

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS



Laboratorio de Enzimología Molecular

Laboratorio de Bioquímica Microbiana

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral

Metabolismo de oligo- y polisacáridos en microorganismos. Estudio comparativo de nucleótido-azúcar pirofosforilasas.

Lic. LUCILA INES MARTINEZ

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director: Dr. Sergio A. Guerrero

Codirector: Dr. Alberto A. Iglesias

2010



I A L



Agradecimientos

Desde muy chiquita mis papás me decían “ ... siempre decí *GRACIAS*” y yo con el paso de los años entendí el significado de ese “siempre” y supe que uno debe ser agradecido de las cosas lindas que vivió, de los momentos y personas que te regalaron felicidad y alegría, pero también de esos momentos que la pasaste mal, que te hicieron doler y que preferirías olvidar...; porque detrás de esas cosas dolorosas seguro hubo algo que aprender; tal vez pensás que se te viene el mundo a bajo, pero al rato salís del bajón y entendés que con ellas uno puede tomar fuerza y sumar experiencias que servirán para dar nuevos pasos y estar más preparados para continuar con el viaje. Por eso, hoy me encuentro agradeciendo a todas las personas que fueron partícipes de lo bueno y lo malo de estos cinco años de doctorado, porque estoy convencida que todo suma a la hora del balance. Por eso, GRACIAS...

A la *Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas* y la *Universidad Nacional del Litoral* por haber aceptado y permitido realizar este trabajo de Tesis, también a todos los organismos que lo financiaron: la *Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica* (ANPCyT) y al *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas* (CONICET) por haberme otorgado las Becas de Postgrado que permitieron elaborar este trabajo de Tesis.

Al *Dr. Sergio Guerrero*, por haberme animado en realizar el doctorado, por su dirección, su paciencia, charlas y consejos. Al *Dr. Alberto Iglesias* por darme la posibilidad de realizar este Trabajo de Tesis y por dirigirlo.

A esa persona que desde mi primer día en el laboratorio empezó a construir un relación inmejorable, *Vane*, una amiga como pocas, que está y estuvo a mi lado día tras día, que con un simple “hola Luci, ¿cómo estas?” me bastó para ponerle ganas al día de trabajo, que con un simple abrazo me levantó el ánimo cuando me sentía abatida, la que escucho atentamente mis penas y pesares y con una sencilla palabra de aliento me hizo entender que no todo está perdido. A ella, que confió en mí para guardar sus secretos, la que siempre estuvo con una sonrisa a la hora de miles de festejos. Infinitamente gracias por estar a mi lado todos estos años (te los debo). Salud Vane!!! con un rico tinto pero sin volcar !!!

A el pibe más loquito que conocí en mi vida, *Matías*, gracias por tu preocupación continua por cómo me siento, por regalarme tu cuota diaria de energía positiva en los pasillos

Vaaamos Lucila Inés !!!!, o Claro que siiiii!!!!. Por compartir la pena al mudarme de laboratorio, por el cariño que me regalaste todos estos años y por jugar carreras de *patines flojos* conmigo. Perdón si alguna vez te puse la traba. A tu salud brindo!!! (Después de una *lassagna* por supuesto).

Al que desde mi primer día en *el otro* laboratorio me hizo sentir parte del lugar, me recibió con los brazos abiertos y confió en mis capacidades organizativas y de logística, *Carlitos*, ese compañero que logró ser amigo, con su cálida y respetuosa presencia hizo que me sienta más que a gusto. Gracias por los consejos y datos útiles a la hora de ponerse serios y trabajar en la mesada, sólo vos podés soportar con tanta paciencia las miles de preguntas que me surgieron durante el trabajo. Gracias por compartir tantos encuentros, viajes, fondues, y más, y por ayudar en la lucha diaria por ganar la radio. Gracias por respetar mis silencios y también por *poguear* juntos tantos *rockandroles*. Salud amigo (claro con fernet en probeta de 500 ml)!!!

A *Dieguito*, el Dr, ese que tuve que soportar tan gustosamente hablándome enamoradamente de las óxidos reducciones, al apasionado de todo, al que más de una vez me retó y trató de hacerme entender cómo es esto de la química en la vida, por sus clases de biología marina después de un tequila, por preocuparse por mis resultados de la *mejor manera*. Por bancarse mis bromas y por ser un excelente petizo, laborador y compañero de congresos parasíticos. Brindamos con una masas finas de la 9 de Julio!!!

Mil gracias a *Ana*, por tu cariño silencioso, por hacerme llorar y reír a la vez con tus secretos de familia, por respetar mis locuras a la fuerza, por intentar que la armonía se instale. Por las palabras de aliento siempre. Sin tus clases de actividad enzimática verdosas y radiactivas este trabajo no sería posible. Gracias por el afecto de todos estos años. A tu salud con helado de frutilla!!!

A *Gabi* por meterse de a poco en mi vida, por regalarme esos disparates que más de una vez me sirvieron para levantar el ánimo, por palabras, palabras y más palabras que generamos en los momentos de descanso. Por hacerme partícipe de tus alegrías, escuchar mis locuras y animarme constantemente. ¿Brindamos con un chicharrón recién hecho?. Claro que también quiero decir gracias a *Vani* porque en este último tiempo te acercaste a mí y de ahí no pude para de reír. Tus canciones inventadas, otras traídas de años luz, tus rimas científico-chabacanas son la cuota justa de humor que un becario necesita para

sobrevivir entre *papers*, seminarios y teorías. (Me parece que quedó una cervecita negra en la heladera del Ale, la abrimos?). No puedo dejar de agradecer a *Vane*, *Gabi* y *Vani* por iluminar mi casa (piso, paredes, sillas, sillones, baño, patio) con su *shibré de alegría!!!!!!*

Al *Crithidiasman*, *Matías*, por tu disparatada y ciclotímica presencia que tanto me divierte, por el afecto en forma de abrazo volador !!! . También al *Ale*, que con tu presencia respetuosa y prolija pusiste la mejor energía para tratar con alumnos tan dispersos, mil gracias por ser el mejor maestro cervecero !!!, a *Ceci* por su infinita paciencia y cariño, por entender mis angustias y tratar de levantarme el animo siempre, por tan delicada compañía entre pipetas y tubos, a *Matías* por dedicarme exclusivamente una canción al son de “Lu, Lucita, Lucecita” y por la ayuda indispensable cuando la informática me supera; gracias a *Mabel*, por compartir tu cocina y por recibirme con tanta buena onda, por cantar conmigo en varias ocasiones los hits redondos, Vencedores vencidos y la Bestia Pop... a brillar !!!.

A *Vero*, por tus charlas secretas de pasillo, por los consejos intercambiados y por soportar mis locuras tanto tiempo. Muchas gracias a *César* por el cariño y respeto que me regalaste, por compartir divertidas historias de vida. A todos los que integran/ron este *equipo de trabajo*: *Caro*, *Gastón*, *Belén*, *Esteban*, *Jorge*, *Erika*, *Andrea*, *Lisi*, *Johana*, *Mechi*, *Matías H*, *Ana*, *Jimena*, *Silvia* y *Virginia*. Todos ustedes son parte de este trabajo, gracias por aguantarme todos estos años.

A *Dr. Sergio Garay* del Departamento de Física, gracias a su dedicación y esfuerzo en ayudar a realizar los modelos de las proteínas con las que trabajamos, por su enorme trabajo aportado y por estar siempre dispuesto a contestar mis dudas. A la gente de el LETH, por recibirme en su laboratorio, por los equipos prestados y por estar atentos a darme una mano; mención especial: *Lucas* por ser un excelente compañero-amigo, por los lindos momentos que disfrutamos !!! . Así también a la gente de Biología, “*los de arriba*” y “*los de abajo*”, por material, equipos y consejos intercambiados, por su solidaridad constante y desinteresada, gracias por ser excelentes compañeros !!!.

Especialmente a *Vale*, acelerada y con los oídos bien abiertos escuchaste mis relatos, soportaste mis lágrimas y me aconsejaste, me retaste y me pusiste en órbita cuando me iba a pique. Me llenaste de alegría con tus disparates de mamá, gracias por hacerme partícipe de tu hermosa familia y por soportar mi distancia. *Vir*, desde el primer día en la Niño Jesús supe que eras especial, gracias por tantos días de alegría, por estar cerca a pesar de estar

lejos, por ser mi amiga infinita. No se cómo agradecerles que hayan caminado junto a mi todos estos años. Gracias amigazo *Coqui* !!! *Paula, Agustina, Cele y Yani* gracias por su disparatada amistad.

