa principalmente sobre tripomastigotes circulantes (sanguíneos) y es mejor tolerada por pacientes jóvenes; disminuye hasta en un 62 % la prevalencia de alteraciones cardíacas en niños en la fase crónica temprana de la enfermedad, su mecanismo de acción es por la vía de la reducción del grupo nitro de la molécula a radicales nitroaniónicos, que a su vez reaccionan con el oxígeno molecular para generar anión superóxido y peróxido de hidrógeno, metabolitos altamente tóxicos. Se ha reportado que *T. cruzi* es deficiente en algunos de los mecanismos de detoxificación de metabolitos de oxígeno, particularmente el peróxido de hidrógeno, y es por ende más susceptible al stress oxidativo que las células de vertebrados (Docampo, 1990). El benznidazol aparentemente actúa por una vía diferente, producto de la reacción de sus derivados nitroreducidos con macromoléculas como ADN, ARN, proteínas y posiblemente lípidos insaturados (Docampo, 1990). En todo caso ambos medicamentos inducen graves efectos secundarios y no son completamente efectivos durante la fase aguda, mientras que carecen de utilidad en la fase crónica, por lo que continúa la necesidad de buscar nuevos tratamientos más eficaces y menos nocivos contra esta parasitemia (Barret *et al.*, 2003).



**Figura 4.** Estructura del nifurtimox y el benznidazole.

### **Búsqueda de nuevos tratamientos**

El control de la tripanosomiasis comenzó a principio del siglo veinte, cuando el agente infeccioso y los vectores fueron identificados en África y Latinoamérica. En ambos continentes, el tratamiento farmacológico presenta muchas dificultades, por los efectos secundarios y la baja eficacia, dificultades que permanecen hoy en día (Schofield *et al.* 2000). A pesar del amplio conocimiento del parásito obtenido en las últimas décadas, no se ha logrado cristalizar este conocimiento en una cura a esta parasitemia. Es necesario un enfoque racional que partiendo de las diferencias encontradas entre el parásito y el hospedador vertebrado sea capaz de hallar posibles blancos quimioterapéuticos eficaces que afecten al parásito con un mínimo

de efectos secundarios para el hospedador, en lugar de probar indiscriminadamente compuestos diversos con la esperanza de hallar una cura milagrosa. A fin de comprender más en profundidad algunos aspectos de *T. cruzi* con potencial aplicación terapéutica, a continuación examinaremos más atentamente algunas de sus particularidades metabólicas.

### **Metabolismo energético de *Trypanosoma cruzi***

#### **Glicosoma y glicólisis**

Los glicosomas son organelas similares a peroxisomas en varios aspectos, como la maquinaria de importación de proteínas, procesos de biogénesis y presencia de ciertas rutas metabólicas como la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y la biosíntesis de esteroides. Estudios de estas organelas muestran que son de tamaño homogéneo con un diámetro promedio de 0,27  $\mu\text{m}$ , presentan una matriz electrón densa con un centro cristalino que refleja una alta densidad de proteínas. La organela está limitada por una membrana de 6 a 7 nm de espesor y sedimenta a una densidad de 1,23  $\text{g/cm}^3$  en un gradiente de sacarosa, hecho que ha permitido su purificación en diversas especies de tripanosomátides (Opperdoes, 1987; Quiñones *et al.*, 2004).

El glicosoma contiene varias vías metabólicas esenciales, incluyendo las seis o siete primeras enzimas de la vía glicolítica (Embden Meyerhof), la vía de las pentosas fosfato, biosíntesis de éter lípidos, y captación de purinas, que no son sintetizadas por los tripanosomátides. La presencia de estas vías anabólicas y catabólicas en una organela, sumado a que se considera que la membrana del glicosoma es poco permeable a la mayoría de los intermediarios glicolíticos, como adenin nucleótidos y nicotin adenin nucleótidos, como el ATP y el NADH, sugiere que en ellas debe mantenerse el balance energético (ATP/ADP) y el balance redox ( $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ) (Opperdoes *et al.*, 1987; Hannaert *et al.*, 2003; Michels *et al.*, 2000).

Las enzimas que se encuentran en esta organela son sintetizadas en el citosol sobre polisomas libres e importadas a los glicosomas. Estas proteínas presentan secuencias de importación a peroxisomas tipo PTS1 o PTS2, y son translocadas a través de complejos membranales formados por proteínas peroxinas (PEX). La eliminación de esta maquinaria de importación de proteínas ha demostrado ser letal para *T. brucei*, lo que indica que la compartimentalización en el glicosoma es esencial para la supervivencia del parásito (Guerra-Giraldez *et al.*, 2002).

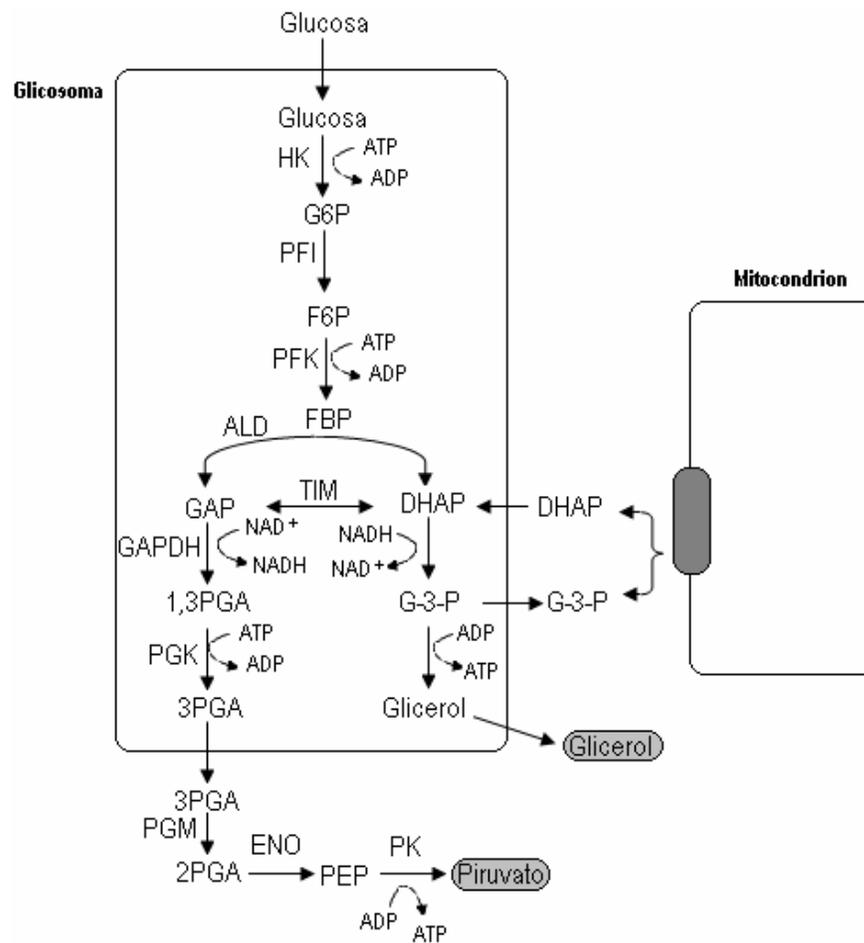
La parte de la glicólisis que se encuentra compartimentalizada en esta organela, comprende: hexokinasa (HK), fosfoglucosa isomerasa (PGI), fosfofrutokinasa (PFK), aldolasa (ALD), triosa fosfato isomerasa (TIM),

gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), y fosfoglicerato kinasa (PGK), mientras que las tres restantes, la fosfoglicerato mutasa (PGM), la enolasa (ENO) y la piruvato kinasa (PK) están en el citosol. La HK y la PFK no están reguladas por su producto, a diferencia de sus homólogas en mamíferos y la transición de condiciones aeróbicas a anaeróbicas no desencadena el aumento del consumo de glucosa conocido como Efecto Pasteur (Urbina, 1994; Cazzulo, 1992; Cazzulo *et al.*, 1985; Engel *et al.*, 1987; Tielens *et al.*, 1998; Opperdoes, 1987).

### **Metabolismo intermediario.**

De los organismos pertenecientes a esta familia, probablemente los tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma brucei* son los que poseen el metabolismo más sencillo, obteniendo toda su energía a través de la glicólisis, ya que su única fuente de carbono es la glucosa presente en la sangre del hospedador vertebrado, no poseen ciclo de Krebs activo. En esta forma, la glicólisis está compartamentalizada hasta la PGK (figura 5). El ATP consumido por la hexokinasa y la fosfofructokinasa es regenerado por la PGK, manteniéndose el balance de ATP/ADP dentro del glicosoma (Hannaert *et al.*, 2003; Michels *et al.*, 2000, Bakker *et al.*, 1997). El NAD<sup>+</sup> reducido por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa es reoxidado en un

sistema lanzadera de DHAP y G3P entre la mitocondria y el glicosoma, los electrones son transferidos al oxígeno en la mitocondria, a través de la ubiquinona y una oxidasa terminal denominada oxidasa alternativa de *Trypanosoma* (TAO). En condiciones de anaerobiosis, cuando la TAO no puede funcionar, se acumula G3P en el glicosoma y se produce glicerol y ATP, a través de la glicerol kinasa, manteniéndose el balance energético dentro de la organela (Verlinde *et al.*, 2001; Michels *et al.*, 2000 y Parsons, 2004). A su vez, se obtiene un mol de ATP en el citosol por cada mol de glucosa, a través de la reacción catalizada por la piruvato kinasa, excretándose el piruvato y el glicerol al medio bajo condiciones de anaerobiosis (Hannaert *et al.*, 2003; Michels *et al.*, 2000, Bakker *et al.*, 1997; Tielens y Van Hellemond, 1998; Verlinde *et al.*, 2001).



**Figura 5.** Modelo metabólico para la forma sanguínea de *T. brucei*.

En los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei* la PGK se encuentra fuera del glicosoma, por lo tanto, el balance de ATP/ADP no es mantenido por esta enzima. Se ha propuesto que el PEP, producido por la enolasa en el citosol entra al glicosoma, donde es convertido en oxalacetato por la PEPCK o en piruvato por la PPDK. Ambas reacciones producen ATP, reestableciendo el balance energético si se considera que todo el PEP producido entra (Acosta *et al.*, 2004). El balance de NAD<sup>+</sup>/NADH puede ser

reestablecido de diversas formas: por la misma vía que en los tripomastigotes sanguíneos o a través de la malato deshidrogenasa glicosomal, que cataliza la reducción dependiente de NADH del oxaloacetato a malato. El malato puede salir del glicosoma, ser convertido a piruvato por la enzima málica en el citosol y ser oxidado en la mitocondria para producir acetil-CoA (Hannaert *et al.*, 2003; Besteiro *et al.*, 2005; Coustou *et al.*, 2003; Bringaud *et al.*, 2006). Asimismo, en el glicosoma, el malato puede ser convertido en fumarato por la fumarasa y ser a su vez reducido a succinato por una fumarato reductasa glicosomal dependiente de NADH, lo que explicaría la excreción de succinato por parte de la mayoría de los tripanosomátides, como producto final de la glicólisis (Besteiro *et al.*, 2005). Este planteamiento permite considerar el escenario donde no todo el PEP entra al glicosoma, ya que la fumarato reductasa ayudaría al mantenimiento del balance redox. Sin embargo, este modelo no considera que en el glicosoma existen otras rutas además de la glicólisis. Por ejemplo, la ruta de las pentosas fosfato, la biosíntesis de ergosterol y nucleótidos que también requieren ATP y no habría producción de ATP en el citosol por la piruvato kinasa (Coustou *et al.*, 2003). Parte de los problemas relacionados con el balance energético dentro del glicosoma, se resuelven si se considera que los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei* y por lo menos los epimastigotes de *T. cruzi*, expresan isoenzimas de la PGK. Este último parásito presenta

tres isoenzimas, la PGK<sub>B</sub> que se encuentra en el citosol, según mediciones *in vitro*, contribuye con la mayor parte de la actividad PGK en estos parásitos, la PGK<sub>A</sub> y PGK<sub>C</sub> son glicosomales (Concepción *et al.*, 2001; Hannaert *et al.*, 2003). La presencia de estas tres isoenzimas permitiría que el balance energético se mantenga en el glicosoma, sin necesidad de que todo el PEP deba entrar, con la producción neta de una molécula de ATP dentro del glicosoma (Besteiro *et al.*, 2005; Bringaud *et al.*, 1998).

La mayoría de los estudios realizados en *T. cruzi*, han sido con la forma epimastigote, ya que éstos son fácilmente cultivados en medios axénicos (Engel *et al.*, 1987) y constituyen un modelo para el estudio del metabolismo de *T. cruzi* y de los tripanosomátides en general (Figura 7) (Cazzulo *et al.*, 1985; Engel *et al.*, 1987). Las principales formas de *T. cruzi* poseen un catabolismo de glucosa similar al de los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei* (Cazzulo, 1992), degradando la glucosa parcialmente, aún en condiciones de aerobiosis, por lo que este proceso se ha denominado “fermentación aeróbica”. Parte del carbono proveniente de la glucosa es excretado al medio como distintos catabolitos parcialmente oxidados, principalmente succinato, acetato y L-alanina, aunque se han detectado otros productos, en menor cantidad como piruvato, lactato y malato (Cazzulo *et al.*, 1985; Engel *et al.*, 1987; Cazzulo, 1992). El hecho que estos parásitos excreten productos parcialmente oxidados, podría deberse a la alta velocidad

de producción de los metabolitos provenientes principalmente de una glicólisis poco regulada (Urbina, 1994, Cazzulo, 1992). La presencia de una fermentación aeróbica cuestiona el funcionamiento del ciclo de Krebs y de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria de los tripanosomátides. Sin embargo, todos estos parásitos, a excepción de la forma sanguínea de *T. brucei*, poseen todas las enzimas del ciclo de Krebs, una cadena transportadora de electrones con una NADH deshidrogenasa mitocondrial, punto usual de entrada de los electrones (Urbina, 1994) y una ATPasa para la producción de energía (Tielens y Van Hellemond, 1998).

En la mitocondria, los metabolitos derivados de la degradación de aminoácidos son intermediarios del ciclo de Krebs, que podrían alimentar otras rutas metabólicas como la gluconeogénesis y otras rutas de síntesis (Figura 6) (Van Weelden *et al.*, 2005).