A esos con los que río al ritmo de los movimientos, con los que comparto los pisos y escenarios más diversos, los que forman parte de ese *dígalo con música* constante, con los que discutí tantas veces, y nos envenenamos con piña colada, a *LaChiva (en el patio)*.... *Vir, Carlitos, Yanina, Gus*, más *Matías, Julio, Daniel y Sergio*. Gracias por compartir esta otra pasión conmigo, la que más de una vez sirvió para minimizar los efectos de la ciencia sobre mí. Gracias por tanto desparramo de alegría. Y no puedo dejar de agradecer a *los prestados*, sí, prestados del Guille, que son como propios, *Chino, Lucas, Negro, Chuky, Ita*, por tantos momento de diversión, por la buena onda que siempre me regalaron, por miles de asados, fernet, recitales, cervezas, tacos, cerro Uritorco, Capilla, fondeu, y más y más.

Simplemente gracias a *Mari, César, Jesús, Larisa*, también *Eduardo y Verónica* por el gran afecto que recibí siempre de ustedes, por hacerme sentir parte de la familia y soportar mi carácter. Especialmente a *Alejo y Thaís* por regalarme los más lindos disparates y alegrías, por tantos “Tía Luciii”. A *Daniel* por ser parte de tan lindos recuerdos.

Mi familia, sin más, La mejor!!! *Negro y María Elisa*, mil gracias por enseñarme a luchar siempre y a no bajar los brazos, *Belén* por ser más que una hermana una amiga, por escucharme y aconsejarme en los días de bajón, *Laura* por tus relatos y charlas de sobremesa y compartir conmigo tu mayor tesoro: *Tao y León*. *Marisa* por que a pesar de estar a millones de kilómetros siempre estás cerca, gracias por compartir tus increíbles vivencias. A *Guille*, mi súper hermano, por tus silencios, por tu generosidad y predisposición permanente, por tantos momentos de emocionantes alegrías. A *Tao y León*, por regalarme tanta ternura y dejarme ser parte de su crecimiento. Gracias por compartir actos de escuela, partidos de fútbol, tenis, metegol en el garaje de la abuela, y miles de inolvidables momentos. Ustedes llenan mi vida de chispitas de cariño. Gracias FAMILIA !!!

Por regalarme cada día tú presencia, por bancarte y soportar mi mala onda, mis bajones mis silencios, mis ausencias, mis defectos, mis locuras. Gracias *Gus* por tratar de comprender lo incomprendible, por hacer lo imposible para lo que tenemos funcione. Por el amor que me regalaste todo este tiempo juntos. Por tu solidaridad, por defender lo que crees que lo vale,

por compartir excelentes momentos de felicidad y tantos otros de tristeza. Por insistir en hacerme razonar, en no dejarme caer, creer siempre en mí, por valorar mi persona y mi trabajo. Por entender mis temores y ayudarme a superarlos, por prestarme el hombro para el llanto. Por los increíbles lugares que conocimos y de los cuales tanto aprendimos de la mano. Por hacer que la balanza siempre se incline para nuestro lado. Por ponerle la mejor onda a mi vida. Por ser tan especial y respetarme siempre. Infinitamente Gracias por estar a mi lado.

Simplemente, Gracias Siempre !!!

*Gracias a la Vida que me ha dado tanto
me ha dado la risa y me ha dado el llanto,
así yo distingo dicha de quebranto
los dos materiales que forman mi canto
y el canto de ustedes que es el mismo canto
y el canto de todos que es mi propio canto.*

(Violeta Parra)

Este trabajo de Tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Enzimología Molecular y en el Laboratorio de Bioquímica Microbiana de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral bajo la dirección del Dr. Sergio A. Guerrero y la co-dirección del Dr. Alberto A. Iglesias.

Parte de los resultados aquí expuestos fueron dados a conocer en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

Publicación.

Redox Regulation of UDP-glucose Pyrophosphorylase from *Entamoeba histolytica*

Lucila I. Martínez, Sergio A. Garay, Daniel E. Rodríguez, Sergio A. Guerrero, Alberto A. Iglesias

Artículo enviado para ser publicado en *Biochimie*. ISSN: 0300-9084

Reuniones Científicas.

1- **XLI REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIÓN EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.** Pinamar, Buenos Aires, Argentina, 2005.

Bacterial udp-glucose pyrophosphorylase: molecular cloning and study of the recombinant enzyme from *Streptococcus mutans*

Martínez, Lucila I; Bosco Ma. Belén; Aleanzi, Mabel; Guerrero, Sergio A; Iglesias, Alberto A.

Resumen publicado en la revista BIOCELL, vol.29, ES-P34, 2005.

2- **XXI REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE PROTOZOLOGIA.** Huerta Grande; Córdoba, Argentina, 2006.

Udp-glucosa pirofosforilasa en tripanosomatidos: clonado molecular y estudio de la enzima recombinante de *Trypanosoma brucei*

Martínez, Lucila I.; Guerrero, Sergio A. e Iglesias, Alberto A.

3- **XLII REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIÓN EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.** Rosario, Santa Fe, Argentina, 2006.

Molecular cloning and characterization of Udp-glucose pyrophosphorylase from *Trypanosoma brucei*

Martínez, Lucila I.; Guerrero, Sergio A. e Iglesias, Alberto A.

4- **XLIII REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIÓN EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.** Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 2007.

Construction and characterization of a chimeric Ndp-glucose pyrophosphorylase

Martínez, LI; Guerrero, SA; Preiss, J; Iglesias, AA.

Resumen publicado en la revista BIOCELL, vol.31, EN-P20, 2007

5- **XLIV REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIÓN EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.** Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, 2008.

Characterization of *Entamoeba histolytica* Udp-glc pyrophosphorylase. Studies on redox regulation of the enzyme activity

Martínez, Lucila I.; Guerrero, Sergio A. e Iglesias, Alberto A.

Resumen publicado en la revista BIOCELL, vol.32, EN-P09, 2008

7- **XXIV REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE PROTOZOLOGIA.** Santa Fe; Santa Fe, Argentina, 2009.

Indicios de regulación redox de la actividad de la enzima Udp-glucosa pirofosforilasa de *Entamoeba histolytica*

Martínez, Lucila I.; Guerrero, Sergio A. e Iglesias, Alberto A.

Resumen publicado en la Revista Médica de Rosario, vol.75, BIO-8, 2009

ÍNDICE

ABREVIATURAS -----	<i>i</i>
1. INTRODUCCIÓN -----	1
1.1 Microorganismos -----	1
1.1 <i>Streptococcus mutans</i> -----	2
1.1.1.1 Generalidades -----	2
1.1.1.2 Estructura de la pared celular -----	3
1.1.1.3 Síntesis de polímeros -----	4
1.1.1.4 Metabolismo de hidratos de carbono -----	6
1.1.1.5 Adherencia y biofilme -----	7
1.1.2 Protistas -----	7
1.1.2.1 Tripanosomátidos -----	9
1.1.2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	15
1.1.2.2.1 Generalidades -----	15
1.1.2.2.2 Morfología y ciclo de vida -----	15
1.1.2.2.3 Enfermedad, transmisión y tratamiento -----	16
1.1.2.2.4 Naturaleza de los glicoconjugados en <i>T. cruzi</i> -----	17
1.1.2.3 <i>Trypanosoma brucei</i> -----	19
1.1.2.3.1 Generalidades -----	19
1.1.2.3.2 Morfología y ciclo de vida -----	19
1.1.2.3.3 Enfermedad, transmisión y tratamiento -----	21
1.1.2.3.4 Cubierta de VSG -----	21
1.1.2.4 <i>Entamoeba histolytica</i> -----	23
1.1.2.4.1 Generalidades -----	23
1.1.2.4.2 Morfología y ciclo de vida -----	24
1.1.2.4.3 Enfermedad, transmisión y tratamiento -----	26
1.1.2.4.4 Características del metabolismo redox -----	27
1.1.2.4.5 Metabolismo celular -----	28
1.1.2.4.6 La superficie celular de la ameba -----	29
1.2 Hidratos de Carbono -----	31
1.2.1 Características generales -----	31
1.2.2 Los Glicoconjugados -----	33
1.2.3 Utilización de la glucosa -----	33
1.2.4 La molécula de UDP-Glc -----	34
1.2.5 UDP-Glc pirofosforilasa -----	35
1.2.5.1 UDP-GlcPPasas bacterianas -----	37
1.2.5.2 UDP-GlcPPasas eucariotas -----	39
1.3 Cuestión de supervivencia -----	42
2. OBJETIVOS -----	43
3. MATERIALES Y MÉTODOS -----	44
3.1 Reactivos y enzimas comerciales -----	44
3.2 Vectores utilizados -----	44
3.3 Cepas bacterianas utilizadas -----	45
3.4 Medios de cultivo -----	45
3.5 Antibióticos -----	45

3.6 Microorganismos empleados -----	45
3.7 Extracción de ADN -----	46
3.8 Electroforesis en gel de agarosa -----	46
3.9 Oligonucleótidos -----	47
3.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) -----	49
3.11 Generación del gen quimérico -----	49
3.12 Mutagénesis sitio-dirigida -----	49
3.13 Clonado de los genes -----	50
3.14 Transformación de <i>E. coli</i> por le método de CaCl ₂ -----	50
3.15 Extracción de ADN plasmídico y secuenciación -----	50
3.16 Subclonado -----	51
3.17 Expresión de las proteínas recombinantes -----	51
3.17.1 Expresión de la UDP-GlcPPasa y quimera -----	51
3.17.2 Expresión de la <i>Sm</i> UDP-GlcPPasa sin etiqueta de histidinas -----	51
3.18 Purificación de las enzimas recombinantes -----	52
3.18.1 Purificación de las UDP-GlcPPasas fusionadas a etiquetas de histidinas, quimera y mutantes -----	52
3.18.2 <i>Sm</i> UDP-GlcPPasa sin etiqueta de histidinas -----	52
3.19 Medida de actividad enzimática -----	53
3.19.1 Medida de actividad de UDP-GlcPPasa -----	53
3.19.1.1 Sentido de pirofosforólisis de UDP-Glc -----	53
3.19.1.2 Sentido de síntesis de UDP-Glc -----	53
3.20 Análisis cinético -----	54
3.21 Contenido proteico -----	54
3.22 Electroforesis en gel de poliacrilamida -----	54
3.23 Estimación de la masa molecular de las proteínas en estado nativo --	54
3.24 Modelado por homología -----	55
3.25 Ensayos de oxido-reducción -----	55
3.26 Electrotransferencia seguida de inmunodetección -----	56
3.27 Inmunolocalización de la UDP-GlcPPasa en <i>E. histolytica</i> -----	56
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	58
4.1 CAPÍTULO 1: Caracterización de la enzima UDP-GlcPPasa de <i>Streptococcus mutans</i> -----	58
4.1.1 Aislamiento y clonado del gen que codifica para la UDP-GlcPPasa de <i>S. mutans</i> -----	58
4.1.2 Expresión y purificación de la enzima <i>Sm</i> UDP-GlcPPasa -----	60
4.1.3 Caracterización funcional de la enzima <i>Sm</i> UDP-GlcPPasa -----	61
4.1.3.1 Evaluación de la actividad enzimática -----	61
4.1.3.2 Caracterización cinética de la enzima -----	61
4.1.3.3 Determinación de la estructura cuaternaria -----	63
4.1.3.4 Generación de la enzima quimérica <i>Sm</i> UDP-GlcPPasa/ <i>Ec</i> ADP- GlcPPasa C-terminal y estudios de regulación -----	63
4.2 CAPÍTULO 2: Caracterización de la enzima UDP-GlcPPasa de <i>Entamoeba histolytica</i> -----	70
4.2.1 Aislamiento y clonado del gen que codifica para la enzima UDP-GlcPPasa de <i>Entamoeba histolytica</i> -----	70
4.2.2 Expresión y purificación de la enzima <i>Eh</i> UDP-GlcPPasa -----	72

4.2.3 Caracterización funcional de la enzima <i>Eh</i> UDP-GlcPPasa -----	74
4.2.3.1 Evaluación de la actividad enzimática y determinación de los parámetros cinéticos -----	74
4.2.3.2 Regulación redox sobre la actividad de la enzima <i>Eh</i> UDP-GlcPPasa -----	75
4.2.4 Modelado por homología de la <i>Eh</i> UDP-GlcPPasa -----	80
4.2.5 Caracterización de las enzimas mutantes en cisteínas y metionina --	84
4.3 CAPÍTULO 3: Caracterización de la enzima UDP-GlcPPasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Trypanosoma brucei</i> -----	88
4.3.1 Aislamiento y clonado de los genes que codifican para la enzima UDP-GlcPPasa de <i>T. cruzi</i> -----	88
4.3.2 Expresión y purificación de las enzimas UDP-GlcPPasas de <i>T. cruzi</i>	90
4.3.3 Caracterización funcional de las enzimas <i>Tc</i> UDP-GlcPPasa1 y <i>Tc</i> UDP-GlcPPasa2 -----	91
4.3.3.1 Evaluación de la actividad enzimática y determinación de parámetros cinéticos -----	91
4.3.3.2 Regulación redox sobre la actividad de las enzimas <i>Tc</i> UDP-GlcPPasa1 y <i>Tc</i> UDP-GlcPPasa2 -----	92
4.3.4 Clonado y expresión del gen que codifica para la enzima UDP-GlcPPasa de <i>T. brucei</i> -----	97
4.3.5 Caracterización funcional de la enzima <i>Tb</i> UDP-GlcPPasa	99
4.3.5.1 Evaluación de la actividad enzimática y determinación de parámetros cinéticos -----	99
4.3.5.2 Regulación redox sobre la actividad de la enzima <i>Tb</i> UDP-GlcPPasa -----	99
5. CONCLUSIONES -----	105
6. RESUMEN -----	110
7. ABSTRACT -----	114
8. BIBLIOGRAFÍA -----	118

ABREVIATURAS

μg	microgramo
μl	microlitro
μM	micromolar
μmol	micromol
3PGA	glicerato-3-P
aa	aminoácido
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP-GlcPPasa	ADP-glucosa pirofosforilasa
<i>A_e</i>	Actividad enzimática específica
AMP	adenosina-5'-monofosfato
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina-5'-trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
C-terminal	carboxi-terminal
DAB	diaminobencidina
DEAE	dietilaminoetil
dNTP	desoxirribonucleósido trifosfato
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ERN	especies reactivas del nitrógeno
ERO	especies reactivas del oxígeno
Fru-6P	fructosa-6 fosfato (F6P)
Fru-1,6bisP	fructosa 1,6 bifosfato
FITC	isotiocianato de fluoresceína
g	gramo
Gal	galactosa
GIPL	glicosilinositolfosfolípido
Glc	glucosa

Glc-1P	glucosa-1 fosfato
Glc-6P	glucosa-6 fosfato
GPI	glicosilfosfatidilinositol
GR	glutación reductasa
GSH	glutación
h	hora
IDA	ácido imino-diacético
IgG	inmunoglobulina G
IMAC	cromatografía de afinidad por metal inmovilizado
IPTG	isopropil β -D-tiogalactopiranosido
kDa	kilodalton
l	litro
LB	medio <i>Lysogeny Broth</i>
LPPG	lipopéptido fosfoglucono
M	Molar
mA	miliampere
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
MOPS	ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico
N-terminal	amino-terminal
NAD ⁺	nicotinamida-adenina dinucleótido
NADPH	nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido
NPS	nitroprusiato de sodio
nm	nanómetro
°C	grado Celsius
-P	derivado éster fosfato
p/v	peso en volumen
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa

PEG	polietilenglicol
PEP	fosfoenolpiruvato
Pi	ortofosfato inorgánico
PPi	pirofosfato inorgánico
Pyr	piruvato
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SDS	dodecil sulfato de sodio
ST	solución de transformación
T(SH) ₂	tripanotión reducido
TAE	solución TRIS-acético-EDTA
TB	medio <i>Terrific Broth</i>
TBS	solución TRIS salino
TR	tripanotión reductasa
TRIS	N-Tris-(hidroximetil) aminoetano
TRX	tiorredoxina
TRXR	tiorredoxina reductasa
TXN	triparredoxina
U	Unidades internacionales de actividad enzimática
UDP-GlcPPasa	UDP-glucosa pirofosforilasa
UTP	uridina-5'-trifosfato
UV	ultravioleta
v/v	volumen en volumen
V_{max}	velocidad máxima
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactósido

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Microorganismos

La partición de la glucosa es una etapa metabólica central en diferentes microorganismos. En este proceso, la utilización de la Glc-1P por distintas enzimas determina la producción de compuestos con funciones celulares diferentes, relacionadas con la bioenergética, con la síntesis de compuestos de la pared celular que intervienen en la interacción entre células y en la formación de agregados tipo biofilmes; así como en el metabolismo de las glicoproteínas. Por esto, el conocimiento de las propiedades de las enzimas involucradas en dichos procesos celulares es relevante para entender el metabolismo (y su regulación) de los hidratos de carbono en el organismo respectivo y las derivaciones funcionales de los mismos.