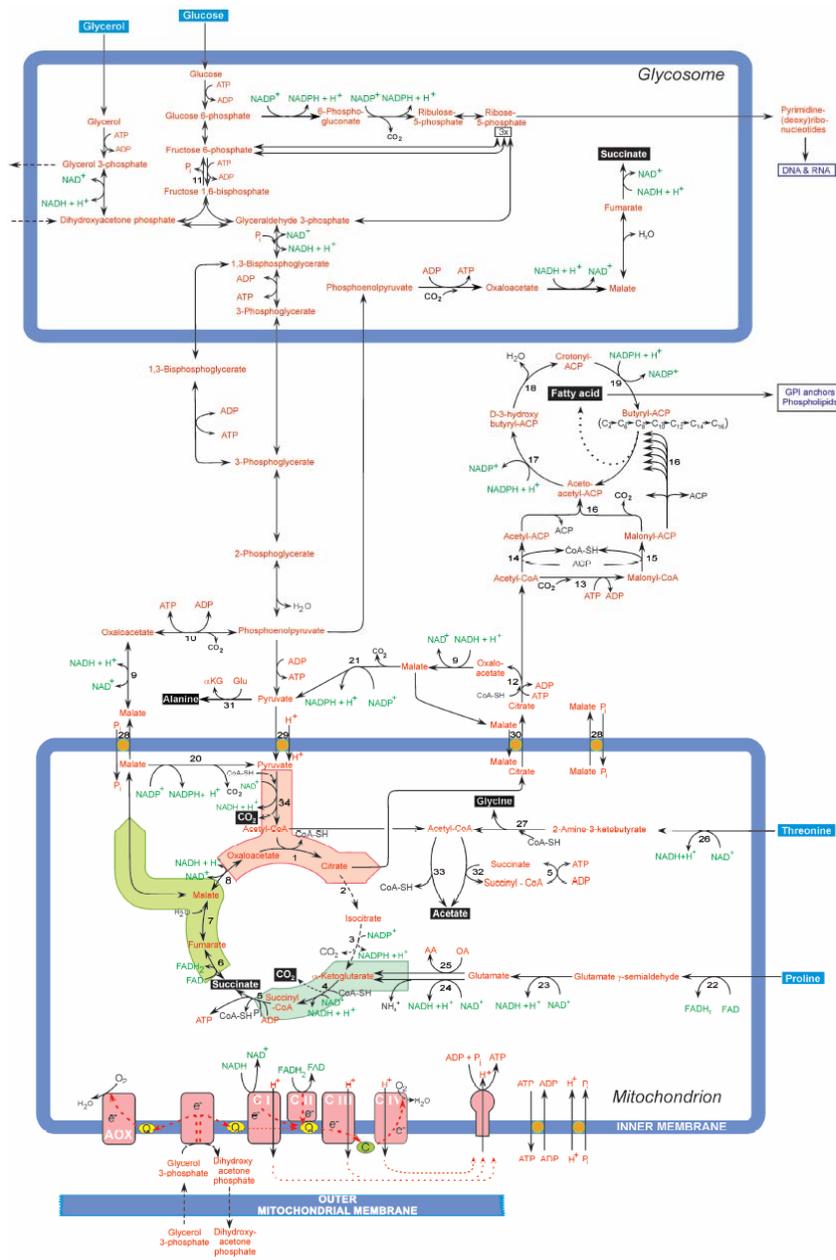


Figura 6. Modelo metabólico para la forma procíclica de *T. brucei*. (Figura tomada de Van Weelden et al., 2005)

No se ha comprobado la existencia de una ruta gluconeogénica en estos organismos, por lo que su existencia sigue siendo motivo de debate, ya

que en estos se considera que no hay carbohidratos de reserva, excepto en *Leishmania*, donde se ha encontrado un polisacárido de manosa (Blum, 1993). No obstante, las células son capaces de crecer en medios pobres en glucosa, y siguen creciendo cuando la glucosa del medio se ha agotado (Urbina, 1994). Aunque las actividades de las enzimas de la ruta gluconeogénica, fructosa bisfosfatasa y glucosa 6-fosfatasa no han sido detectadas, recientemente se ha reportado (Cronín *et al.*, 1989) la existencia de genes putativos para estas enzimas (Michels *et al.*, 2000; Hannaert *et al.*, 2003; Urbina 1994; Besteiro *et al.*, 2005). Entre las enzimas conocidas que podrían desempeñar un papel relevante en el control de la gluconeogénesis se encuentra la PGK<sub>B</sub> debido a diversos motivos, por lo que en la próxima sección serán analizadas en profundidad algunas de sus características y su papel potencial en el metabolismo de *T. cruzi*.

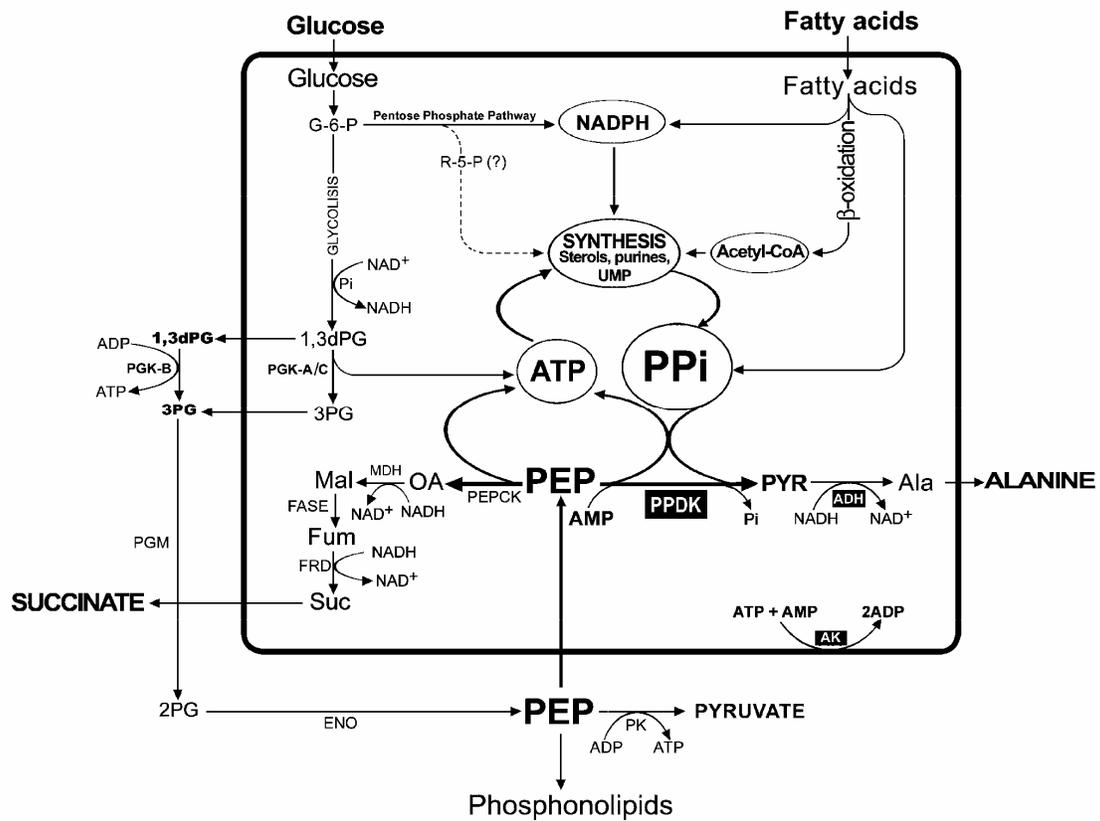
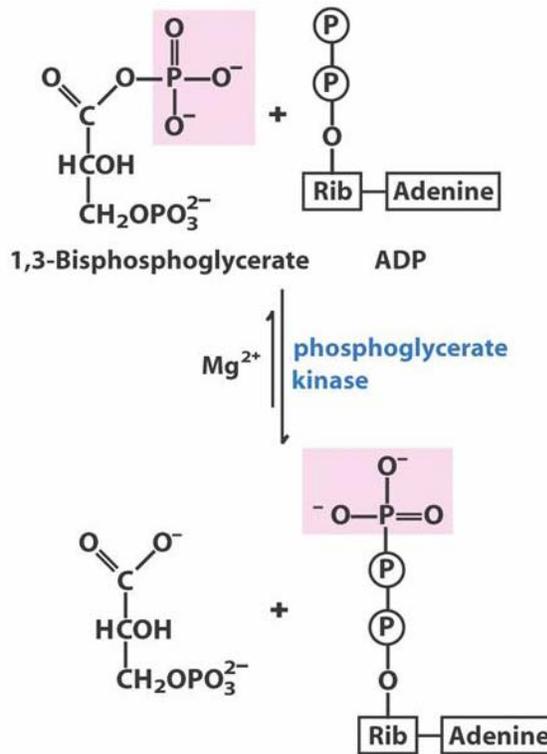


Figura 7. Modelo del metabolismo energético de *Trypanosoma cruzi*.

(Acosta *et al.*, 2004)

### Fosfoglicerato Kinasa (PGK)

La fosfoglicerato kinasa (E.C. 2.7.2.3) es una enzima glicolítica que cataliza la transferencia de un grupo fosfato del 1,3-bisfosfoglicerato (1,3BPG) al ADP, formando ATP y 3-fosfoglicerato (3PGA), usando  $Mg^{+2}$  como cofactor (figura 8) (Bernstein *et al.*, 1997; Verlinde *et al.*, 2001).



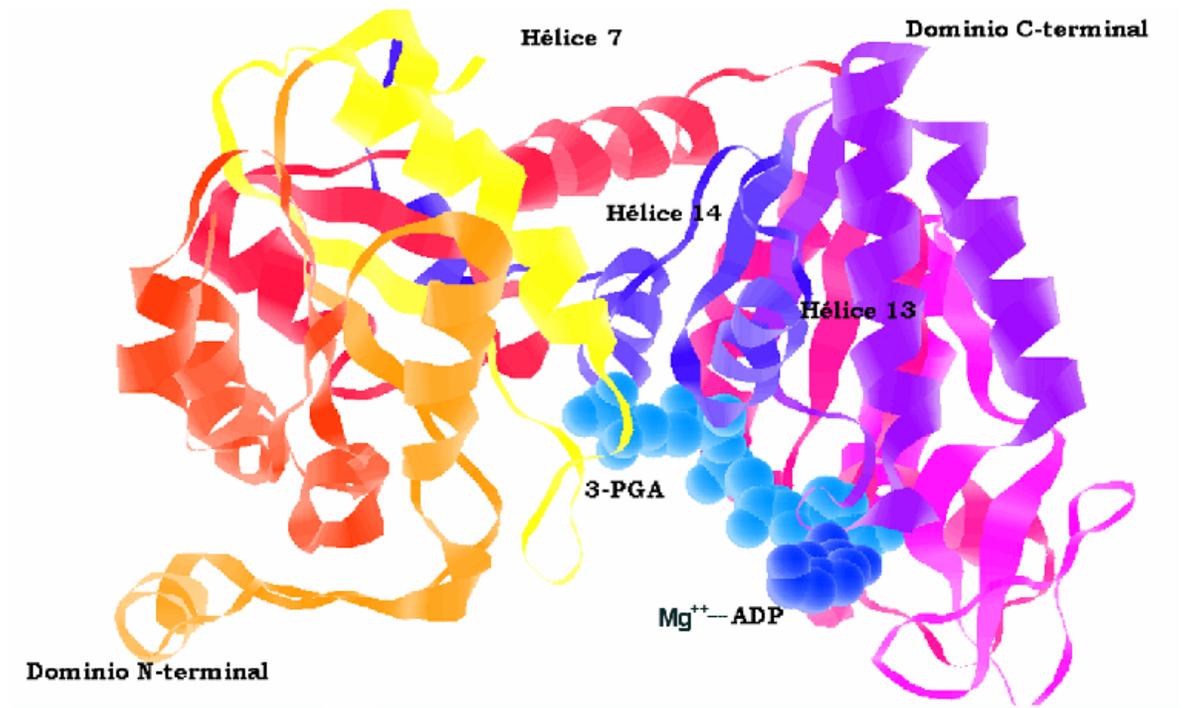
**Figura 8.** Esquema de reacción catalizada por la PGK.

Esta enzima tiene un papel importante en la ruta glicolítica como enzima clave en la generación de ATP (Alexander *et al.*, 1993; Pal *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 1972). La fosfoglicerato kinasa se encuentra ampliamente distribuida entre los organismos, cumpliendo principalmente la función glicolítica, aunque también se ha encontrado en plastidios de algas donde participa en el ciclo de Calvin (Hannaert *et al.*, 2003). Se han reportado fosfoglicerato kinasas con masas moleculares para la subunidad de entre 30 y 60 kDa (Concepción *et al.*, 2001; Parsons *et al.*, 2004; Szilágyi, *et al.*, 2001; Yoshida y Watanabe, 1972), siendo por lo general monoméricas,

excepto en las archaeas extremófilas *Pyrococcus woesei* y *Sulfolobus solfataricus*, en las que se ha identificado la PGK como dimérica y tetramérica, respectivamente (Bentahir *et al.*, 2000). Se han resuelto varias estructuras tridimensionales de PGK por cristalografía de rayos X, entre ellas, la de músculo de caballo, levadura, músculo de cerdo, *Plasmodium falciparum*, *Bacillus stearothermophilus*, *Thermotoga maritima* y *Trypanosoma brucei* (Bentahir *et al.*, 2000; Pal *et al.*, 2004) lo cual ha facilitado la comprensión de los mecanismos de acción de esta enzima.

El análisis cristalográfico del complejo ternario (PGK-ADP-Mg-3PGA) figura 9, de la PGK<sub>C</sub> de *T. brucei*, mostró que esta enzima está compuesta por 2 dominios, uno N-terminal y uno C-terminal, similares en tamaño y que están conectados por una región “bisagra” muy conservada (Bentahir *et al.*, 2000; Szilágyi, *et al.*, 2001; Verlinde *et al.*, 2001). El dominio N-terminal se extiende entre los residuos 5 a 194 y 411 a 419, mientras que el dominio C-terminal está formado por los residuos 211 y 394, ambos unidos por la región bisagra, formada por los residuos 195 a 210 y 395 a 410 (Bernstein *et al.*, 1997). Los sustratos 3-fosfoglicerato (3PGA) o 1,3-bisfosfoglicerato (1,3BPG) se unen al dominio N-terminal, mientras el complejo Mg-ATP o Mg-ADP se une al dominio C-terminal de la enzima (Bentahir *et al.*, 2000; Bernstein *et al.*, 1997; Verlinde *et al.*, 2001). La PGK sufre un cambio conformacional que acerca espacialmente ambos dominios, la unión del 3PGA provoca el primer

movimiento, finalizando con la unión del Mg-ATP, para dar la conformación catalítica del sitio activo. Las hélices 7, 13 y 14, comprendidas entre los residuos 191-205, 376-385 y 397-404, respectivamente, son las implicadas en dicho movimiento.



**Figura 9.** Estructura del complejo ternario ADP/ATP  $Mg^{+2}$ , 3PGA/1,3BFGA y PGK.

Los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* tiene isoenzimas PGK, tanto en el glicosoma (PGK<sub>A</sub> y PGK<sub>C</sub>), como en el citosol (PGK<sub>B</sub>). La PGK<sub>C</sub> presenta una secuencia señal de importación al glicosoma conformada por un hexapéptido (NRWSSL) en la extensión de 20 aminoácidos del extremo C-terminal, por su parte, la PGK<sub>A</sub> presenta una inserción de 80 aminoácidos

en el medio del N-terminal, y no posee secuencias señal tipo I o tipo II para la importación de proteínas, presumiéndose que en los primeros 91 aminoácidos del dominio N-terminal se encuentra la información topogénica (Peterson *et al.*, 1997). En tripanosomátides, están codificadas por genes diferentes arreglados en tándem en el genoma (Adjé *et al.*, 1997; Blattner *et al.*, 1998; Concepción *et al.*, 2001; Opperdoes y Michels, 2001; Zomer *et al.*, 1998). Esta organización es similar a la observada previamente en *T. brucei*, *T. congolense* y *C. fasciculata* (Concepción *et al.* 2001). Las PGK<sub>S</sub> presentan características cinéticas y estructurales representativas, que difieren incluso en las isoformas encontradas en un mismo tripanosomatide. En la tabla 1 se presentan algunas constantes cinéticas. Los parámetros cinéticos fueron determinados en dirección gluconeogénica ya que el 1,3-bisfosfoglicerato es una molécula muy inestable.

Fuente	K <sub>m</sub> <sub>ATP</sub> (mM)	K <sub>m</sub> <sub>3PGA</sub> (mM)	Referencia
<i>T. brucei</i> PGKb (n)	0,46	2,04	(Misset y Opperdoes, 1987)
<i>T. brucei</i> PGKb (r)	0,21	1,25	(Zomer col., 1998)
<i>T. brucei</i> PGKc (n)	0,28	1,62	(Misset y Opperdoes, 1987)
<i>T. brucei</i> PGKc (r)	0,29	2,02	(Zomer col., 1998)
<i>T. brucei</i> PGKa (r)	0,12	2,4	(Alexander y Parson 1993)
Humana	0,37	1,1	(Yoshida y Watanabe, 1972)
Levadura	0,19	0,6	(Misset y Opperdoes, 1987)
Músculo de conejo	0,46	0,62	(Misset y Opperdoes, 1987)
<i>P. falciparum</i> (n)	0,45	1,18	(Pal y col., 2004)
<i>P. falciparum</i> (r)	0,63	0,52	(Pal y col., 2004)
<i>Spirulina platensis</i>	0,44	2,33	(Misset y Opperdoes, 1987)

(n) enzima natural, (r) enzima recombinante.

**Tabla 1.** K<sub>m</sub> para el ATP y el 3PGA de la PGK, en diversos organismos.

**Fosfoglicerato Kinasa B (PGK<sub>B</sub>) de *Trypanosoma cruzi*.**

En *Trypanosoma cruzi* aproximadamente el 80 % de la actividad PGK se halla en el citosol, y se atribuye a una isoenzima de 45 kDa (PGK<sub>B</sub>). El 20% restante se encuentra en los glicosomas, y se debe a la actividad de la PGK<sub>A</sub> y la PGK<sub>C</sub> (Concepción *et al.*, 2001). La oxidación de la glucosa a

piruvato involucra a la PGK<sub>C</sub> y al metabolismo anaplerótico vía PEPCK y MDH, mientras que la PGK<sub>B</sub> podría estar involucrada en la vía gluconeogénica (Concepción *et al.* 2001; Opperdoes, 1987). La expresión simultánea de la PGK<sub>C</sub> glicosomal y la PGK<sub>B</sub> citosólica en una relación 20/80 probablemente refleja la actividad específica de diferentes rutas metabólicas.

Se ha reportado que la expresión de la PGK<sub>B</sub> en la forma sanguínea de *T. brucei* provoca la muerte de esta forma del parásito. La toxicidad está relacionada tanto con la actividad de la isoenzima como la localización citosólica. Posiblemente la explicación es que la PGK<sub>B</sub> compite con la isoenzima glicosomal por los sustratos, generándose una molécula de ATP en el citosol, esto produce la pérdida de un ATP glicosomal, creándose un desbalance energético en esta organela ya que no se repondría el ATP requerido en los primeros pasos de la glicólisis (Blattner *et al.*, 1998). Estas evidencias experimentales resaltan la importancia del paso catalítico de la PGK en la glicólisis de tripanosomatides, por lo que se han ensayado inhibidores contra la ésta. Entre los inhibidores está la turbecidina, un análogo de la adenosina y la suramina, que poseen comprobada actividad tripanocida y tienen como blanco a la PGK en *T. brucei* (Besteiro *et al.*, 2005; Misset y Opperdoes, 1987; Opperdoes y Michels, 2001). La suramina es un polisulfonato simétrico derivado de la urea, que fue introducido en 1920 como una droga en el tratamiento profiláctico de la tripanosomiasis humana y

oncocercosis en África, es un antagonista de los receptores P2 (receptores de ATP) y entre los efectos más potentes descritos se encuentra la inhibición de la actividad de varias enzimas glicolíticas en tripanosomas, además de inhibir la endocitosis y el enlazamiento del LDL a su receptor (Bisaggio, *et al.* 2006; Drew, *et al.* 2003). Sin embargo, los inhibidores de esta enzima que detienen el crecimiento de los parásitos *in vitro* afectan en mayor o menor grado a su equivalente en mamíferos (Verlinde *et al.*, 2001).

En este trabajo se planteó la caracterización bioquímica de la isoenzima PGK<sub>B</sub> de *T. cruzi*, responsable de alrededor del 80 % del total de actividad de las isoenzimas PGK (Concepción *et al.*, 2001). Esta enzima, contribuye a la obtención de energía necesaria para las rutas catabólicas y anabólicas presentes en el citosol. Otro posible rol de la PGK<sub>B</sub> es su participación en la ruta gluconeogénica (Concepción *et al.*, 2001).

La caracterización de esta isoenzima permitirá determinar si existen diferencias entre la PGK<sub>B</sub> *T. cruzi* y la PGK presente en humanos, diferencias que podrían ser aprovechadas en el diseño racional de inhibidores altamente específicos, y contribuirá a esclarecer el papel de ésta en el metabolismo intermediario del parásito.

**Criterios para determinar blancos terapéuticos y utilidad de drogas.**

No todas las enzimas que componen el metabolismo intermediario resultan igualmente útiles como blanco terapéutico por lo que se debe tener en cuenta: la demostración del carácter esencial del paso metabólico para el organismo patógeno, la posibilidad de inhibir dicho paso de forma potente y selectiva, que la enzima que cataliza este paso metabólico este ausente en el hospedador o que tenga suficientes diferencias con la enzima homóloga en el hospedador mamífero. Respecto a la droga escogida contra el blanco potencial, es importante su mecanismo de acción, volumen de distribución (acumulación en los tejidos), el tiempo de vida media (eliminación y biotransformación) y la viabilidad oral de la droga. Aspectos que han recibido poca atención en el contexto de la enfermedad de Chagas, pero son de mucha importancia, tomando en cuenta el carácter intracelular de la parasitemia de *T. cruzi* (Urbina, 1999). Este giro racional para el desarrollo de quimioterapias específicas contra la enfermedad de Chagas ya está dando frutos, entre los avances más promisorios y recientes tenemos:

- *Inhibidores de la biosíntesis de esteroides*: Se ha demostrado que *T. cruzi* necesita esteroides específicos para su viabilidad celular, y en

todos sus estadíos es extremadamente susceptible a inhibidores de la síntesis de esteroides (Urbina y Docampo, 2003).

- *Inhibidores de cisteína proteasas*: En estos parásitos la cruzipaina es la responsable de la mayor actividad proteolítica en todos los estadíos, se ha observado que la inhibición selectiva de esta proteasa detiene la proliferación y la metacicloogénesis *in vitro*, indicando que esta enzima es esencial para supervivencia del parásito (Urbina y Docampo, 2003).
- *Inhibidores del metabolismo de pirofosfatos*: Los tripanosomátides y parásitos apicomplexos presentan organelas especializadas denominadas acidocalcisomas, que se encuentran involucradas en la adaptación a condiciones de estrés. Los bisfosfonatos pueden inhibir enzimas involucradas en reacciones con pirofosfatos (orgánicos e inorgánicos) como las pirofosfatasas protón motrices de esa organela, presentando una potente y específica actividad tripanocida tanto *in vivo* como *in Vitro* (Urbina y Docampo, 2003).
- *Inhibidores de recuperación de purinas*: La hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa es una enzima necesaria para esta ruta, se han ensayado inhibidores específicos contra la misma, observándose que detiene la proliferación en la forma intracelular de *T. cruzi* (amastigotes) (Urbina y Docampo, 2003).

- *Inhibición de la hexokinasa mediante bifosfonatos:* Varias formas de los tripanosomátides dependen de la glicólisis para la obtención de energía. La hexokinasa es inhibida de forma no competitiva por el pirofosfato inorgánico (PPi) (Cáceres *et al.*, 2003), razón por la cual se diseñaron una serie de análogos del pirofosfato (bisfosfonatos), que al ser ensayados contra la HK la inhibieron, algunos con valores muy bajos de IC<sub>50</sub> de 0.81 μM (Hudock *et al.*, 2006).

Resultados que demuestran la importancia del conocimiento de las enzimas que componen el metabolismo de éste parásito, ya que comprendiendo su fisiología podemos resaltar y emplear sus diferencias para el tratamiento de esta parasitemia.

### ***Hipótesis***

La PGKB es una enzima gluconeogénica localizada en el citosol y tiene constantes cinéticas distintas a las isoenzimas glicosomales (PGK A y C).

## **Objetivos**

- Purificar la isoenzima (PGK<sub>B</sub>), de *Trypanosoma cruzi*.
- Determinar el peso molecular nativo.
- Determinar las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$  para los sustratos ATP y 3-fosfoglicerato.
- Determinar las constantes de inhibición para la suramina, AMP, PPi y la turbecidina monofosfato.
- Determinar el  $IC_{50}$  de la suramina en el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*.

## Metodología.

### Parte I: Material biológico.

Epimastigotes de *T. cruzi* se crecieron en medio LIT monofásico a 28 °C, suplementado con 5 % de suero fetal bovino inactivado por calor, las células fueron cosechadas en fase exponencial (entre 4 y  $7 \times 10^9$  células por mililitro) por centrifugación a 3000 g durante 10 minutos a 4 °C.

#### 1a. Fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial.

Las células fueron lavadas con buffer A (20 mM Tris-HCl, 0,25 M de sacarosa, 20 mM de KCl, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA y 1 mM EGTA a pH 7,2) para ello se centrifugaron a 3000 g por 20 minutos a 4 °C. Posteriormente se lavaron con Buffer B (25 mM Tris-HCl, 0,25 M de sacarosa, 1 mM de  $\text{MgCl}_2$  suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$  2 mM,  $\text{Na}_2\text{EGTA}$  2 mM, leupeptina 10  $\mu\text{M}$ , inhibidor de tripsina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , benzamidina 1 mM, PMSF 1 mM, TLCK 100  $\mu\text{M}$ , antipaina 0,2  $\mu\text{M}$ , pepstatina 1  $\mu\text{M}$ , E-64 3  $\mu\text{M}$ , quimiostatina 1  $\mu\text{M}$ , bestatina 1  $\mu\text{M}$  y phenilmetilsulfonil fluoride 1 mM). Las células fueron maceradas en un mortero frío, en una relación 1:1 con carburo de silicio. Se maceró la mezcla

hasta alcanzar el 90 % de las células rotas, evaluado por microscopía de luz. La mezcla se resuspendió en buffer B con inhibidores y se centrifugó a 1000 g por 5 minutos a 4 °C. Este sedimento (fracción nuclear) contenía carburo de silicio con células enteras y núcleos. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 5000 g por 10 minutos a 4 °C y se obtuvo la fracción granular gruesa. La fracción granular fina se obtuvo subsecuentemente por centrifugación a 33000 g por 20 minutos a 4 °C, el sobrenadante del paso anterior fue ultracentrifugado a 105000 g por 1 hora a 4 °C para separar la fracción microsomal del citosol, siendo este último el material de partida para la purificación de la PGK<sub>B</sub> (Barros, 2006).

**1b. Determinación de proteínas mediante el método de Lowry.**

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry *et al.*, 1951, usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. En los casos en que la muestra a ensayar presentó sustancias interferentes al método (sacarosa, EDTA, DTT, glucosa, entre otros), se sometió la misma a una precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA) y deoxicolato. Para ello, las muestras fueron incubadas con 0,015 % (p/v) de deoxicolato de sodio durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego 10 % (p/v) de TCA durante 30 minutos a 4 °C, luego se centrifugó durante 5 minutos a máxima

velocidad en una microcentrífuga Eppendorf (modelo 5415 C) y se descartó el sobrenadante. Las proteínas sedimentadas se resuspendieron en agua destilada y fueron homogenizadas para luego determinar la concentración de proteínas siguiendo el método de Lowry.

*1c. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).*

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes se realizó siguiendo el protocolo descrito por Laemmli en 1970. El gel de resolución se preparó al 12,5% de acrilamida en tampón Tris-HCl 375 mM, pH 8,8, 0,1 % (p/v) de SDS, 0,01 % (p/v) de persulfato de amonio y 0,3 % (v/v) de TEMED. El gel concentrador se preparó al 5 % de acrilamida en tampón Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, 0,1 % (p/v) de SDS, 0,02 % (p/v) de persulfato de amonio y 0,5 % (v/v) de TEMED. Las muestras de proteínas fueron mezcladas con tampón de muestra (62 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % (p/v) de SDS, 10 % (v/v) de glicerol, 100 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y azul de bromofenol) en relación 5:1 y hervidas durante 5 minutos. Las corridas electroforéticas se realizaron a 25 miliamperios fijos con voltaje libre, utilizando el sistema para minigeles Hoefer, en tampón Tris-glicina (Tris 25 mM, pH 8,3, Glicina 190 mM, 0,1 % (p/v) SDS).

La visualización de las proteínas en los geles se realizó mediante tinción en solución colorante: 45,2 % (v/v) de metanol, 8,2 % (v/v) de ácido acético glacial y 0,25 % (p/v) de azul de Coomassie R-250 durante 15 minutos, seguido de la decoloración con solución decolorante (25 % (v/v) de metanol y 7,5 % (v/v) de ácido acético glacial), durante 1 hora. Se usaron marcadores de peso molecular para SDS-PAGE (Sigma): albúmina de suero bovino (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa) y lactoalbúmina (14,2 kDa).

## **Parte II: Esquema general de la purificación.**

Las proteínas presentes en el citosol fueron precipitadas con concentraciones crecientes de sulfato de amonio, la PGK<sub>B</sub> precipitó a una concentración de 80 %, determinado mediante la actividad PGK. Para emplear la precipitación como paso de purificación se realizó una precipitación previa con 60 % de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante dos horas en hielo, se centrifugó a 6000 g por 15min a 4 °C para sedimentar las proteínas que precipitaron, y luego se procedió a precipitar el sobrenadante obtenido con 80% de sulfato de amonio durante cuatro horas en hielo. El sedimento de proteínas precipitadas se resuspendió en 2,5 mL de buffer DEAE (Tris-base

25 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, pH 8) y la sal presente en esta suspensión de proteínas fue eliminada empleando una columna Sephadex G-25 previamente equilibrada con el mismo tampón. Para ello se pasaron hasta un máximo de 2,5 mL de la solución de proteínas, se dejó eluir 2,5 mL (volumen muerto de la misma de la columna) y se recogió un volumen de 3,5 mL, esta fracción sin sales se cargó en una columna de DEAE celulosa, previamente equilibrada con tampón (Tris-base 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, pH 8), la fracción que eluía de la columna fue recircularizada dos veces, con un flujo en la columna de 0,66 mL/min. Luego se lavó la columna con 6 volúmenes del mismo tampón, para posteriormente aplicar un gradiente continuo de 0 a 100 mM de NaCl. La elución de la PGK<sub>B</sub> desde la DEAE fue monitoreada mediante la determinación de la actividad, perfil de DO a 280 nm y observación en geles de poliacrilamida al 12,5 %. Se colectaron las fracciones que presentaron actividad PGK<sub>B</sub> y para concentrar la muestra, se precipitó con 80 % de sulfato de amonio. El pellet obtenido se resuspendió en 2,5 mL del buffer de la Sephacryl S-200 (tris-HCl 25 mM, 150 mM de NaCl, pH 7,6). Para determinar el peso molecular nativo se cargó la muestra en la columna de exclusión de peso molecular, previamente calibrada con marcadores de peso molecular (Amersham Biosciences): tiroglobulina (669 kDa) 2 mg, ferritina (440 kDa) 1 mg, catalasa (232 kDa) 2 mg, aldolasa (158 kDa) 2 mg, albúmina bovina (67 kDa) 2 mg, albúmina de huevo (43 kDa) 2

mg, quimiotripsinógeno A (25 kDa) 2 mg, ribonucleasa (13,7 kDa) 2 mg y se empleó de 1 a 2 mg de azul dextrano para la determinación del volumen muerto de la columna. El flujo de la columna fue 0,92 mL/min.

### **Parte III: Determinación de la actividad enzimática.**

La actividad PGK se determinó siguiendo la desaparición del NADH a 340 nm, en una cubeta de cuarzo de un mililitro, con tampón (Trietanolamina 0,1 M, 2 mM sulfato de magnesio, pH 8,0), 0,8 mM ATP, 3 mM 3-fosfoglicerato, 0,4 mM de NADH, 2 Unidades (U) de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la muestra a ensayar (Bergmeyer, 1983).

### **Parte IV: Estudios cinéticos.**

Luego de purificar la proteína, se procedió a realizar su caracterización cinética. Se determinaron las constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$  y  $V_{max}$ ), para el ATP y el 3-fosfoglicerato (3PGA) en el sentido gluconeogénico. Para determinar  $K_m$  y  $V_{max}$  para el ATP se ensayaron concentraciones de ATP entre 0,2 y 1,2 mM, mientras que el 3-PGA se mantuvo constante y en exceso (3 mM) en la cubeta. Para la determinación del  $K_m$  para el 3-PGA, se ensayaron concentraciones de este sustrato entre 0,3 y 2 mM, manteniendo

la concentración de ATP constante y en exceso (1,2 mM) en la cubeta. Para determinar el efecto sobre la actividad de la enzima de posibles inhibidores, se probaron distintas concentraciones de cada uno. Para la suramina entre 0 y 50  $\mu\text{M}$ , el AMP entre 0,5 y 2 mM, para el PPI entre 0,5 y 2 mM y para la turbecidina monofosfato entre 50  $\mu\text{M}$  y 400  $\mu\text{M}$ . Estas reacciones se hicieron a diferentes tiempos de incubación con la droga (entre 0 y 5 minutos) y por último se determinaron las constantes de inhibición de estas moléculas, variando las concentraciones de estos inhibidores frente a diferentes concentraciones de los sustratos.