La Glc-1P es un metabolito que se encuentra en bajas concentraciones intracelulares, y es sustrato de nucleótido-azúcar pirofosforilasas que derivan al metabolito hacia diferentes caminos metabólicos. En bacterias, hay dos enzimas principales que, en este sentido, utilizan la Glc-1P: la UDP-GlcPPasa y la ADP-GlcPPasa. De esta forma, el metabolito es incorporado a la producción de polisacárido de reserva (vía ADP-Glc) o a la interconversión de la hexosa o producción de oligo- y polisacáridos estructurales (vía UDP-Glc). En otros microorganismos, la ocurrencia conjunta de ambas pirofosforilasas no es tan clara, pero la producción de distintos polímeros de Glc implica la partición de la Glc-1P. El estudio de la existencia y las propiedades de la UDP-GlcPPasa en diferentes organismos es necesaria para establecer mecanismos metabólicos de producción de polisacáridos.

El presente trabajo está basado en la caracterización de la UDP-GlcPPasa de diferentes microorganismos, así como en la realización de un análisis comparativo de las propiedades de la enzima con aquellas de la ADP-GlcPPasa, para la comprensión de cómo la Glc-1P puede ser distribuida metabólicamente y este proceso regulado en diferentes células. Se ha trabajado con los siguientes microorganismos: *Streptococcus mutans*, una bacteria involucrada en la formación de caries (Spatafora y col., 1995), donde la interacción entre bacterias y la formación de biofilmes es un proceso crítico, *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, como organismos que sintetizan oligosacáridos principalmente involucrados en la estructura y que guardan una relación evolutiva con bacterias y con eucariotas autótrofos (Previato y col., 1990; Clark y col., 2000; Barry y McCulloch, 2001; Roper y col., 2002). A

continuación se realiza una descripción breve de los microorganismos que son objetos de estudio de este trabajo de Tesis.

1.1.1 *Streptococcus mutans*

1.1.1.1 Generalidades

Streptococcus mutans (Fig. 1) es una bacteria Gram positiva, facultativa, que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana, formando parte de la placa o biofilme dental y está asociada al inicio y desarrollo de la caries dental (Ryan y Ray, 2004). Es acidofílica porque vive en medio con pH bajo, acidogénica por metabolizar los azúcares a ácidos y acidúrica por sintetizar ácidos a pesar de encontrarse en un medio de tales condiciones. Metaboliza la sacarosa para producir polisacáridos extracelulares (sustancia laxa que facilita su adhesión a las caras libres de las piezas dentarias) e intracelulares (metabolismo energético) (Loesche, 1996).



Figura 1. Fotografías de *Streptococcus mutans* tomadas de <http://www.jb.asm.org/> y <http://www.yourreturn.org/>

Clasificación taxonómica

- Reino:** Bacteria
- Filo:** Firmicutes
- Clase:** Bacilli
- Orden:** Lactobacillales
- Familia:** Streptococcaceae
- Género:** *Streptococcus*
- Especie:** *Streptococcus mutans*

S. mutans fue aislado a partir de lesiones de caries humanas por Clarke en 1924 y la ocurrencia en las mismas, fue confirmada posteriormente (Gibbons y col., 1966; Hamada y col., 1976). Estudios taxonómicos revelan que estos organismos forman un grupo homogéneo de estreptococos no móviles, catalasa negativa (Carlsson, 1968). El

Manual Bergey de Determinación Bacteriológica, indica que el género *Streptococcus* incluye los grupos de estreptococos piogénicos, orales y anaeróbicos, además de otros grupos de estreptococos (Krieg y col., 1984). Las células de *S. mutans* son esféricas u ovals de 0,5-0,75 μm de diámetro, que se encuentran de a pares o formando cortas cadenas y requieren medios nutricionales muy ricos para ser cultivados. Muchas de las cepas de estreptococos que fermentan preferentemente manitol y sorbitol en lugar de otros azúcares, y sintetizan glucano adherente soluble en agua a partir de sacarosa son consideradas *S. mutans*. Este organismo ha sido subclasificado dentro de varios tipos basados en sus propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas (Hamada y Slade, 1980). Su hábitat natural es la boca humana pero también se ha aislado a partir de heces humanas y de ratas (Finegold y col., 1975; Huber y col., 1977).

1.1.1.2 Estructura de la pared celular

La pared celular de los estreptococos contiene cuatro polímeros antigénicos principales: péptido glucano, polisacáridos tipo y grupo específicos, proteínas y glicerol formando ácidos teicoico y lipoteicoico. La pared posee una estructura de mosaico en la cual cada uno de estos polímeros esta accesible para las reacciones que ocurren en la superficie celular. La naturaleza rígida de la pared celular bacteriana se debe, en gran medida, a una macromolécula con forma de bolsa que está compuesta de N-acetil amino azúcares, ácido N-acetilmurámico y numerosos péptidos. Este polímero basal ha sido designado como “péptido glucano” (Schleifer y Kandler, 1972). El péptido glucano de *S. mutans* contiene ácido glutámico, alanina, lisina, glucosamina y ácido murámico en una relación 1:2-4:1:1:1(Hamada y Slade, 1980).

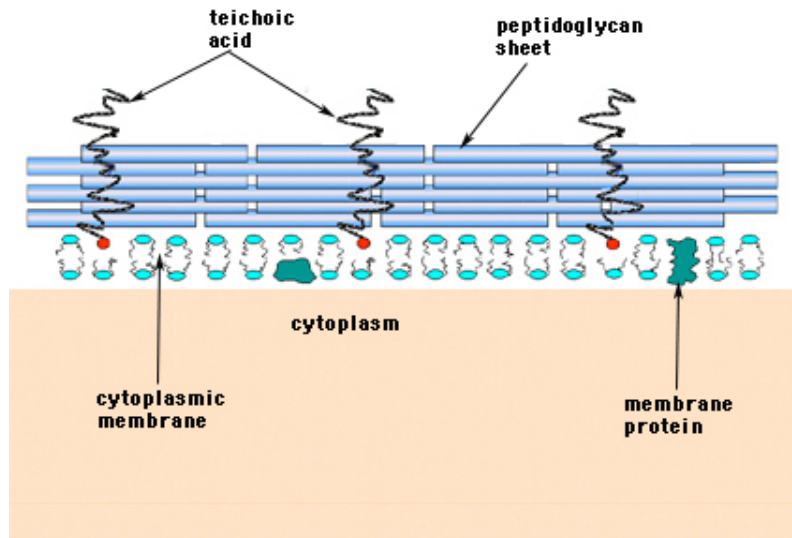


Figura 2. Esquema representativo de la pared celular de bacterias Gram positivas. Se observa la presencia de proteínas de membrana, ácido teicoico y la capa de péptidoglucano. Imagen tomada de <http://www.textbookofbacteriology.net/>.

1.1.1.3 Síntesis de polímeros

S. mutans sintetiza polisacáridos estructurales, glucanos y fructanos, a partir de sacarosa por reacción de las enzimas (2,6)-beta-D-fructan:D-glucose6-fructosyltransferase (FTasa; EC 2.4.1.10) y sucrose 6-glucosyltransferase (GTasa, EC 2.4.1.5) que cataliza la transferencia de un motivo glucosil a partir de sacarosa al sitio terminal de la molécula de glucano creciente. Estos polisacáridos, especialmente glucanos, son considerados críticos en la formación del biofilme y por lo tanto en la patogénesis de la caries dental, debido a que poseen una marcada habilidad para promover la adherencia (Hamada y Slade, 1980).

Glucanos: En general, los glucanos bacterianos contienen enlaces α 1-6 y α 1-3 glucosídicos, con ocasional ocurrencia de uniones α 1-2 ó α 1-4. La proporción de uniones α 1-3 es variable. *S. mutans* produce un dextrano lineal, soluble en agua, que consiste en un polímero lineal de glucosa con uniones α 1-6 con ramificaciones del tipo α 1-3 (Long y Edwards, 1972). También se observa la presencia de glucanos insolubles en agua que poseen mayor proporción de enlaces α 1-3, lo que les otorga la naturaleza insoluble.

Fructanos: Algunas cepas de *S. mutans* sintetizan fructanos, además de glucanos, a partir de sacarosa. Contiene tanto fructanos solubles como insolubles en agua y la

producción de éstos parece ser diferente de cepa en cepa dependiendo de las condiciones de cultivo. Por lo general, éstos representan una reserva energética para el organismo y no están relacionados con los mecanismos de adherencia (Ebisu y col., 1975; Hamada y Slade, 1980).

Polisacáridos intracelulares: Varias cepas de *S. mutans* almacenan IPS (iodine-staining polysaccharides) a partir de varios azúcares, lo que contribuye a su patogenicidad (Van Houte y Jansen, 1968). Las cepas que sintetizan IPS los degradan para producir ácidos cuando se encuentran en ausencia de hidratos de carbono externos. IPS son glucanos similares al glucógeno con enlaces α 1-4 y α 1-6, susceptibles a la acción de amilasas (Van Houte y col., 1970). Dos enzimas, la adenosina difosfato glucosa pirofosforilasa (ADP-GlcPPasa) y la ADP-Glc-glucógeno glucosiltransferasa, están involucradas en la síntesis de IPS en *S. mutans*. La ADP-Glc es sintetizada a partir de ATP y Glc-1P por la ADP-GlcPPasa, mientras que la segunda enzima cataliza la formación de glucógeno a partir de ADP-Glc. *S. mutans* produce etanol y ácido acético además de ácido láctico a partir de IPS, bajo la limitación de glucosa exógena (Huis in 't Veld y Backer Dirks, 1978).

Ácido lipoteicoico: Los ALTs están compuestos por ácido teicoico (polímero del glicerol) unido covalentemente a motivos lipídicos (Wicken y Knox, 1970), los cuales aparecen como componentes de la superficie celular y como productos extracelulares. El poliglicerofosfato (PGP) es la estructura básica de los ALTs y es responsable de la especificidad antigénica común entre los diferentes subtipos de *S. mutans* (Chorpenning y col., 1975). La naturaleza anfipática de ALT influencia fuertemente las actividades inmunológicas de este polímero único.

Otros polisacáridos importantes: las cepas de *S. mutans* se clasifican dentro de tres serotipos específicos (*c*, *e* y *f*) y la especificidad serológica esta definida por los polisacáridos formados por glucosa y ramnosa (RGP) de la pared celular (Loesche, 1986). Hay cuatro genes *rml* (de *rmlA* a *rmlD*) que están directamente relacionados con la síntesis de dTDP-L-ramnosa (Tsukioka y col., 1997a; Tsukioka y col., 1997b) y el gen *gluA* codifica para la enzima que sintetiza UDP-Glc (Yamashita y col., 1998). Los RGPs están compuestos por un esqueleto de ramnosa con uniones α 1-2 y α 1-3 a cadenas laterales de glucosa unidas de forma alternada a ramnosas. Cada polisacárido serotipo específico presenta un único tipo de unión a las cadenas laterales de glucosa (serotipo *c*, uniones α 1-2; serotipo *e*, uniones β 1-2 y serotipo *f*, uniones α 1-3). Los dos

nucleótido-azúcares, dTDP-L-ramnosa y UDP-Glc, son precursores inmediatos para la síntesis del RGP. Algunos autores han demostrado que la inactivación insercional del gen *gluA*, que codifica para la enzima UDP-GlcPPasa de *S. mutans*, resulta en la pérdida de antigenicidad del serotipo específico c, encontrándose altamente disminuidos los niveles de UDP-Glc intracelular (Yamashita y col., 1998).

1.1.1.4 Metabolismo de hidratos de carbono

S. mutans ha sido clasificada como una bacteria ácido láctica homofermentativa (Drucker y Melville, 1968) que posee la habilidad de metabolizar una variedad de azúcares para generar ácidos, lo que está directamente relacionado con su cariogenicidad. La vía metabólica que sigue la glucosa varía, dependiendo de los factores ambientales. El principal producto de fermentación de la glucosa cuando sigue el ciclo anaeróbico de Embden-Meyerhof-Parnas es el lactato, especialmente cuando el microorganismo crece en presencia de un exceso de glucosa; mientras que produce cantidades significativas de formiato, acetato y etanol, además de lactato, cuando la glucosa es limitante (Carlsson y Griffith, 1974). La sacarosa también sirve como fuente de energía durante el crecimiento de *S. mutans*, además de su rol como sustrato para la síntesis del glucano extracelular. El organismo también produce manitol cuando elevados niveles de sacarosa y glucosa están presentes en el interior celular. La glucosa es transportada al interior de la célula por un sistema fosfotransferasa (SFT) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP) asociado a membranas, el cual también transporta maltosa, manosa, fructosa, lactosa y sacarosa (Hamilton y G.C.Y.Lo, 1978; Bourassa y col., 1990).

Este microorganismo, además es capaz de metabolizar galactosa por dos vías diferentes: La vía de la tagatosa 6-fosfato y la de Leloir. En la vía de la tagatosa, el motivo galactosa de la lactosa y posiblemente la galactosa sola, puede ser transportada y fosforilada por el sistema SFT. La Gal-6P generada por una 6-P- β -galactosidasa, es convertida a tagatosa-6P, posteriormente a tagatosa-1,6-bisfosfato y luego a gliceraldehído-3P y dihidroxiacetona por las enzimas galactosa-6P isomerasa, tagatosa-6P quinasa y tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa, respectivamente. En la vía de Leloir la galactosa entra a la célula a través de una permeasa, donde es fosforilada por una galactoquinasa para generar Gal-1P, la cual es convertida a Glc-1P por una hexosa-1P uridililtransferasa y UDP-Glc epimerasa. La Glc-1P así generada puede ingresar a la vía glucolítica (Abranches y col., 2004). La habilidad de *S. mutans* para

coordinar y controlar el catabolismo de la galactosa y azúcares de galactosa está relacionada con su capacidad para competir con otras especies presentes en la cavidad oral e inducir la caries dental en humanos (Abranches y col., 2004).

1.1.1.5 Adherencia y biofilme

La adherencia de *S. mutans* y otras bacterias de la cavidad oral a la superficie de los dientes y la formación de la placa dental son de gran importancia en el desarrollo de la caries dental. *S. mutans* crece como una comunidad ensamblada a la superficie de los dientes y formando biofilmes inmersos en una matriz (Marsh, 2005). Esta organización biológica le provee un microambiente que protege a la bacteria inmovilizada (Bowden y Hamilton, 1998; Hall-Stoodley y col., 2004). La adhesión es el paso principal para la formación de biofilme. El desarrollo del biofilme sobre la superficie de los dientes limpios requiere el ataque suficientemente firme al *pellicle* (película de origen salival) que permita resistir las fuerzas limpiadoras del flujo de saliva y de los movimientos musculares. Este ataque involucra interacciones específicas de los componentes de la película con las especies bacterianas (Hamada y Slade, 1980). Los mecanismos por los cuales la bacteria se adhiere a la superficie de los dientes son blancos potenciales para la intervención anti-cariogénica. Los mecanismos de adherencia dependientes de sacarosa, como ser los mediados por enzimas extracelulares GTFs, FTFs y PUGs (proteínas de unión a glucano) juegan un rol importante en la virulencia de *S. mutans* (Kuramitsu, 1993; Banas y Vickerman, 2003). Otros mecanismos, independientes de sacarosa, pueden también promover la colonización microbiana proveyendo sitios de unión para la bacteria (Lee y col., 1989). Varios estudios indican que la expresión de los genes responsables para la formación de biofilme es dependiente de las condiciones ambientales y esta genéticamente regulada (Kiska y Macrina, 1994; Li y Burne, 2001).

1.1.2 Protistas

El reino Protista está conformado por un grupo de organismos que presentan un conjunto de características que impide colocarlos en los reinos ya existentes de una manera completamente definida. Históricamente, estos organismos fueron tratados como el reino Protistas pero este grupo no está del todo reconocido en la taxonomía moderna (Simonite, 2005). Los individuos del reino de los protistas son los que presentan las estructuras biológicas más sencillas entre los eucariotas (ya que su ADN está incluido en el núcleo de la célula), y pueden presentar una estructura unicelular (la

más común), multicelular o colonial (sin llegar a formar tejidos). Los protistas, por lo general, son autótrofos y producen un alto porcentaje del oxígeno de la tierra. Las características más comunes en la mayoría de estos organismos son detalladas a continuación, pero no todas están presentes en todos los protistas:

1. Son Eucariotas
2. No forman tejidos
3. Son autótrofos (por fotosíntesis), heterótrofos (por absorción) o una combinación de ambos.
4. Generalmente son aerobios, pero existen algunas excepciones.
5. Se reproducen sexual (meiosis) o asexualmente (mitosis).
6. Son acuáticos o se desarrollan en ambientes terrestres húmedos (Curtis y col., 2008).

Los protistas representan varios linajes filogenéticos diferentes (Adl y col., 2005). Informalmente pueden ser agrupados en autótrofos fotosintéticos (algas), unicelulares autótrofos y/o heterótrofos (euglenoideos y dinoflagelados), heterótrofos multinucleados y multicelulares (mohos mucilaginosos y acuáticos) y heterótrofos unicelulares (protozoos).