#### **Parte IV: Determinación del pH óptimo.**

Para la determinación del pH óptimo se preparó un polibuffer con acetato, MES, MOPS y TEA que nos permitió variar el pH de manera estable en un rango de 4 a 10, con variaciones de 0,5 unidades de pH. Para corroborar que el efecto observado es por el cambio del pH, y no por acción de la molécula tamponadora, se preparó también un buffer fosfato, que constaba de una mezcla de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y que nos permitió variar el pH en el mismo rango mencionado anteriormente (4 - 10 con variaciones de 0,5).

### **Parte V: Determinación de fuerza iónica óptima.**

Para la determinación de la fuerza iónica, se procedió a preparar una serie de soluciones a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl), de 0 – 400 mM, variando en un rango de 50 mM de NaCl en el buffer de medición (TEA pH 7,6, con sulfato de magnesio 2 mM).

### **Parte VI: Inhibición de la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* por efecto de la suramina.**

Se prepararon 8 cultivos en fajardines, 10 mL de medio LIT monofásico fueron inoculados con 0,5 mL ( $\cong 16 \times 10^6$  células/mL) de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa EP. Se dejaron crecer los parásitos durante 48 h, antes de agregarles las diferentes concentraciones de inhibidor a cada cultivo, y se realizaron mediciones de DO 600 nm y conteo de células por mililitro mediante una cámara de Neubauer cada 24 horas. Las concentraciones de drogas que se ensayaron fueron: 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 y 700  $\mu$ M de suramina; el stock (10 mM) del inhibidor fue preparado en agua destilada y filtrado estérilmente el mismo día en que se usó.

## Parte VII. Análisis de los parámetros cinéticos.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante las pruebas de ajustes de Lineweaver-Burk (o dobles inversos) para la determinación de las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$ , en las ecuaciones descritas a continuación (Segel, 1993):

$$\text{(ecuación 1)} \quad \frac{v}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$\text{(ecuación 2)} \quad \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Donde [S] es la concentración del sustrato que se varía mientras los otros sustratos se mantienen en concentraciones saturantes y constantes.

En vista que la inhibición con suramina fue de tipo mixta se determinaron las constantes de inhibición, mediante la graficación de las curvas obtenidas partiendo de las siguientes ecuaciones (Segel, 1993):

$$\text{(ecuación 3)} \quad \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} (\alpha) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} (\alpha')$$

$$\text{(ecuación 4)} \quad \alpha = K_{is} = \frac{[E^*S][I]}{[E^*SI]}$$

$$\text{(ecuación 5)} \quad \alpha' = K_{it} = \frac{[E^*][I]}{[E^*I]}$$

Siendo [I] la concentración de inhibidor, E` representa la concentración de enzima en presencia de los sustratos y los cofactores fijos. Los valores de  $K_{is}$  y  $K_{ii}$  fueron obtenidos graficando las pendientes obtenidas y los puntos de intersección en función de la concentración del inhibidor.

Para la determinación del  $IC_{50}$ , se aplicaron las siguientes formulas:

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{\# \text{ de células} \times \text{mL}^{-1}(\text{final}) - \# \text{ de células} \times \text{mL}^{-1}(\text{inicial})}{\# \text{ de células} \times \text{mL}^{-1}(\text{inicial})} \times 100$$

$$\% \text{ de crecimiento relativo} = \frac{\% \text{ de crecimiento para una concentración (de inhibidor)}}{\% \text{ de crecimiento para el control (sin inhibidor)}} \times 100$$

Representándose luego los valores obtenidos de % de crecimiento relativo para cada una de las concentraciones de suramina en una gráfica, partiendo de la cual se halla el valor de  $IC_{50}$  extrapolando la concentración de inhibidor a la que se alcanza el 50 % de inhibición del crecimiento de los parásitos.

## Resultados.

### ***Análisis estructural de las PGKs de varios organismos.***

El análisis de las secuencias de aminoácidos de las PGKs de varios organismos mostró diferencias en las secuencias primarias de estas proteínas. Una de las isoenzimas glicosomales, la PGK<sub>C</sub>, tiene una extensión de veinte aminoácidos en el dominio C-terminal. Las isoenzimas PGK B y A de *Trypanosoma cruzi* comparten un 71 % de identidad, debido a que la PGK<sub>A</sub> presenta una inserción de 80 aminoácidos en el medio del dominio N-terminal (Tabla 2). Por otra parte, las secuencias que se compararon en esa tabla no superan el 87 % de identidad entre isoenzimas de diferentes especies. Las diferencias más marcadas fueron entre la PGK<sub>B</sub> de *Trypanosoma cruzi* y la PGK de levaduras que presentaron una identidad de 35 %, y con respecto a la PGK humana un 45 %. El análisis de estas secuencias se validó por un multialineamiento de las secuencias de PGKs obtenidas de GenBank y usando el programa ClustalW 1,5 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

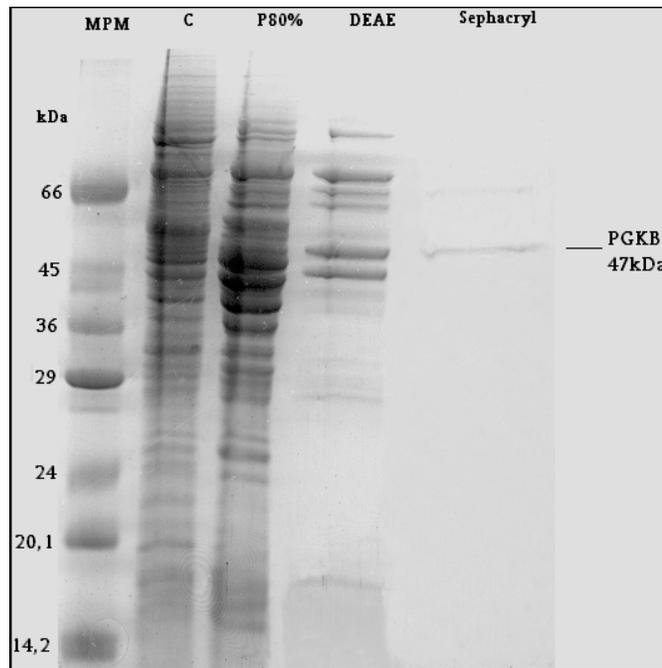
	Tb PGK <sub>B</sub>	Tb PGK <sub>C</sub>	Tb PGK <sub>A</sub>	Tc PGK <sub>A</sub>	Tc PGK <sub>B</sub>	CriFa PGK <sub>B</sub>	CriFa PGK <sub>C</sub>	LeiMe PGK <sub>C</sub>	LeiMe PGK <sub>B</sub>	LeiMa PGK <sub>B</sub>	LeiMa PGK <sub>C</sub>	Yeast PGK	Human PGK
Tb PGK <sub>B</sub>	----	92	73	67	<b>76</b>	74	74	75	74	74	71	36	43
Tb PGK <sub>C</sub>		----	78	74	<b>73</b>	74	73	73	72	72	79	36	44
Tb PGK <sub>A</sub>			----	73	<b>71</b>	70	73	73	69	69	79	37	44
Tc PGK <sub>A</sub>				----	<b>71</b>	87	86	87	87	71	76	35	46
Tc PGK <sub>B</sub>					----	<b>81</b>	<b>86</b>	<b>87</b>	<b>81</b>	<b>65</b>	<b>75</b>	<b>35</b>	<b>45</b>
CriFa PGK <sub>B</sub>						----	98	93	89	64	75	34	43
CriFa PGK <sub>C</sub>							----	92	92	73	74	33	43
LeiMe PGK <sub>C</sub>								----	99	73	75	34	43
LeiMe PGK <sub>B</sub>									----	64	75	34	43
LeiMa PGK <sub>B</sub>										----	84	36	44
LeiMa PGK <sub>C</sub>											----	36	46
Yeast PGK												----	55
Human PGK													----

**Tabla 2.** Porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos de PGK en tripanosomátides, levadura y humanos.

### ***Purificación***

Se logró purificar la PGK<sub>B</sub> muy próximo a homogeneidad, empleando tres pasos de purificación (tabla 3), observándose en el gel solo una banda

contaminante minoritaria (figura 10). La precipitación del citosol libre de microsomas con 60 % de sulfato de amonio eliminó una serie de proteínas contaminantes, luego con 80 % de  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  se precipitó la  $\text{PGK}_B$  junto con otras proteínas. En el siguiente paso de purificación, una cromatografía de intercambio iónico con DEAE celulosa, se observó que la interacción de la  $\text{PGK}_B$  *Trypanosoma cruzi* con la resina es muy débil, ya que al aplicar el gradiente continuo de NaCl (de 0 a 100 mM), la proteína eluyó a una concentración de 38 mM de NaCl (grafica 1).

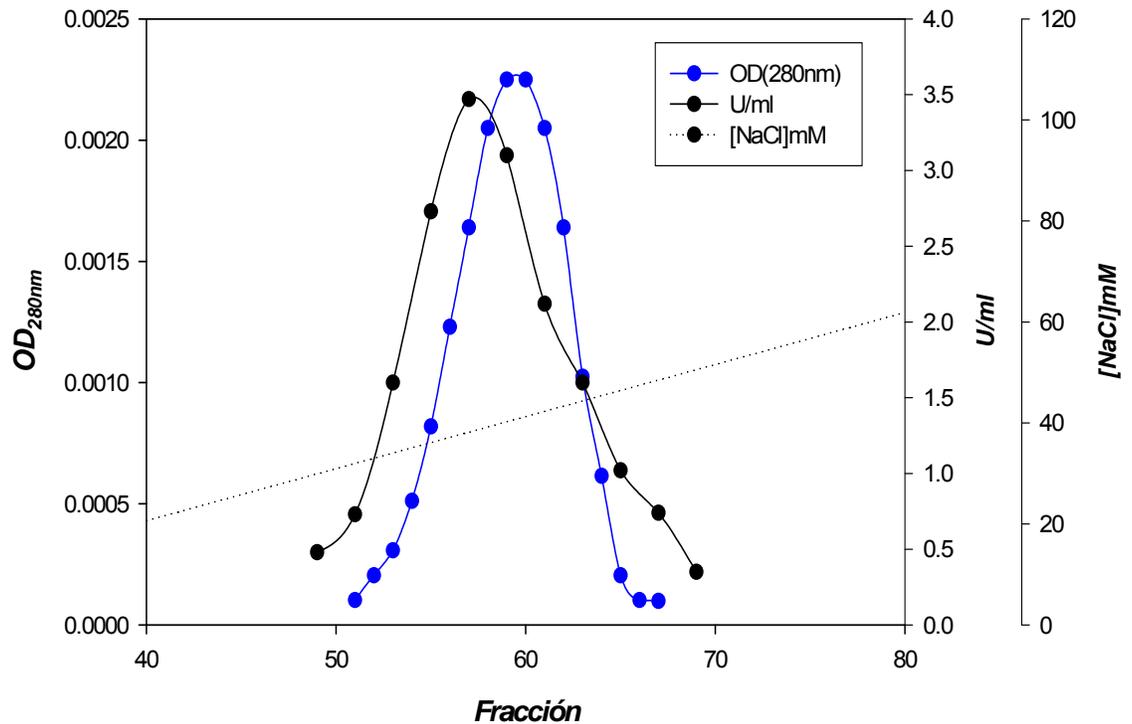


**Figura 10.** Gel de purificación.

En la tabla de purificación (tabla3) se puede observar que hubo una pérdida considerable de actividad (Ut) durante el proceso de purificación, siendo el último paso (sephacryl S-200) donde se observó un mayor decaimiento de la actividad, pues de 135 Ut se obtuvieron solo 20,7 ( $\approx 15\%$ ), hecho que se ve reflejado en el rendimiento. El elevado factor de purificación y el hecho de que en la fracción permanece sólo un contaminante minoritario (figura 10) permitió emplear esta preparación para los análisis cinéticos y estudios de inhibición usando el protocolo anteriormente descrito.

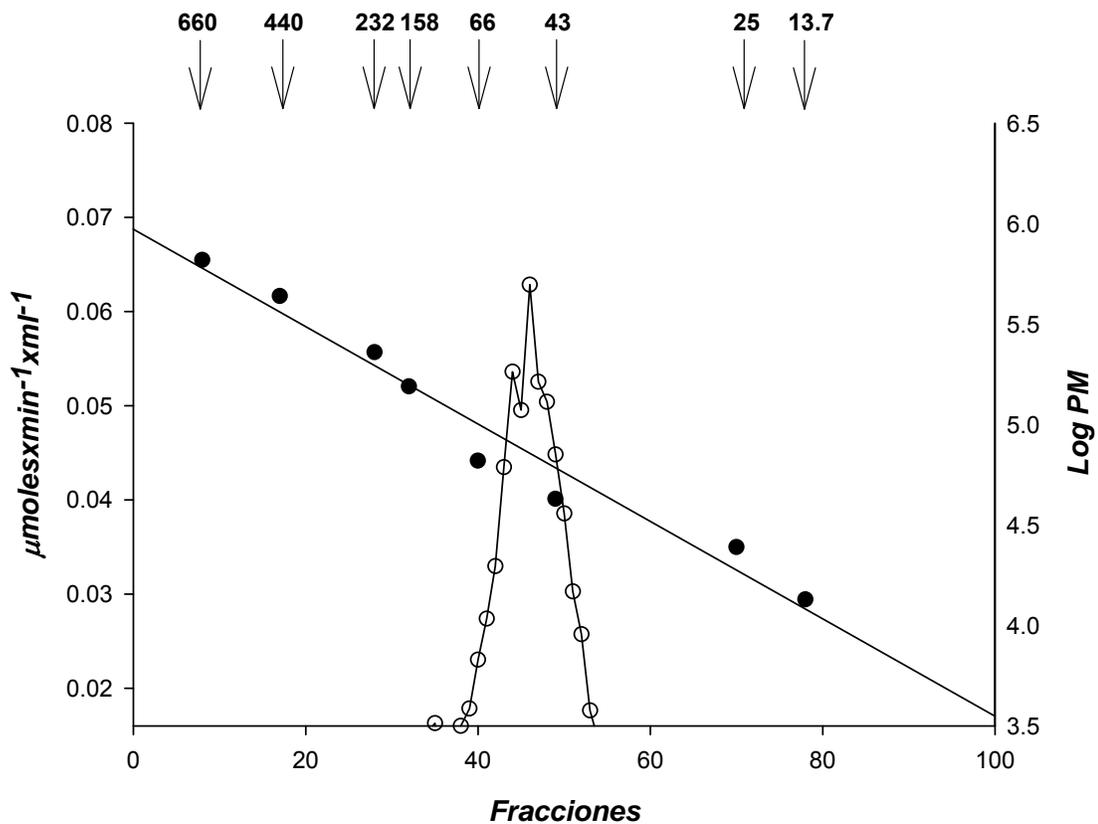
Fracción	Vt (mL)	mg totales	U totales	A.E (U/mg)	Rendimiento (%)	FP
Citosol	152	273	260	0,95	100	1
Pellet 80%	3,5	30,6	175,5	5,7	67,5	6
DEAE celulosa	25	0,8	135	168,7	51,9	177
Sephacryl S-200	25	0,034	20,7	608,8	7,9	640

**Tabla 3.** Tabla de purificación.



**Gráfica 1.** Perfil de elución de la actividad PGK de la DEAE celulosa.

Luego de realizar el pool con las fracciones en las que eluyó la PGK<sub>B</sub> (determinado por actividad), concentrarlo, y pasarlo por la Sephacryl S-200, bajo las condiciones descritas en la metodología, se logró determinar que esta enzima eluye en las fracciones que corresponden al monómero, ya que el peso molecular obtenido fue 46,1 kDa (grafica 2). Esta masa molecular coincide con el peso de la subunidad obtenido a través de SDS-PAGE y es muy similar al reportado previamente de 45 kDa (Concepción *et al.*, 2001).