Los protistas autótrofos fotosintéticos son importantes en la producción energética global (diatomeas y crisófitas). El grupo de los unicelulares flagelados puede incluir organismos fotosintéticos, otros heterótrofos y algunos pueden incluir las dos formas de vida. Entre ellos, los dinoflagelados se caracterizan por poseer dos flagelos en planos diferentes, haciendo que el organismo gire. Los euglenoideos son de vida libre y se encuentran principalmente en aguas continentales (Marshall y Williams, 1985). Los mohos mucilaginosos son organismos heterótrofos y ameboides. Estos se reproducen por formación de esporas. Hay dos grupos principales, los mixomicetes, que son cenocíticos durante las etapas no reproductivas, y los acrasiomicetes, en los cuales las células ameboides agrupadas retienen su identidad individual. Los mohos acuáticos son heterótrofos cenocíticos. Se reproducen tanto asexual como sexualmente y sólo las esporas son flageladas.

Se piensa que los protistas heterótrofos unicelulares, ó protozoos, han evolucionado de antecesores flagelados no fotosintéticos. Entre los protozoos se encuentran algunas de las células más grandes conocidas y también las más complejas. Tres grupos, los

mastigóforos ó flagelados, los sarcodinos ó ameboides y los cilióforos ó ciliados incluyen tanto especies de vida libre como parasíticas y sus miembros pueden identificarse sobre la base de sus estructuras locomotoras (Kreier y Baker, 1987). Los protistas exhiben una variedad de respuestas por las que se desplazan frente a distintos estímulos ambientales. En la figura 3 se muestran, en forma simplificada, sólo algunos representantes del reino Protista debido a que no hay, al menos hasta el momento, un único árbol que refleje las relaciones entre todos los miembros que conforman este grupo (Curtis y col., 2008).

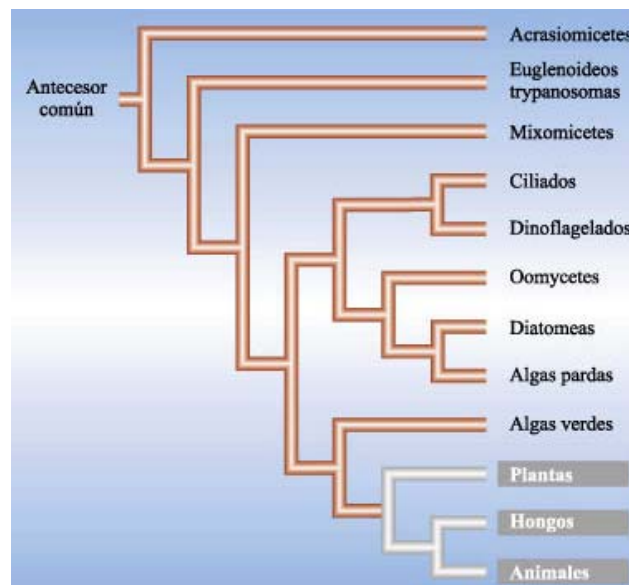


Figura 3. Esquema de las posibles relaciones filogenéticas simplificadas entre los principales grupos de protistas. Imagen tomada de Curtis y col., 2008.

1.1.2.1 Tripanosomátidos

Los tripanosomátidos son protozoos parasíticos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae (Hoare, 1972; Noble y Noble, 1976) del orden Kinetoplastida. Poseen una morfología relativamente uniforme y la habilidad de parasitar un diverso rango de hospederos incluyendo animales, plantas y otros protistas. Dentro de esta familia están comprendidos los agentes etiológicos de enfermedades tropicales como la enfermedad de Chagas o tripanosomosis americana causada por *Trypanosoma cruzi*, la tripanosomosis africana o enfermedad del sueño, causada por *Trypanosoma brucei rhodesiense* ó *T. b. gambiense*; y las diferentes formas clínicas de leishmaniosis (*Leishmania sp*) (World Health Organization, <http://www.who.int/>).

Clasificación taxonómica: Dentro del orden Kinetoplastida se encuentra la familia Trypanosomatidae, a la que pertenecen los tripanosomátidos. En dicha familia se encuentra, además del género *Trypanosoma*, otros géneros como *Leishmania*, *Phytomona*, *Crithidia*, *Herpetomonas* y *Leptomonas*, los cuales parasitan animales, plantas, insectos y reptiles, respectivamente.

Filo: Sarcomastigospora
Subfilo: Mastigospora
Clase: Zoomastigospora
Orden: Kinetoplastida
Suborden: Trypanosmatina
Familia: Trypanosomatidae
Género: *Trypanosoma* (animales)
Género: *Leishmania* (animales)
Género: *Phytomonas* (plantas)
Género: *Crithidia* (insectos)
Género: *Herpetomonas* (insectos)
Género: *Leptomonas* (reptiles)

Sobre la familia Trypanosomatidae: Los tripanosomas se desprenden a partir de la principal línea de evolución eucariota, probablemente cerca de 600 millones de años atrás (Hausler y col., 1997). Esta temprana separación puede ser la razón por la cuál ellos poseen un número de características peculiares no visualizadas en algún otro organismo:

- **Una mitocondria simple:** Los tripanosomátidos poseen una mitocondria tubular simple, en todas sus formas morfológicas y en todo su ciclo de vida (Souza, 2008). Esta mitocondria contiene el ADN kinetoplastídico, que representa el 25% del total del ADN del parásito y un conjunto de citocromos tales como el citocromo oxidasa (*aa3*), citocromos *b*, *c*, *c1* y *o* (Souza, 2003). En general, la actividad mitocondrial en los tripanosomátidos es requerida para el pasaje a través del insecto vector. Otra característica destacable de estos organismos es que poseen un único flagelo, el cual está involucrado en la motilidad y unión a sustratos (Souza, 2008).

- **ADN del kinetoplasto:** El ADN mitocondrial (ADNk) está presente en una región especializada de la célula, el kinetoplasto, el cual se localiza en el interior celular, siempre en el lugar de entrada del flagelo, en oposición a su cuerpo basal. El ADNk consiste en un gran complejo de minicírculos y maxicírculos concatenados (Simpson y col., 1987). Es equivalente al genoma mitocondrial de otros organismos y contiene un número de genes codificantes de algunos de los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial. La replicación de ADNk es mediada por ADN polimerasas y por un

conjunto de enzimas que incluye una topoisomerasa (Naula y Burchmore, 2003). El tamaño y la forma del kinetoplasto varían entre los diferentes estadios de desarrollo.

- **Edición del ARN mitocondrial:** Los maxicírculos del ADNk contienen genes incompletos y requieren de edición de sus ARNs transcritos para poder generar un producto proteico funcional. La edición es llevada a cabo con la ayuda de un gran número de ARNs guías, los cuales se encuentran codificados por diversos minicírculos.

- **Glicosomas:** Los glicosomas son pequeñas organelas semejantes a los peroxisomas, que contienen enzimas tales como catalasas y peroxidasas, pero con actividades relativamente más bajas comparándola con las correspondientes en células de mamíferos (Wendel y col., 1992). La mayoría de las enzimas de la vía glicolítica se localizan en glicosoma. Muchas enzimas de otras vías del metabolismo de hidratos de carbono, como la vía de las hexosas monofosfato, involucradas en la generación de intermediarios necesarios para el crecimiento celular, división celular y protección contra el estrés oxidativo, se encuentran asociadas a los glicosomas (Oppendoes, 1987). Además, en estas organelas tienen lugar otras funciones metabólicas como la biosíntesis de pirimidinas, la β -oxidación de ácidos grasos, biosíntesis de éter-lípidos y el salvataje de purinas (Parson, 2004; Souza, 2008).

Esta organización subcelular del metabolismo parece tener algunas consecuencias importantes para estos organismos. La adecuada biogénesis de estas organelas y el correcto ensamblado de las enzimas de la vía glicolítica en ellas es esencial para los tripanosomas cuando crecen sobre glucosa, probablemente porque la incorrecta o incompleta compartimentación afecta la regulación de la glicólisis (Cazzulo y col., 1985; Bakker y col., 2000). Es notable considerar que, el contenido enzimático de los glicosomas puede variar de manera importante entre los diferentes estadios del ciclo de vida de los tripanosomátidos y el hecho de contener enzimas involucradas en el metabolismo de hidratos de carbono dentro de estas organelas hace que sean capaces de adaptarse rápidamente a nuevas condiciones nutricionales durante su diferenciación (Michels y col., 2006).

- **Transcripción del ADN y mini-exones:** Contrariamente a lo que ocurre en otros organismos eucariotas, en la familia Trypanosomatidae, el ADN es transcrito continuamente en formas de mensajeros policistrónicos, donde las regiones codificantes no están interrumpidas por intrones. En los tripanosomas, todos los ARNm son generados por medio de *trans splicing* (Lucke y col., 1997), un mecanismo a través del cual todos los ARNs mensajeros maduros podrían recibir una secuencia líder, la cual es

denominada *spliced leader* (SL) ó mini-exón. Esta secuencia SL contiene dos dominios funcionales: exón e intrón (*ARNsm like domain*). La secuencia del exón está conservada en 38 miembros diferentes del orden Kinetoplastida, mientras que la secuencia primaria del intrón no está conservada entre los tripanosomátidos (Sturm y Campbell, 1999).