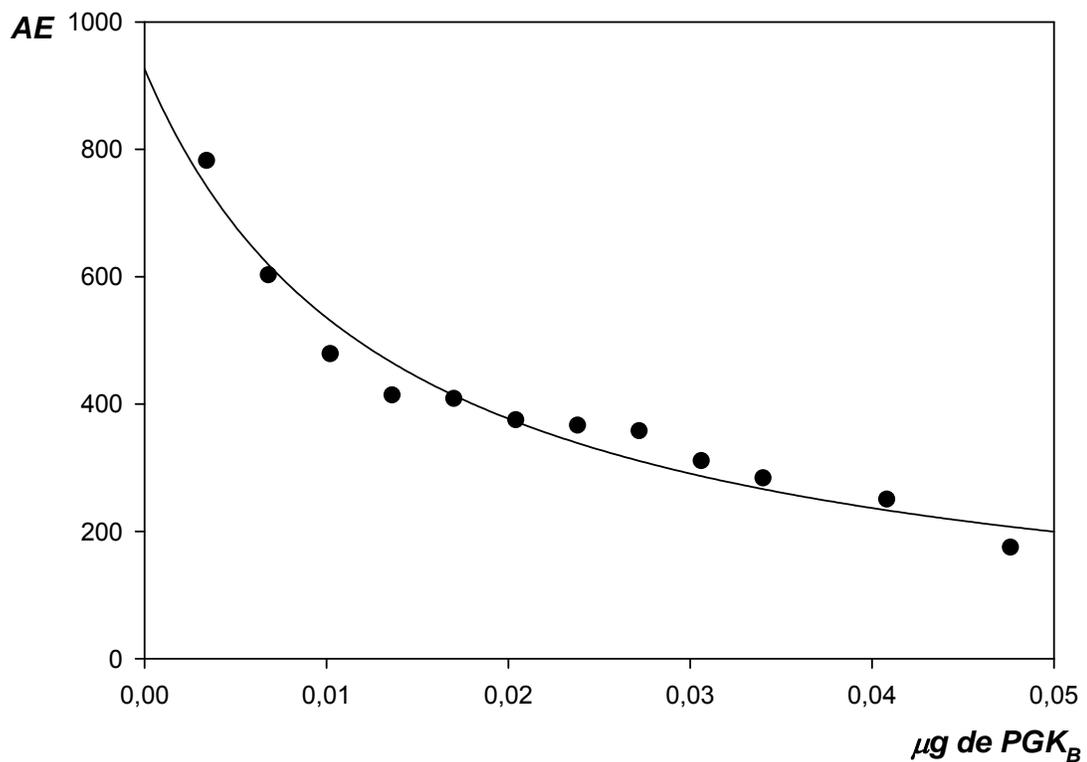


**Gráfica 2.** Perfil de elución de la Sephacryl S-200, obtenido por la medición de actividad PGK.

***Determinación de algunos parámetros fisicoquímicos que afectan la actividad de la isoenzima PGK<sub>B</sub>.***

Normalmente la actividad es directamente proporcional a la cantidad de enzima en concentraciones saturantes de los sustratos, dando una línea recta con pendiente positiva que corta en el origen, por lo que al representarlo en actividad específica da una línea horizontal. En el gráfico 3,

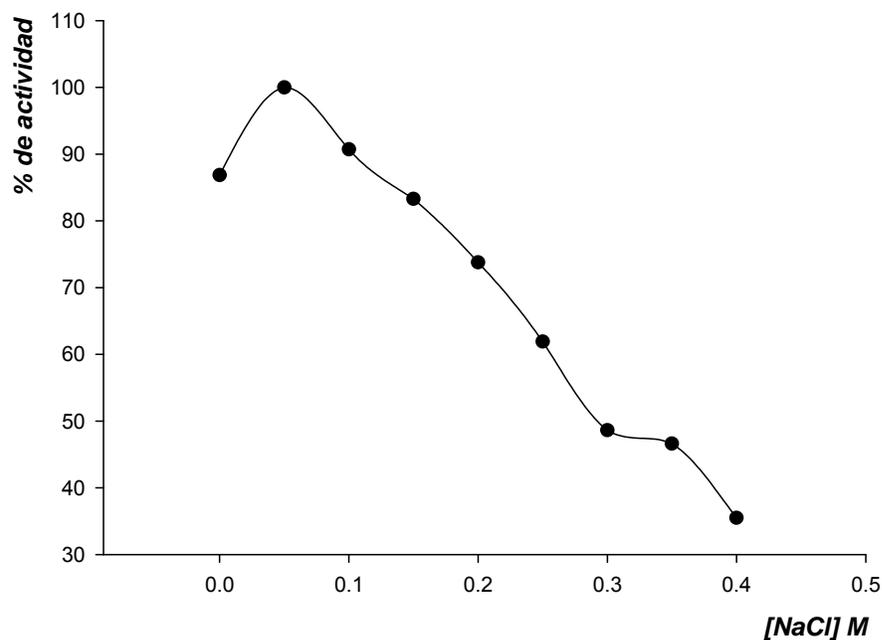
mostrado a continuación, se observa un efecto diferente, ya que la PGK<sub>B</sub> de epimastigotes de *T. cruzi* incrementa su actividad al disminuir la cantidad de enzima, comportamiento similar al observado para la Enolasa de *T. cruzi*, la HK de *Leishmania mexicana*, y para la HK de levadura bajo ciertas condiciones (Domingo, 2004; Pabón, *et al.*, 2002; Wilkinson *et al.*, 1979).



**Gráfico 3.** Variación de la actividad enzimática con respecto a la cantidad de enzima.

Otro de los parámetros evaluados fue el efecto de la fuerza iónica (concentración de NaCl) sobre la actividad enzimática. La gráfica 4 permite

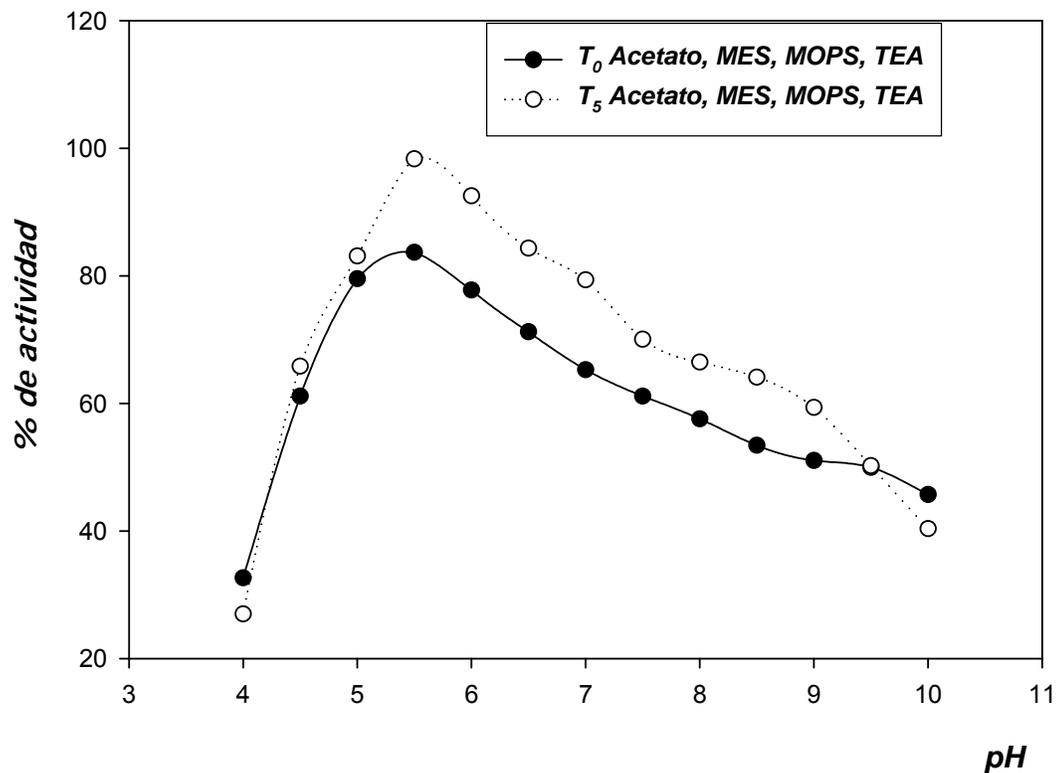
apreciar que la enzima presenta un máximo de actividad a una concentración de 50 mM de NaCl, disminuyendo la actividad considerablemente a concentraciones superiores de sal. Se calculó el valor óptimo de la fuerza iónica, tomando en cuenta el conjunto de iones presentes en solución según la siguiente fórmula:  $I = \sum [\text{iones}] (q)^2$ , obteniéndose un valor de:  $I = 0,116 \text{ M}$ .



**Gráfico 4.** Determinación de fuerza iónica óptima (concentración de NaCl).

Se determinó que el pH óptimo para la actividad de la enzima fue de 5,5, este experimento se realizó bajo dos condiciones diferentes, incubando la enzima cinco minutos en el buffer ( $T_5$ ) y sin incubar ( $T_0$ ), empleando un sistema de polibuffers que permitió cubrir un rango entre 4 y 10 unidades de pH, adicionalmente, para descartar el efecto que pudiese tener las moléculas

tamponadoras sobre la actividad de la enzima, se decidió emplear buffer fosfato para cubrir el mismo rango mencionado de pH. En todas estas condiciones el valor de pH fue similar (gráfico 5) y muy próximo a los valores reportados para otras PGK (citosólica de *T. brucei* y PGK de levadura) (Misset y Opperdoes, 1987), en los cuales el pH óptimo se encontró alrededor de 6,0.



**Gráfico 5.** Determinación de pH óptimo de la isoenzima PGK<sub>B</sub> de *T. cruzi*.

Con el fin de interpretar el valor de pH óptimo obtenido, se procedió a realizar un análisis de los aminoácidos presentes en el sitio catalítico de esta

enzima, bajos las mismas condiciones reportadas por Misset y Opperdoes en 1986, obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 4.

Residuos involucrados en el enlazamiento de		Levadura	<i>T. brucei</i> Cit/glic	Caballo	Humano	<i>T. cruzi</i> PGK <sub>B</sub>
ATP motivo adenina	211	Gly	Gly/ Gly	Gly	Gly	Gly
	308	Trp	His/His	Trp	Trp	Tyr
	311	Leu	Leu/ Leu	Leu	Leu	Leu
	338	Gly	Gly/ Gly	Gly	Gly	Gly
	339	Val	Val/ Val	Val	Val	Val
Hidroxil ribosas	341	Glu	Glu/ Glu	Glu	Glu	Glu
	371	Gly	Gly/ Gly	Gly	Gly	Gly
	372	Asp	Asp/ Asp	Asp	Asp	Asp
$\alpha$ -fosfato	213	Lys	Lys/ Lys	Lys	Lys	Lys
$\beta$ -fosfato	217	Lys	Lys/ Lys	Lys	Lys	Lys
	334	Asn	Asn/ Asn	Asn	Asn	Asn
$\gamma$ -fosfato	371	Gly	Gly/ Gly	Gly	Gly	Gly
	372	Asp	Asp/ Asp	Asp	Asp	Asp
3-fosfoglicerato	38	Arg	Arg/ Arg	Arg	Arg	Arg
3-fosforil	391	Thr	Thr/ Thr	Thr	Thr	Thr
2-hidroxil	392	Gly	Gly/ Gly	Gly	Gly	Gly
	393	Gly	Gly/ Gly	Gly	Gly	Gly
Grupo keto	394	Gly	Gly/ Gly	Gly	Gly	Gly

Basado en Misset y Opperdoes, 1987.

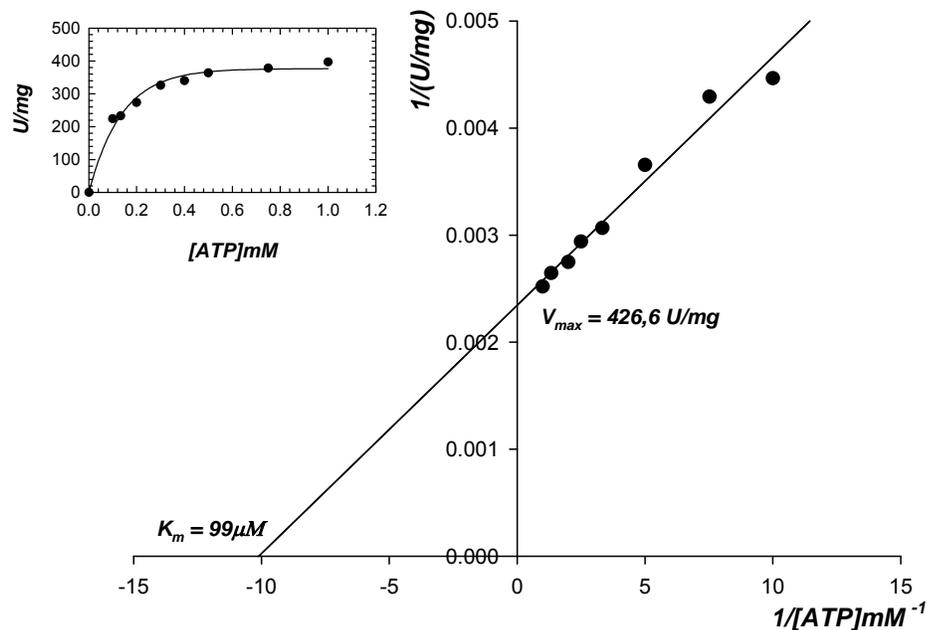
**Tabla 4.** Residuos de aminoácidos presentes en el sitio activo de la PGK de varios organismos (el alineamiento y la numeración de aminoácidos de los residuos involucrados en el enlazamiento de ambos sustratos se basó en la secuencia de la PGK de levadura).

En este análisis comparativo se puede observar un sólo cambio en el aminoácido 308, de los que componen el sitio catalítico. Presentando la PGK<sub>B</sub> de *T. cruzi* una tirosina a diferencia de las PGK de los otros

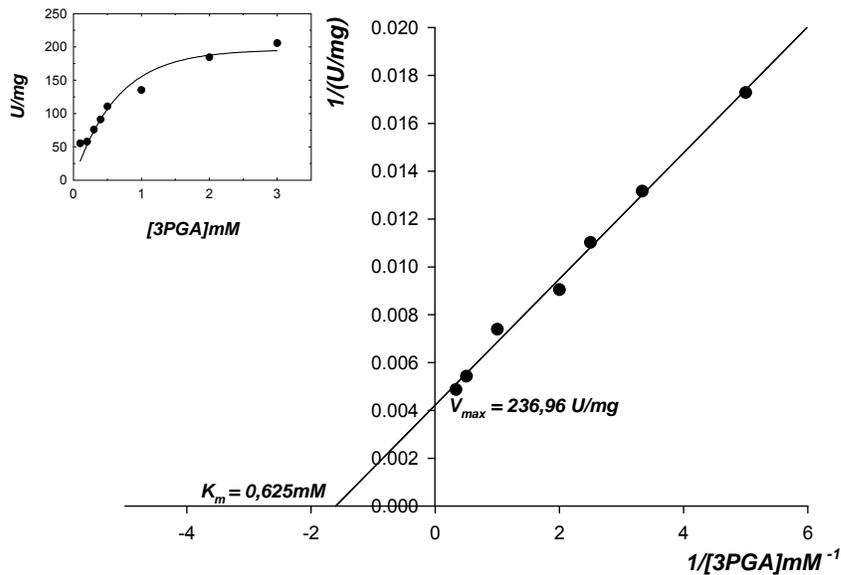
organismos reportados en la tabla mostrada anteriormente, en los cuales se encontró un triptófano o una histidina en dicha posición.

### Caracterización cinética.

Las constantes cinéticas se determinaron, a partir de la gráfica de dobles inversos obteniéndose  $K_{mATP}$  de  $99 \mu\text{M}$  y  $K_{m3PGA}$  de  $0,625 \text{ mM}$ . La  $V_{max}$  para el ATP fue de  $426,6 \text{ U/mg}$  y para el 3-PGA de  $236,96 \text{ U/mg}$  (Gráfico 6 y 7). Esto podría sugerir un mecanismo enzimático ordenado, debido a las diferencias de afinidad observadas para cada uno de los sustratos.



**Gráfico 6.** Determinación de las constantes cinéticas de la PGKB, para el ATP.

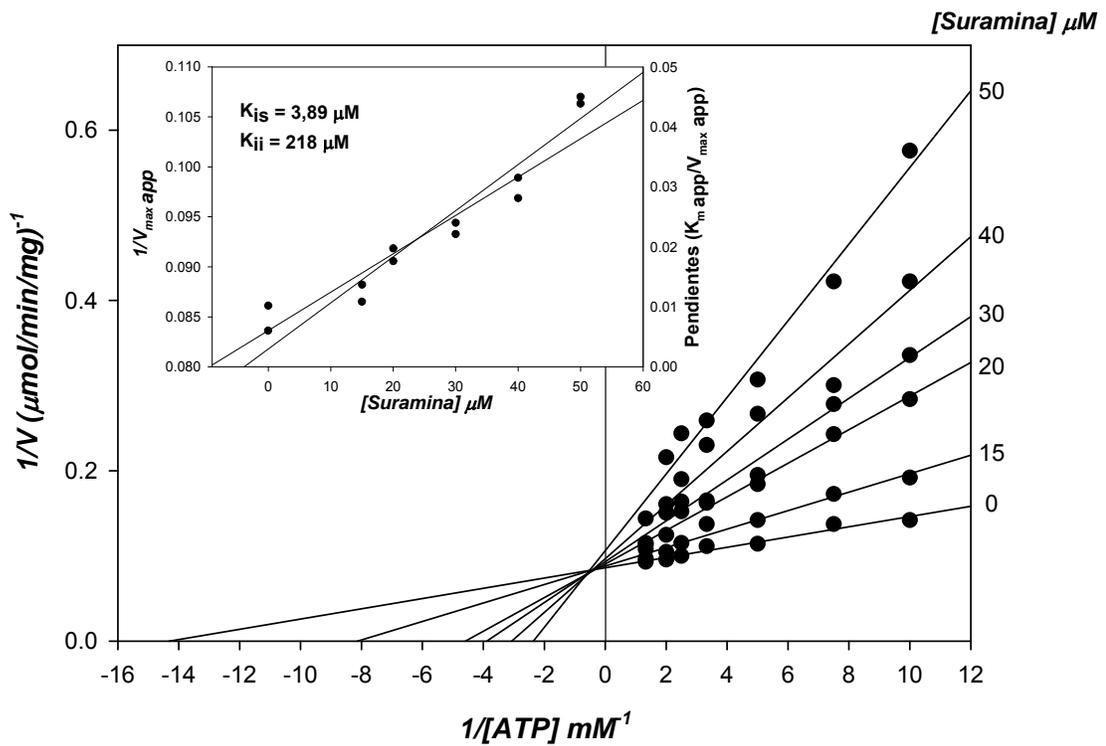


**Gráfico 7.** Determinación de las constantes cinéticas de la PGKB, para el 3PGA.

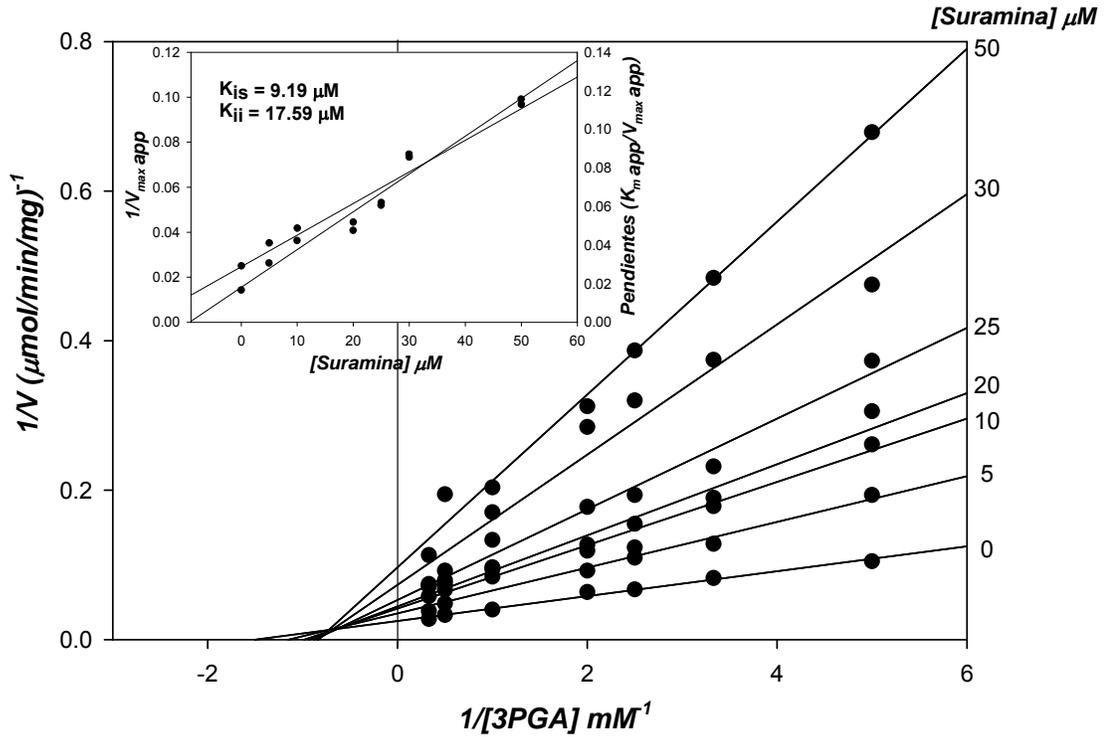
### Cinética de inhibición

Se determinó si el AMP, PPI, la turbecidina monofosfato y la Suramina tenían algún efecto sobre la actividad de la PGK<sub>B</sub> purificada. Para ello se ensayaron distintas concentraciones de los posibles inhibidores, empleando como máximo 400  $\mu\text{M}$  para TuMP, 2 mM para el PPI, 2 mM para el AMP y 50  $\mu\text{M}$  para la Suramina. La enzima fue incubada 5 minutos con las sustancias anteriormente nombradas. En ninguno de los casos ensayados (a excepción de la Suramina) se observó efecto sobre la actividad de la enzima pura, mientras que en presencia de Suramina se observó una inhibición de la actividad de la PGK<sub>B</sub> de *T. cruzi*. Se determinó además una inhibición mixta,

para ambos sustratos. Esta droga ha sido empleada como tratamiento de la tripanosomiasis Africana y se ha determinado que es un fuerte inhibidor de las enzimas glicolíticas, entre ellas la PGK. Los resultados obtenidos son mostrados en los gráficos 8 y 9.

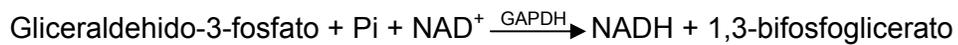


**Gráfico 8.** Determinación de la constante de inhibición, de la suramina, con respecto al ATP.



**Gráfica 9.** Determinación de la constante de inhibición de la suramina, con respecto al 3PGA.

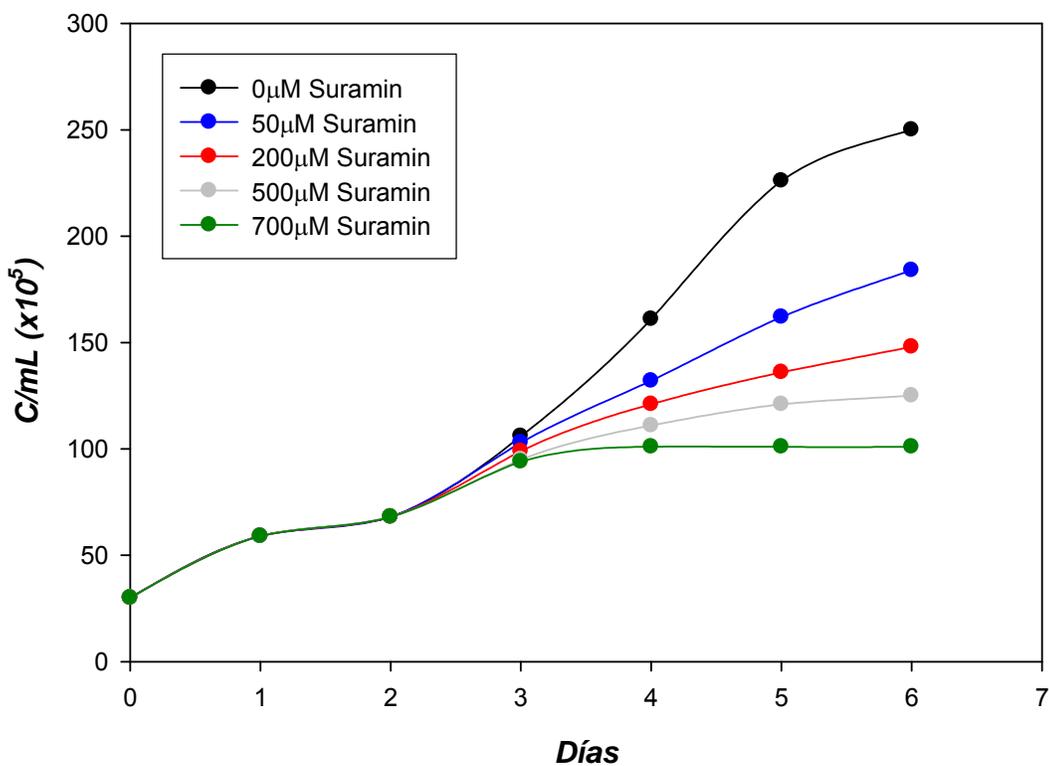
Se descartó el posible efecto de la suramina sobre el sistema acoplante, realizando mediciones con la GAPDH, mediante la siguiente reacción:



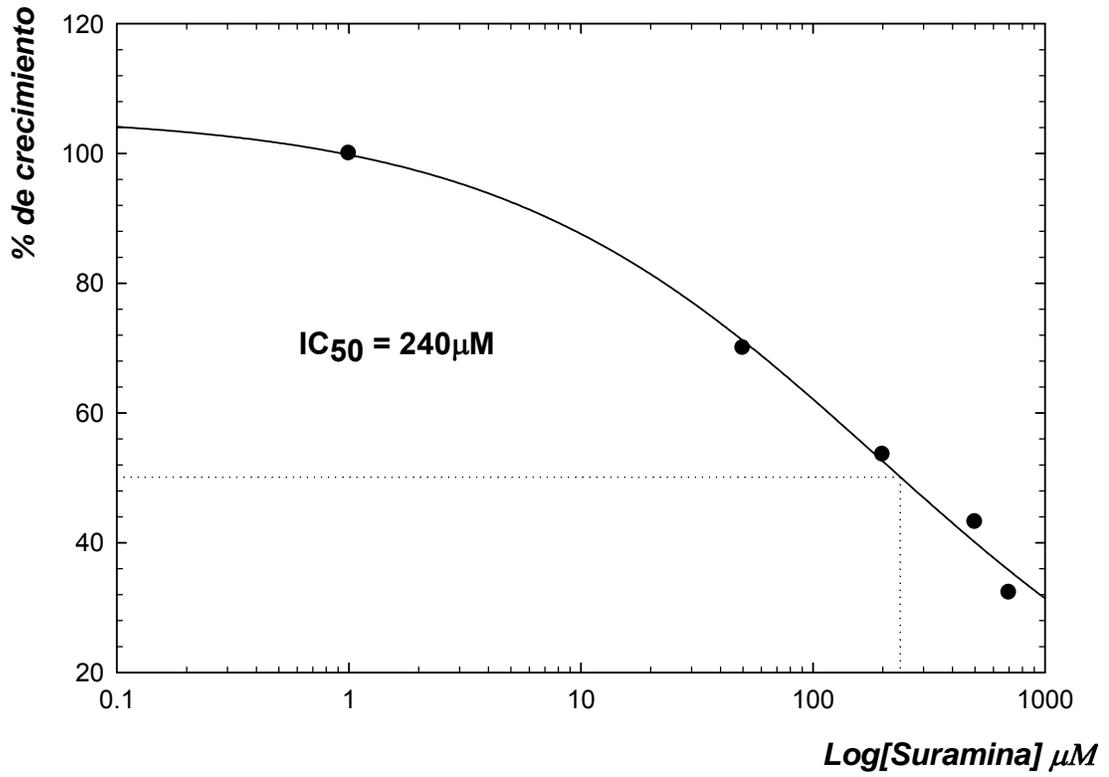
El ensayo fue realizado bajo las siguientes condiciones: 500  $\mu\text{M}$  de gliceraldehido-3-fosfato, 2  $\text{mM}$  de  $\text{NAD}^+$ , 0,23 U de GAPDH, 100  $\text{mM}$  de

fosfato de sodio monobásico (Pi), en buffer TEA, además de la máxima concentración de suramina (50  $\mu\text{M}$ ) e incubando por 5 minutos. Se determinó que la actividad de la enzima acoplante no es afectada por este compuesto (Datos no mostrados).

Se encontró que la suramina afecta el crecimiento de epimastigotes *T. cruzi* en medio LIT, encontrándose un  $\text{IC}_{50}$  de 240  $\mu\text{M}$  (gráfico 11), no se observaron cambios morfológicos resaltantes a microscopia de luz.



**Gráfica 10.** Efecto de la suramina sobre la curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* (La droga se añadió al tercer día de crecimiento).



**Gráfico 11.** Efecto de la suramina sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*

## **Discusión.**

### ***Purificación***

La purificación de la PGKB, como se observa en los valores de factor de purificación (640), rendimiento (7,6 %) y actividad específica (608,8 U/mg) indican que la proteína obtenida mediante la metodología aplicada, presentó un alto grado de pureza, esto fue corroborado a través de geles en condiciones desnaturalizantes, en los cuales se observó sólo una banda de proteína correspondiente al peso molecular esperado para la PGK<sub>B</sub>. La enzima purificada mostró una actividad específica alta y un buen factor de purificación, a pesar del bajo rendimiento ya que en cada paso de purificación se perdió una parte considerable de la actividad. Esto puede ser explicado por el tiempo de vida media de la isoenzima, o por su sensibilidad a algunas de las condiciones a las que fue expuesta durante la purificación.

La precipitación con sulfato de amonio, primer paso de purificación empleado, nos permitió inferir, que esta proteína posee gran cantidad de residuos de amino ácidos polares, ya que se mantuvo soluble a porcentajes menores o iguales al 60 % de sulfato de amonio. Asimismo, permitió eliminar un gran número de proteínas contaminantes presentes en el citosol, las

cuales precipitaron a concentraciones menores de la sal. Al someter la solución con 80 % de la sal, la PGK<sub>B</sub> precipitó conjuntamente con otras proteínas contaminantes y se logró un incremento en la actividad específica de la enzima con muy poca pérdida de unidades totales, por lo que se empleó la precipitación a 80 % cuando se requirió concentrar la muestra.

La cromatografía de intercambio iónico permitió eliminar una serie de contaminantes ya que la proteína presenta un punto isoeléctrico de 6,6 (Concepción *et al.*, 2001), por ende, el buffer en que se realizó esta cromatografía (pH 8) favoreció que la proteína presentara cargas negativas, al poseer residuos de aminoácidos desprotonados a este pH, los cuales interactuarían con la cargas positivas que posee la resina (DEAE celulosa). Esto fue corroborado midiendo la actividad de la enzima en las fracciones correspondientes al lavado, donde no se detectó actividad PGK. Para eluir la de la columna se empleó un gradiente continuo de Cloruro de sodio entre 0 y 100 mM, que permitió despegar la proteína de la resina a una concentración de 38 mM y permitió eliminar un gran número de contaminantes, con un excelente rendimiento y un incremento significativo en el factor de purificación. Sin embargo, fue necesario implementar un paso adicional que nos permitió incrementar el factor de purificación y tener una preparación de la enzima prácticamente pura. Este paso, a través de sephacryl S-200, fue muy eficiente a pesar de tener un bajo rendimiento. Adicionalmente sirvió

para determinar el peso molecular nativo de la PGK<sub>B</sub> 46,1 kDa. En cuanto a su estado oligomérico se encontró que la isoenzima, al igual que otras PGKs de otros organismos es un monómero (Bentahir *et al.*, 2000). El peso molecular nativo es muy similar al obtenido en condiciones desnaturalizantes, por lo que también se descartó una posible asociación de esta isoenzima con otras proteínas con las que co-purifica en la cromatografía de intercambio iónico, como fue descrito para el caso de la enolasa de *T. cruzi* y *L. mexicana* (Domingo, 2004; Quiñones *et al.*, 2004).