- **Ausencia de regulación transcripcional:** todos los genes son transcritos, lo que les otorga una característica única dentro de los organismos eucariotas. La regulación sólo se da a nivel post-transcripcional (Teixeira, 1998; Teixeira y daRocha, 2003).

- **Metabolismo redox:** Los tripanosomátidos presentan un número importante de peculiaridades bioquímicas, morfológicas y genéticas, presentando un metabolismo tiol redox único. Los proyectos de secuenciación de genomas de *T. brucei* (Berriman y col., 2005), *T. cruzi* (El-Sayed y col., 2005) y *L. major* (Ivens y col., 2005) han revelado que estos organismos perdieron los genes que codifican para glutatión reductasa (GR), tioredoxina reductasa (TrxR), catalasa y seleno cisteína-glutatión peroxidasas. Mientras en muchos organismos eucariotas el glutatión (GSH)/GR y los sistemas tioredoxina (Trx)/TrxR mantienen la homeostasis redox intracelular, los tripanosomátidos poseen un metabolismo redox que está basado en el ditiol de bajo peso molecular llamado tripanotión [bis(glutationil) espermidina; T(SH)₂] (Fairlamb y col., 1985) y en la enzima tripanotión reductasa (TR), la cual lo mantiene en la forma reducida (Fairlamb y Cerami, 1992). Otras moléculas que cobran importancia en este metabolismo redox son las proteínas ditiólicas de bajo peso molecular más abundantes en tripanosomátidos, las triparedoxinas (TXNs) (Nogoceke y col., 1997; Wilkinson y col., 2003; Krauth-Siegel y Comini, 2008). Son oxidoreductasas que comparten muchas características con glutaredoxinas (Grxs) y/o Trxs (estructura). De la misma manera que las Trxs, la TXN es dador de electrones para diferentes peroxidasas encontradas en este tipo de organismos (Nogoceke y col., 1997; Hillebrand y col., 2003). La vía de detoxificación de hidroperóxidos en tripanosomátidos involucra una sofisticada cascada de reacciones en las cuales el tripanotión, la TR y la TXN juegan un rol central en la movilización de equivalentes de reducción desde NADPH hacia dos tipos de peroxidasas. Además el sistema T(SH)₂/TXN genera equivalentes de reducción para la reducción de ribonucleótidos y otros procesos celulares que son regulados por intercambio tiol-disulfuro. La ausencia del sistema tripanotión en mamíferos, junto con la sensibilidad de los tripanosomas contra el daño oxidativo, hacen a los componentes de

este metabolismo redox blancos de interés para el diseño racional de drogas (Krauth-Siegel y Comini, 2008).

- **Biosíntesis y metabolismo de nucleótido-azúcares:** Los monosacáridos que forman parte de los glicoconjugados de las superficies de los tripanosomátidos varían entre las diferentes especies. Tanto *L. major*, *T. brucei* y *T. cruzi* contienen D-manosa (Man), D-N-acetilglucosamina (GlcNAc), D-glucosamina, D-glucosa y D-galactopiranososa (Galp), mientras que sólo se encuentran galactofuranosa (Galf) en *T. cruzi* y *L. major*. Sólo *T. cruzi* contiene D-xilosa (Xyl), L-ramnopiranososa (Rha) y L-fucosa (Fuc), mientras que la D-arabinopiranososa (Ara) es solamente encontrada en *L. major* (Turnock y Ferguson, 2007). Para la síntesis de estos compuestos son necesarias moléculas que actúen como dadores glucosilos y muchos de estos donantes de motivos glucosilos son los nucleótidos azúcares convencionales (Fig. 4).

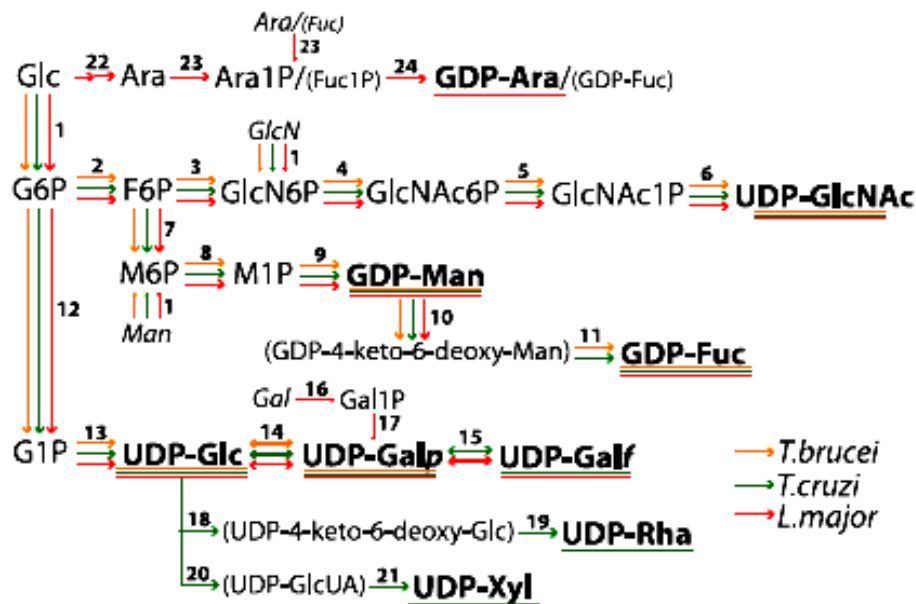


Figura 4. Esquema que resume las rutas para la biosíntesis de nucleótidos azúcares en tripanosomátidos. Los nucleótidos azúcares utilizados en al biosíntesis de glicoconjugados se representa con líneas de trazo grueso. Los intermediarios de la biosíntesis de nucleótidos azúcares se muestran entre paréntesis. Las vías de salvataje aparecen en itálica. Los números del 1 al 24 indican las enzimas que catalizan cada una de las reacciones, por ejemplo, el número 13 corresponde a la enzima UDP-GlcPPasa, 14 a la UDP-Glc 4'epimerasa, 15 a la UDP-Gal mutasa. Los colores de la líneas indican la presencia de la enzima y nucleótido azúcar correspondiente en *T. brucei* (anaranjado), *T. cruzi* (verde) y *L. major* (rojo). F1P: fructosa 1-P, F6P: fructosa 6-P, Gal1P: galactosa 1-P, G1P: glucosa 1-P, G6P: glucosa 6-P, GlcN6P: glucosamina 6-P, GlcNAc6P: N-acetilglucosamina 6-P, M1P: manosa 1-P, M6P: manosa 6-P, Ara1P: arabinosa 1-P, Fuc1P: fucosa 1-P. Imagen tomada de Turnock y Ferguson, 2008.

La UDP-Glc aparece como dador glucosilo para la UGGT (*unfolded glycoprotein glucosyltransferase*) involucrada en el control de calidad de glicoproteínas del retículo endoplasmático (Trombetta y Parodi, 2003; Helenius y Aebi, 2004). Se presume que también es dador para la síntesis de la base J (β -D-glucosilhidroximetiluracilo), un deoxinucleótido raro encontrado en la forma sanguínea de *T. brucei*, *L. major* y *T. cruzi* (van Leeuwen y col., 1998). UDP-Glc es precursor de UDP-Rha y UDP-Xyl en *T. cruzi*, siendo precursor obligado de UDP-Galp en *T. brucei* y *T. cruzi*. La demanda de UDP-Glc es elevada debido a que esta molécula es necesaria para la síntesis UDP-Galp vía UDP-Glc 4'epimerasa. La síntesis de UDP-Glc a partir de UTP y Glc-1P es llevada a cabo por la enzima UDP-Glc pirofosforilasa.

La presencia de UDP-Galp está relacionada con la presencia de Galp en muchos de sus glicoconjugados. Este es precursor obligado para UDP-Galf en *T. cruzi* y *L. major*. La única vía de obtención de UDP-Galp en *T. brucei* procíclico y sanguíneo y en epimastigotes de *T. cruzi* es vía epimerización de la UDP-Glc, debido a que a pesar de que estos organismos expresan constitutivamente transportadores de hexosas, son incapaces de transportar Gal (Tetaud y col., 1997; Barrett y col., 1998). La UDP-Glc 4'epimerasa (*Gale*) responsable de esta interconversión aparece como enzima clave en *T. brucei* (Roper y col., 2002; Roper y col., 2005) y *T. cruzi* (MacRae y col., 2006). A su vez la UDP-Galf se encuentra tanto en *L. major* como en *T. cruzi* y la obtienen a partir de UDP-Galp por acción de la UDP-Gal mutasa (Bakker y col., 2005; Beverley y col., 2005). *T. brucei* ha perdido el gen de la UDP-Gal mutasa y no contiene ni UDP-Galf ni Galf en sus glicoconjugados.