### ***Características fisicoquímicas***

El pH óptimo para la actividad de la enzima fue determinado, encontrándose un valor óptimo de 5,5. El único cambio encontrado en el sitio catalítico no explica la diferencia en el pH óptimo encontrado para la enzima de *T. cruzi*, con respecto a las isoenzimas de *T. brucei* (Misset y Opperdoes, 1987) ya que la tirosina no posee grupos ionizables y por ende no influiría prácticamente en la catálisis ácido/base. En general al ser el sitio catalítico tan conservado, las diferencias en pH óptimo entre las isoenzimas citosólicas de ambos organismos (*T. cruzi* y *T. brucei*) deben explicarse debido a diferencias en el entorno en el cual están ambas isoenzimas, o en las

diferencias presentes a nivel de secuencia primaria, ya que la identidad entre ambas enzimas esta alrededor del 61 % (tabla 2).

Otro de los parámetros evaluados fue el efecto de la fuerza iónica sobre la actividad enzimática, se puede apreciar que concentraciones en cubeta por encima de 50 mM ( $I = 0,116 \text{ M}$ ) tienen un efecto negativo sobre la actividad de la enzima. Al aumentar la fuerza iónica del medio disminuye la capa de solvatación que mantiene soluble las proteínas y se favorecen las interacciones entre monómeros de la PGK<sub>B</sub>, lo que promovería como consecuencia una transición lenta entre distintas formas oligoméricas, afectando la actividad de la enzima. Este resultado apoya la observación de que disminuye la actividad específica al incrementar la concentración de enzima, hecho que se atribuye a la transición hacia estados oligoméricos más complejos que el monómero, pero con menor (o incluso nula) actividad. Este comportamiento encontrado en la PGK<sub>B</sub> de *T. cruzi* también ha sido descrito para otras enzimas glicolíticas, en estos parásitos, como por ejemplo la enolasa de *T. cruzi* (Domingo, 2004)

### ***Parámetros cinéticos y análisis comparativo***

Al determinar los parámetros cinéticos, para la PGK<sub>B</sub> de *Trypanosoma cruzi*, comparando los valores de  $K_m$  obtenidos con los de otras PGKs

reportadas para varios organismos, incluyendo los valores de la PGK<sub>A</sub> recombinante de *T. cruzi* (Quiñones, W., comunicación personal), podemos observar que la PGK<sub>B</sub> presenta mayor afinidad, tanto para el 3PGA ( $K_m$  625  $\mu$ M) como para el ATP ( $K_m$  99  $\mu$ M), siendo 2,4 veces menor el valor de  $K_m$  para el ATP que el reportado para la PGK<sub>A</sub> recombinante de *T. cruzi* ( $K_m$  236  $\mu$ M), hecho que apoya la hipótesis, que esta isoenzima actúa en dirección gluconeogénica (Concepción *et al.*, 2001). En estudios de expresión de las tres isoenzimas PGK en epimastigotes de *T. cruzi*, se encontró que la expresión de la PGK<sub>B</sub> se incrementa al final de la curva de crecimiento, así como incrementa la actividad específica PGK, en condiciones donde la disponibilidad de glucosa es baja y el consumo de aminoácidos aumenta (Barros, 2006). Esta observación, analizada en conjunto con los valores de  $K_m$  para los sustratos en sentido gluconeogénico apoya la hipótesis de que la PGK<sub>B</sub> funciona en dicha dirección, formando parte del proceso de síntesis de glucosa a partir de aminoácidos, empleada para la elaboración de glicoproteínas (Van Weelden *et al.*, 2005). La gluconeogénesis ha sido postulada como un mecanismo que puede estar presente en la forma procíclica de *T. brucei*, que emplea parte del ciclo de Krebs para el consumo de aminoácidos hasta malato (en el mitocondrion), liberándolo posteriormente al citosol. Este malato luego puede ser transformado a oxalacetato por una malato deshidrogenasa (MDH) citosólica, y luego a

fosfoenolpiruvato (PEP), por una fosfoenolpiruvato carboxikinasa citosólica (PEPCK). El PEP producido puede ser usado en tres vías, la producción de ATP mediante la PEPCK o la PPDK luego de la entrada del PEP al glicosoma, la producción de ATP en el citosol por la PK o la gluconeogénesis vía la enolasa, fosfoglicerato mutasa, PGK<sub>B</sub>, para formar 1,3 bifosfoglicerato, que entra al glicosoma, o es consumido por la GAPDH citosólica para producir gliceraldehido 3 fosfato (Van Weelden *et al.*, 2005; Van Hellemond *et al.*, 2005).

Discutir los parámetros cinéticos en base a sus velocidades máximas, presenta dificultades, ya que normalmente estas no son reportadas, y también dependen de la preparación de la enzima. Pero comparando los valores de actividad específica (AE) reportados para la PGK de varios organismos, podemos observar que la PGK<sub>B</sub> de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, presenta una actividad específica (608,8 U/mg) mayor que la PGK<sub>B</sub>r (159 U/mg) (Zomer *et al.*, 1998) y la PGK<sub>B</sub> nativa (275 U/mg) de *T. brucei* (Misset *et al.*, 1987), de igual manera para, la PGK de *Plasmodium falciparum* (210 U/mg) (Fujii *et al.*, 1980) y la PGK de *Thermotoga maritima* (330 U/mg) (Schurig *et al.*, 1995), siendo muy similar a la de humanos (670 U/mg) (Yoshida *et al.*, 1972) y menor a la PGK de *Chlamidomonas* (4367 U/mg) (Kitoyama *et al.*, 1995). El valor de  $V_{max}$  determinado está en el mismo orden de magnitud que la actividad específica

(608 U/mg), lo que es observado para una preparación con un alto grado de pureza, estos valores de  $V_{max}$  de la PGK<sub>B</sub> (entre 236,9 y 426,6 U/mg) son por su parte, aproximadamente 3 veces más altos que el valor reportado para la enzima recombinante glicosómica (PGK<sub>C</sub>) de *T. brucei* (99 U/mg), pero son muy similares con respecto a la PGK<sub>B</sub> recombinante del mismo (319 U/mg).

Por otra parte, el análisis comparativo entre la PGK<sub>B</sub> de epimastigotes de *T. cruzi* y la de humanos, expuso una gran cantidad de diferencias, tanto a nivel cinético como de estructura primaria, ya que la PGK de humanos presenta valores de  $K_{m3PGA}$  de 1100  $\mu$ M y  $K_{mATP}$  370  $\mu$ M (Yoshida *et al.*, 1972), siendo las determinadas en este trabajo de  $K_{m3PGA}$  625  $\mu$ M y  $K_{mATP}$  99  $\mu$ M, lo que sumado a la identidad de 45 % obtenida al alinear las secuencias de aminoácidos con la de humanos, son resultados que permiten establecer claras diferencias estructurales y funcionales, que pueden ser explotadas para el desarrollo de inhibidores específicos contra este organismo patógeno, lo que permitirá considerar a la PGK<sub>B</sub> de *T. cruzi* como un posible blanco quimioterapéutico. Sin embargo, hay que tener presente que estos valores de  $K_m$  han sido determinados en sentido gluconeogénico de la reacción, pudiendo esto ser una limitante, a la hora de considerar en el sentido glicolítico, diferencias en el aspecto cinético.

### ***Cinética de inhibición***

Al evaluar el efecto de la turbecidina monofosfato (TuMP), el adenosin monofosfato (AMP), y pirofosfato inorgánico (PPi), no se observaron cambios cinéticos en la actividad de la PGK<sub>B</sub> de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* a pesar de haber probado concentraciones elevadas (de 400 mM para TuMP, 2 mM PPi, 2 mM AMP). Estas moléculas (a excepción del PPi) han mostrado un efecto inhibitorio sobre la actividad de la PGKB de *T. brucei* (Drew et al., 2003; Opperdoes et al., 1987) se cree que debido a la similaridad estructural con el ATP y el ADP, tienen un efecto inhibitorio sobre la PGK<sub>B</sub>, (Bressi et al., 2000). En el caso del PPi, su efecto inhibitorio sobre enzimas glicolíticas ha sido puesto en evidencia en *T. cruzi*, modula la actividad de la PEPCK (Acosta et al., 2004), e inhibe la actividad de algunas enzimas glicolíticas como HK (Cáceres et al., 2003) y enolasa de *Trypanosoma cruzi* (Domingo, 2004), actuando sobre la PGK<sub>A</sub> recombinante de epimastigotes de *T. cruzi* como un activador alostérico (Barros, 2006). Moléculas análogas al PPi (bifosfonatos) han sido reportadas como inhibidores de la PGK humana (Kotsikorou et al., 2006). Sería interesante evaluar el efecto que tienen estos bifosfonatos sobre la PGK<sub>B</sub> de *T. cruzi*, ya que el PPi no produjo ningún cambio en la actividad de esta, revelando así

posibles diferencias en cuanto a la efectividad y especificidad de inhibición al compararlos con su contraparte Humana. El hecho de que moléculas como el AMP y la TuMP no tengan un efecto sobre la actividad PGK<sub>B</sub> de *T. cruzi*, pone en evidencia diferencias con respecto a la PGK<sub>B</sub> de *T. brucei*, la cual si es afectada por la presencia de estas moléculas en el medio.

La única molécula de las ensayadas, que presentó un efecto inhibitorio sobre la isoenzima de este estudio fue la suramina, provocando una inhibición de tipo mixta, por lo que se reportan dos valores de constantes de inhibición, para cada sustrato.  $K_{is}$  de 3,89  $\mu$ M  $K_{ij}$  de 218  $\mu$ M para el ATP y  $K_{is}$  de 9,19  $\mu$ M  $K_{ij}$  17,59  $\mu$ M. En las inhibiciones mixtas estas dos constantes de inhibición representan distintos estados de asociación de la molécula inhibidora a la enzima, el  $K_{is}$  cuando el inhibidor se asocia a la enzima libre y el  $K_{ij}$  cuando se asocia al complejo enzima sustrato, siendo esta última por lo general mayor. Sin embargo la diferencia drástica entre las dos constantes  $K_{is}$  y  $K_{ij}$  para el ATP estaría indicando que en ausencia de sustrato, la enzima tiene mayor afinidad por el inhibidor. Esto sugiere que la unión del ATP al sitio activo genera cambios estructurales en la PGK que traen como consecuencia una pérdida drástica de la afinidad del inhibidor por la PGK<sub>B</sub>. Se ha propuesto que la suramina es capaz de interactuar con enzimas glicolíticas, por la presencia de cargas positivas en la superficie de dichas proteínas (Misset *et al.*, 1987). El ATP, al unirse a su sitio de reconocimiento,

podría inducir un cambio en la disposición de regiones con carga positiva, lo que disminuiría la afinidad del inhibidor. Por otra parte los valores de inhibición determinados para el otro sustrato (3PGA) no difieren mucho entre si, lo que probablemente se deba al mecanismo de acción para este inhibidor (Bisaggio *et al.*, 2006), el cual interactúa con las cargas positivas presentes en la enzima cuya distribución no es afectada por los cambios estructurales que puedan ocurrir por la unión del 3PGA a su sitio de reconocimiento en la PGK<sub>B</sub>. Adicionalmente se conoce que la PGK tiene un mayor número de residuos de aminoácidos con cadenas laterales positivas en el dominio de unión del ATP que en el de unión a 3PGA (Misset *et al.*, 1987), lo que se correlaciona con el efecto observado para el ATP sobre la inhibición de la suramina y como cambia dependiendo si la enzima está o no formando complejo con este sustrato.

Se estudió el efecto de la suramina sobre el crecimiento de epimastigotes en medio LIT, ya que había sido reportado previamente que con 500  $\mu\text{M}$  de suramina se inhibía en 70 % el crecimiento de los parásitos en el medio de cultivo, induciéndose a su vez cambios en su morfología (Bisaggio *et al.*, 2006), por lo que se decidió determinar el IC<sub>50</sub>, el cual fue de 240  $\mu\text{M}$ , un valor alto comparado con el efecto de inhibidores más específicos, como los bifosfonatos para la HK de *T. cruzi* (Hudock *et al.*, 2006). Probablemente este elevado valor se deba a que la suramina actúa

en más de un sitio blanco, inhibiendo varias enzimas y proteínas transportadoras (Bisaggio *et al.*, 2006), por lo que las cantidades de inhibidor necesarias para disminuir en un 50 % el crecimiento de estos parásitos es mayor en comparación con inhibidores con un solo blanco de acción. No se detectaron cambios morfológicos en los epimastigotes que crecieron en presencia de la droga, debido a la resolución de la técnica empleada, microscopía de luz, estos cambios se han reportado en estudios previos, visualizados mediante el empleo de técnicas con mayor resolución como la microscopía electrónica de barrido (Bisaggio *et al.*, 2006). A pesar del alto valor de  $IC_{50}$  encontrado para la suramina, el diseño de inhibidores más específicos contra la  $PGK_B$  es una tarea que se debe desarrollar, ya que esta isoenzima es desde el punto de vista Actividad Especifica la más importante de las tres isoenzimas PGK presentes en el parásito, por lo que se requiere complementar la información obtenida en este estudio con datos adicionales provenientes de la estructura como tal de la proteína, el modelado matemático (para el estudio del control de flujo metabólico) y otras herramientas computacionales (una vez obtenida la estructura cristal de esta isoenzima) como lo son: “Three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR)”, análisis de campo por comparación molecular (CoMFA) y análisis del índice de similitud por comparación molecular (CoMSIA), entre otros, nos permitirán predecir y realizar análisis cuantitativos

para la interacción con moléculas, facilitando de esta manera el desarrollo de inhibidores específicos como drogas antiparasitarias.

## **Conclusiones.**

.- Se logró purificar la PGK<sub>B</sub> de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con un alto factor de purificación.

.- La PGK<sub>B</sub>, de epimastigotes de *T. cruzi*, presenta diferencias cinéticas y de estructura primaria con respecto a su homóloga en humanos, lo que permitiría considerarla como un posible blanco quimioterapéutico, para el diseño racional de drogas contra *T. cruzi*.

.- La actividad de esta isoenzima no se ve afectada por el AMP o TuMP, moléculas que han sido reportadas previamente como inhibidores de la PGK<sub>B</sub> de *T. brucei*.

.- Los valores de  $K_m$  determinados para esta isoenzima (en dirección gluconeogénica), tanto para el ATP como para el 3PGA, fueron menores, comparados con las constantes determinadas para otros organismos, teniendo en este aspecto mayor similitud con la enzima de levadura, que con las de tripanosomátides. El hecho de que estas enzimas tengan un menor  $K_m$  en este sentido en comparación con la de otros tripanosomátides sería un indicativo de que esta isoenzima actúa en sentido gluconeogénico.

.- La suramina inhibe a la PGK<sub>B</sub> de epimastigotes de *T. cruzi*, esta información puede ser empleada para el desarrollo de moléculas inhibidoras más eficientes, contra esta isoenzima.

.- La suramina inhibe el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* en un medio de cultivo complejo, lo que indica que la droga es capaz de acceder al interior de la célula, aunque el valor del IC<sub>50</sub> es mayor que el determinado con la enzima pura, hecho que refuerza lo observado en otros trabajos de que la droga tiene otros sitios blanco adicionales a la PGK<sub>B</sub> de estos parásitos.

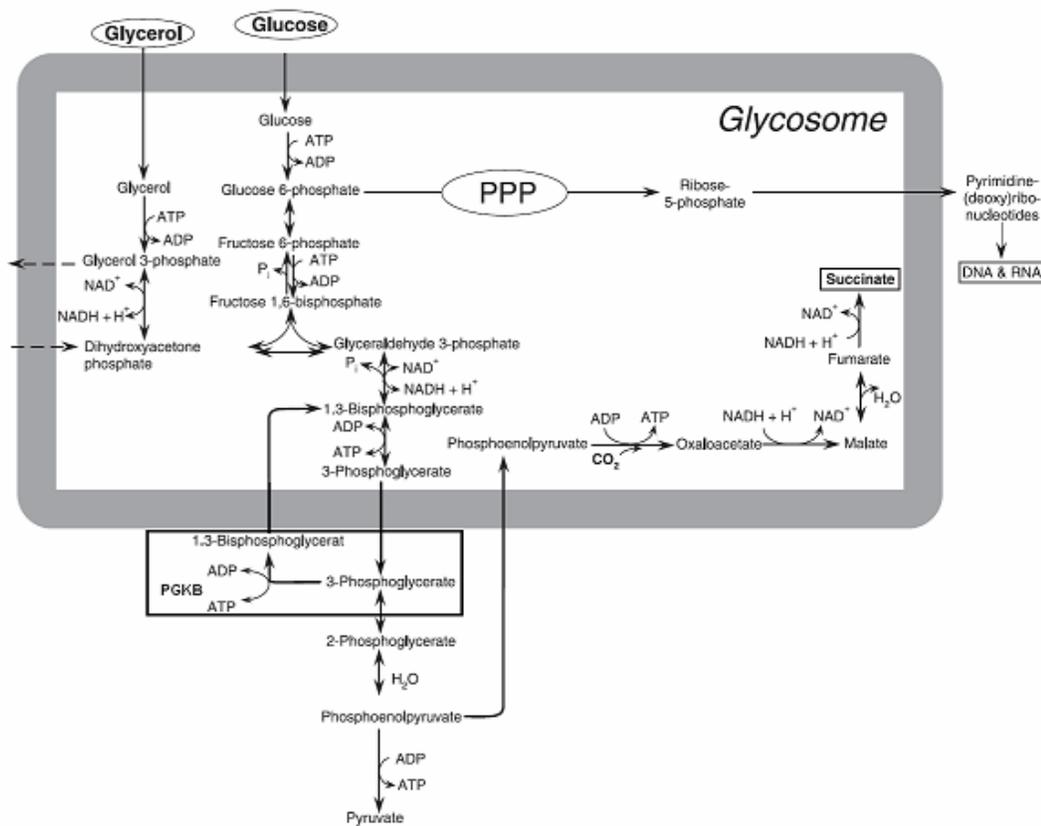


Figura 11. Papel metabólico de la PGKB en *T. cruzi*.

## Referencias.

Acosta, H., Dubourdiu, M., Quiñones, W., Cáceres, A., Bringaud, F., Concepción, J. (2004). Pyruvate phosphate dikinase and pyrophosphate metabolism in the glycosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 138: 347-356.

Adjé, C., Opperdoes, F., Michels, P. (1997). Organization, sequence and stage-specific expression of the phosphoglycerate kinase genes of *Leishmania mexicana mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 90: 155-168.

Alexander, K., Parsons, M. (1993). Characterization of a divergent glycosomal microbody phosphoglycerate kinase from *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 60: 265-272.

Baron, S. (1996). *Medical Microbiology*. 4th edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston. Libro en línea [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

Bakker, B., Michels, P., Opperdoes, F. y Westerhoff, H. (1997). Glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei* can be understood in terms of the kinetics of the glycolytic enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 3207-3215.

Barret, M., Brchmore, R., Stich, A., Lazzari, J., Frasch, A., Cazzulo, J., Krishna, S. (2003). The trypanosomiasis. *The Lancet*. 362: 1469-1480.

Barros, X. (2006). Caracterización bioquímica y estudios sobre el papel de la Fosfoglicerato Kinasa A (PGKA) en el metabolismo intermediario de *Trypanosoma cruzi*. Trabajo especial de grado. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Mérida.

Bentahir, M., Feller, G., Aittaleb, M., Lamotte-Brasseur, J., Himri, T., Chessa, J-P., Gerday, C. (2000). Structural, kinetic, and calorimetric characterization of the cold-active phosphoglycerate kinase from the Antarctic *Pseudomonas sp.* TACII18, The Journal of Biological Chemistry. 275: 11147-11153.

Bernstein, B., Michels, P., Hol, W. (1997). Synergistic effects of substrate-induced conformational changes in phosphoglycerate kinase activation. Nature. 385: 275-278.

Bergmeyer, H. (1983). Methods of enzymatica analysis. New York Academy Press.

Besteiro, S., Barret, M. P., Rivière, L., Bringaud, F. (2005). Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux. Trends in Parasitology. 21: 185-191.

Bisaggio, D., Campanati, L., Pinto, R., Padrón, T. (2006). Effect of suramin on trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: Changes on cell motility and on ultrastructure of the flagellum-cell body attachment region. *Acta Tropica*. 98: 162-175.

Blattner, J., Helfert, S., Michels, P., Clayton, C. (1998). Compartmentation of phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei* plays a critical role in parasite energy metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95: 11596-11600.

Blum, J. (1993). Intermediary metabolism of Leishmania. *Parasitology Today*. 4: 118-122.

Bressi, J., Choe, J., Hough, M., Buckner, F., Van Voorhis, W., Verlinde, C., Hol, W., Gelb M. (2000). Adenosine analogues as inhibitors of *Trypanosoma brucei* phosphoglycerate kinase: Elucidation of a novel binding mode for a 2-amino-N6-substituted adenosine. *American Chemical Society*. 22: 4135-4150.

Bringaud, F., Baltz, D. y Baltz, T. (1998). Functional and molecular characterization of a glycosomal PPI-dependent enzyme in trypanosomatids: pyruvate phosphate dikinase. *Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of America*. 95: 7963-7968.

Bringaud, F., Rivière, L., Coustou, V. (2006). Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 149: 1-9.

Burleigh, B., Andrews, N. (1995). The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annual reviews Microbiology*. 49: 175-200.

Cáceres, A., Portillo, R., Acosta, H., Rosales, D., Quiñones, W., Avilán, L., Salazar, L., Dubourdiou, M., Michels, P., Concepción, J. (2003). Molecular and biochemical characterization of hexokinase from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 126: 251-262.

Cazzulo, J. (1992). Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *The FASEB Journal*. 6: 3153-3161.

Cazzulo, J., de Cazzulo, B., Engel, J., Cannata, J. (1985). End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 16: 329-343.

Cevallos, A., Hernández, R. (2003). Microbios en línea, Capítulo 19: *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Departamento Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Libro en línea [www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/)

Chagas, C. (1909). Nova tripanosomiazze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi, agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1: 159-218.

Concepción, J., Adjé, C., Quiñones, W., Chevalier, N., Dubourdiou, M., Michels, P. (2001). The expression and intracellular distribution of phosphoglycerate kinase isoenzymes in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 118: 111–121.

Coustou, V., Besteiro, S., Bran, M., Diolez, P., Bochaud, V., Voisin, P., Michels, P., Canioni, P., Baltz, T. y Bringaud, F. (2003). ATP generation in the *Trypanosoma brucei* procyclic form: cytosolic substrate level phosphorylation in essential but not oxidative phosphorylation. *Journal Biological Chemistry*. 49: 49625-49635.

Cronín, C.N., Nolan, D.P. y Voorheis, H.P. (1989). The enzymes of the classical pentose phosphate pathway display differential activities in procyclic and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *FEBS Letters*. 1: 26-30.

Das, A., Bellofatto, V. (2004). Genetic regulation of protein synthesis in Trypanosomes. *Current Molecular Medicine*. 4: 577-584.

De Souza, W. (2002). Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brasil. *Current Pharmaceutical Desing*. 8: 269-285.

Docampo, R., (1990). Sensitivity of Parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chemical Biology Interactions*. 73: 1-27.

Docampo, R., Moreno, S. (2001). The acidocalcisome. *Molecular Biochemical Parasitology*. 33: 150-159.

Domingo, M. (2004). Ubicación subcelular, purificación, caracterización y estudios de interacción proteína-proteína de la enolasa de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Trabajo especial de grado. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida.

Drew, M., Morris, J., Wang, Z., Wells, L., Sanchez, M., Landfear, S., Englund, P. (2003). The adenosine analog turbecidin inhibits glycolysis in *Trypanosoma brucei* as revealed by an RNA interference library. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 46596-46600.

Engel, J., Cazzulo, B., Stoppani, A., Cannata, J., Cazzulo, J. (1987). Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes. *Molecular and Biochemistry Parasitology*. 26: 1-10.

Fujii, H., Yoshida, A. (1980). Molecular abnormality of phosphoglycerate kinase-Uppsala associated with chronic nonspherocytic hemolytic anemia. *Medical Sciences*. 77: 5461-5465.

Guerra-Giraldez, C., Quijada, L., Clayton, C. (2002). Compartmentation of enzymes in a microbody, the glycosome, is essential in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science*. 115: 2651-2658.

Hannaert, V., Albert, M., Rigden, D., da Silva, M., Thiemann, O., Garratt, R., Van Roy, J., Opperdoes, F., Michels, P. (2003). Kinetic characterization, structure modelling studies and crytallization of *Trypanosoma brucei* enolasa. *European Journal of Biochemistry*. 270: 3205-3213.

Hudock, M., Rodríguez, C., Song, Y., Chan, J., Zhang, Y., Odeh, S., Kosztowski, T., Rossell, A., Concepción, J., Yardley, V., Croft, S., Urbina, J., Oldfield, E. (2006). Inhibition of *Trypanosoma cruzi* Hexokinase by Bisphosphonates. *Journal of Medicinal Chemistry*. 49: 215-223.

Kitoyama, M., Togasaki, R. (1995). Purification and cDNA isolation of chloroplastic phosphoglycerate kinase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 107: 393-400.

Kotsikorou, E., Sahota, G., Oldfield, E. (2006). Bisphosphonate inhibition of phosphoglycerate kinase: quantitative structure-activity

relationship and pharmacophore modeling investigation. *Journal of Medical Chemistry*. 49: 6692-6703.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 75: 193-265.

Maslov, D., Simpson, L. (1995). Evolution of parasitism in Kinetoplastid protozoa. *Parasitology Today*. 11: 30-32.

Michels, P., Hannaert, V., Bringaud, F. (2000). Metabolic aspects of glycosomes in Trypanosomatidae new data and views. *Parasitology Today*. 16: 482-489.

Misset, O., Opperdoes, F. (1987). The phosphoglycerate kinases from *Trypanosoma brucei*. A comparison of the glycosomal and the cytosolic isoenzymes and their sensitivity towards Suramin. *European Journal of Biochemistry*. 162: 493-500.

Opperdoes, F. (1987). Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annual Review of Microbiology*. 41: 127-51.

Opperdoes, F., Michels, P. (2001). Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. *International Journal for Parasitology*. 31: 482-490.

Ortega, E. Pereira, E. (1992). Entry of *Trypanosoma cruzi* into eukaryotic cells. *Infectious Agents and Diseases* 1: 136-145.

Pabón, M.A. (2002). Hexokinasas en *Leishmania mexicana*: Ubicación subcelular y estudio cinético de un enzima clave en el metabolismo de las hexosas. Trabajo Especial de Grado. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.

Parsons, M. (2004). Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Molecular Microbiology*. 53: 717-724.

Pal, B., Pybus, B., Muccio, D., Chattopadhyay, D. (2004). Biochemical characterization and crystallization of recombinant 3-phosphoglycerate kinase of *Plasmodium falciparum*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1699: 277-280.

Peterson, G., Sommer, J., Klosterman, S., Wang, C., Parsons, M. (1997). *Trypanosoma brucei*: Identification of an internal region of phosphoglycerate kinase Required for targeting to glycosomal microbodies. *Experimental Parasitology*. 85: 16-23.

Pubill, D., Dayanithi, G., Siatka, C., Dufour, M., Guillon, G., Mendre, C. (2001). ATP induce intracellular calcium increases and actin cytoskeleton disaggregation via P2x receptors. *Cell Calcium* 29: 290-309.

Quiñones, W., Urbina, J., Dubourdieu, M., Concepción, J. (2004). The glycosome membrane of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: protein and lipid composition. *Experimental Parasitology*. 106: 135-149.

Reiche, E., Inouye, M., Pontello, R. (1996). Seropositivity for anti *Trypanosoma cruzi* antibodies among blood donors of the "Hospital Universitario Regional do Norte do Parana", Londrina, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 38: 233-40.

Schiffier, R., Mansur, G., Navin, T. (1984) Indigenous Chagas disease (American trypanosomiasis) in California. The Journal of the National American Medical Association. 251: 2983-2984.

Schofield, I. (2000). Trypanosomiasis control. International Journal for Parasitology. 31: 615-620.

Schurig, H., Rutkat, K., Rachel, R. y Jaenicke, R. (1995). Octameric enolasa from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: purification characterization and image processing. Protein Science. 4: 228-236.

Segel, I. (1993). Enzyme kinetics, behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. John Wiley & Sons, Inc. USA

Sher, A., Snary, D. (1985). Specific inhibition of the morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* by a monoclonal antibody. Nature (London). 300: 639-640.

Soares, M. (1999). The reservosomas of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: a organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 94: 139-141.

Szilágyi, A., Kotova, N., Semisotnov, G., Vas, M. (2001). Incomplete refolding of a fragment of the N-terminal domain of pig muscle 3-phosphoglycerate kinase that lacks a subdomain. Comparison with refolding of the complementary C-terminal fragment. *European Journal of Biochemistry*. 268: 1851-1860.

Tielens, A., Van Hellemond, J. (1998). Differences in energy metabolism between Trypanosomatidae. *Parasiytology Today*. 7: 265-271.

Urbina, J. (1994). Intermediary Metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*. 10:107-110.

Urbina, J. (1999). Parasitological cure of Chagas disease: Is it possible? Is it relevant?. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 94:349-355.

Urbina, J., Docampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*. 19: 495-501.

Van hellemond, J., Bakker, B., Tielens, A. (2005). Energy metabolism and its compartmentation in *Trypanosoma brucei*. *Advances in Microbial Physiology*. 50: 198-226.

Van Weelden, S., Van Hellemond, J., Opperdoes, F., Tielens, A. (2005). New functions for parts of the krebs cycle in procyclic *Trypanosoma brucei*, a cycle not operating as a cycle. *The Journal of Biological Chemistry*. 1: 12451–12460.

Verlinde, C., Hannaert, V., Blonsky, C., Willson, M., Périé, J., Fothergill-Gilmore, L., Opperdoes, F., Gelb, M., Hol, W., Michels, P. (2001). Glycolysis as a target for the desing of new anti-trypanosome drug. *Drug Resistance Updates*. 4: 1-14.

Wilkinson, K., Rose, I. (1979). Activation of yeast hexokinase PII. Changes in conformation and association. *The Journal of Biological Chemistry*. 254: 2125-2131.

W.H.O. (2007) Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales. Actualizado en 2007. [www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr).

Woody, N., Woody, H. (1955). American trypanosomiasis (Chagas' disease): first indigenous case in the U.S.A. Journal of the American Medical Association. 159:676-677.

Yoshida, A., Watanabe, S. (1972). Human phosphoglycerate kinase. crystallization and characterization of normal enzyme. The Journal of Biological Chemistry. 247: 440-445.

Zhong, L., de Souza, W., Benchimol, M., Moreno, S., Docampo, R. (1998).  $Ca^{2+}$ -content and expression of an acidocalcisomas calcium pump are elevated intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Cellular Biology. 18: 2309-2323.

Zomer, A. W. M., Allert, S., Chevalier, N., Callens, M., Opperdoes, F. R., Michels, P. A. M. (1998). Purification and characterization of the phosphoglycerate kinase isoenzymes of *Trypanosoma brucei* expressed in *Escherichia coli*. Biochimica et Biophysica Acta. 1386:179-188.