Sólo *T. cruzi* expresa glicoproteínas que contienen Xyl y Rha, por lo tanto, UDP-Xyl y UDP-Rha aparecen únicamente en este organismo. Los azúcares se encuentran como β -D-Xyl y α -L-Rhap, principalmente como parte de la gp72, una glicoproteína asociada con la conexión del flagelo al cuerpo celular (de Jesus y col., 1993). UDP-Xyl es el único nucleótido-azúcar de xilosa presente en la naturaleza y su biosíntesis es llevada a cabo a partir de UDP-Glc vía UDP-ácido glucurónico (UDP-GlcUA). Se presume que *T. cruzi* produce principalmente UDP-Rha a partir de UDP-Glc, y dTDP-Rha a partir de dTDP-Glc.

1.1.2.2 *Trypanosoma cruzi*

1.1.2.2.1 Generalidades

T. cruzi (Fig. 5) es un protista de la familia Trypanosomatidae, es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, enfermedad endémica encontrada principalmente en el continente americano. Es un parásito intracelular, hemoflagelado, que tiene un ciclo de vida que involucra vertebrados e invertebrados. Se transmite principalmente en forma vectorial. En Argentina, fundamentalmente, el insecto involucrado en la transmisión vectorial es el *Triatoma infestans*, conocido comúnmente como vinchuca (Fig. 5).

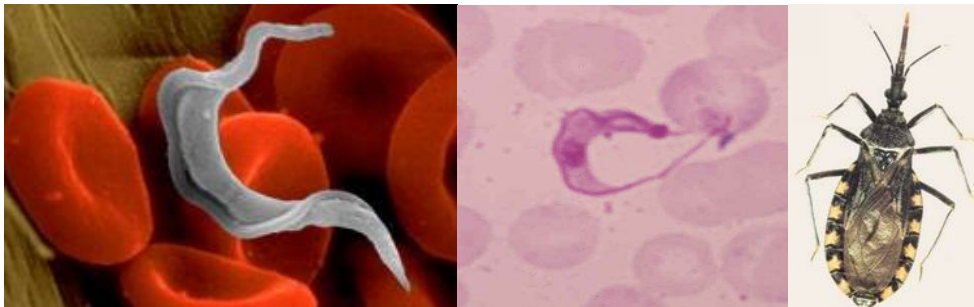


Figura 5. Fotografías de agente etiológico de la enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi* y del insecto vector (triatoma). Imágenes tomadas de <http://www.iadb.org> y <http://www.bureaudesalud.com/>.

1.1.2.2.2 Morfología y ciclo de vida

T. cruzi presenta principalmente tres estadios: tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes. Los **tripomastigotes**, son alargados y se caracterizan por contener kinetoplasto posterior al núcleo. Los **amastigotes** son esféricos u ovoides, tienen entre 3 y 5 μm de diámetro y los **epimastigotes** alargados y con el kinetoplasto localizado anterior al núcleo. El ciclo de vida del parásito (Fig. 6) se divide en dos etapas: en el hospedero mamífero y en el insecto vector.

En el hospedero: El ciclo se inicia cuando un insecto hematófago infectado pica a un ser humano y defeca. Los tripomastigotes metacíclicos se transmiten en las heces del insecto. Ingresan en el hospedero a través de una herida o por el cruce de las membranas mucosas. Cuando entran en una célula humana, se convierten en amastigotes. Esta es una etapa de multiplicación por mitosis, que generan células infectadas repletas de amastigotes, los pseudoquistes. El amastigote se convierte nuevamente en tripomastigote y la célula se lisa. Los tripomastigotes liberados, infectan otras células repitiéndose el ciclo de multiplicación.

En el insecto: Cuando el insecto pica a un hospedero infectado, los tripomastigotes pasan a él a través de la sangre. En el intestino del insecto, se transforman en epimastigotes, los cuales constituyen una segunda etapa reproductiva. Luego estos pasan al recto y allí se convierten en tripomastigotes metacíclicos y se evacuan a través de las heces. Las heces pueden infectar a un nuevo hospedero, repitiéndose el ciclo (Centres for Disease Control and Prevention, <http://www.cdc.gov/>).

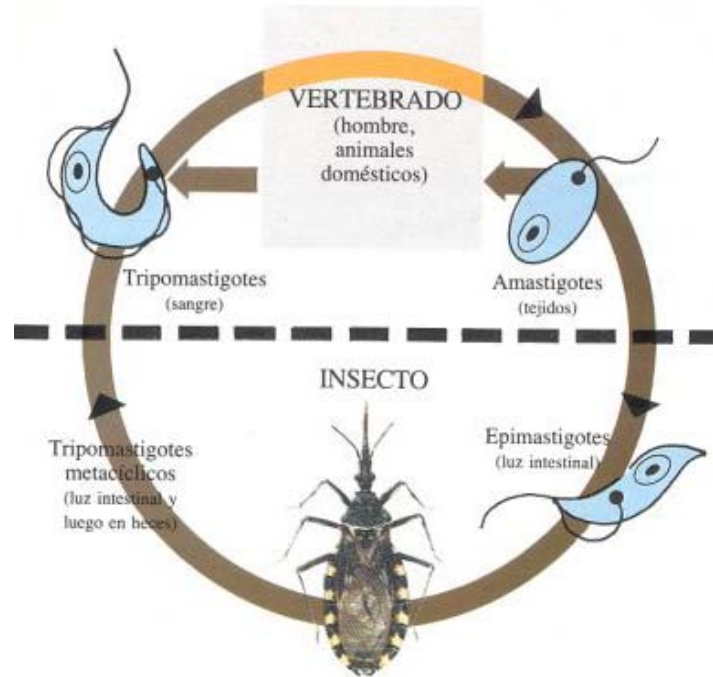


Figura 6. Ciclo de vida de *T. cruzi*. En el organismo vertebrado el parásito se encuentra en las formas de tripomastigote y amastigote, mientras que en el insecto vector lo hace en las formas de epimastigote y tripomastigote metacíclico. Imagen tomada de <http://www.cienciahoy.org.ar/>

1.1.2.2.3 Enfermedad, transmisión y tratamiento

Se considera que la enfermedad de Chagas es un padecimiento endémico de América, distribuyéndose desde México hasta Argentina, aunque existen vectores y reservorios, incluso casos identificados en Canadá y EEUU (Lennox y col., 2007). Se estima que entre 15 y 17 millones de personas son afectadas por la enfermedad de Chagas cada año, de las cuales mueren unas 50.000 (<http://www.cdc.gov/>). La transmisión natural de *T. cruzi* en la que interviene el triatoma se lleva a cabo en tres ciclos: el **doméstico**, en el cual el vector infesta de manera exclusiva la vivienda humana en áreas rurales y suburbanas; el **peridoméstico**, donde se mantienen alrededor de núcleos de población humana, y el **enzoonótico**, el cual se presenta alejado de asentamientos humanos (Wendel y col., 1992).

La principal vía de transmisión es la transmisión vectorial y se produce cuando los parásitos penetran, a través de las heces del insecto, por la herida que causa la picadura, por lesiones en la piel o por las mucosas de ojos, boca o nariz (Secretaría de Salud del Estado de México, <http://www.salud.edomex.gob.mx>). Otras vías son la transplacentaria, por leche materna, por hemo transfusión y accidentalmente en laboratorio clínico. Sin tratamiento, la enfermedad de Chagas puede ser mortal. Los dos únicos medicamentos disponibles para su tratamiento son el Nifurtimox, desarrollado en 1960 y el Benznidazol, desarrollado en 1974, aunque ninguno de los dos presenta una gran efectividad (sólo son efectivos en las primeras fases de la enfermedad) y además provocan graves efectos secundarios.

1.1.2.2.4 Naturaleza de los glicoconjugados en *T. cruzi*

T. cruzi está cubierto por un glicocáliz, en donde cada uno de sus componentes tienen un rol fundamental en la supervivencia e infectividad del parásito (Mendonça-Previato y col., 2005). Esta densa y continua cubierta está compuesta de una capa de glicoconjugados de superficie, siendo los más abundantes los GIPL (glicosilinositolfosfolípido) (Previato y col., 1990) y una familia de mucinas pequeñas (Previato y col., 1995) conocidas como sialoproteínas, las cuales se proyectan por encima de la capa de GIPL. Las mucinas son ricas en treonina, serina y prolina que son *o*-glicosiladas con GlcNAc (N-acetilglucosamina) y contienen de 1 a 5 residuos galactosilo. La estructura de los oligosacáridos es conservada entre epimastigotes y tripomastigotes procíclicos (Fig. 7).

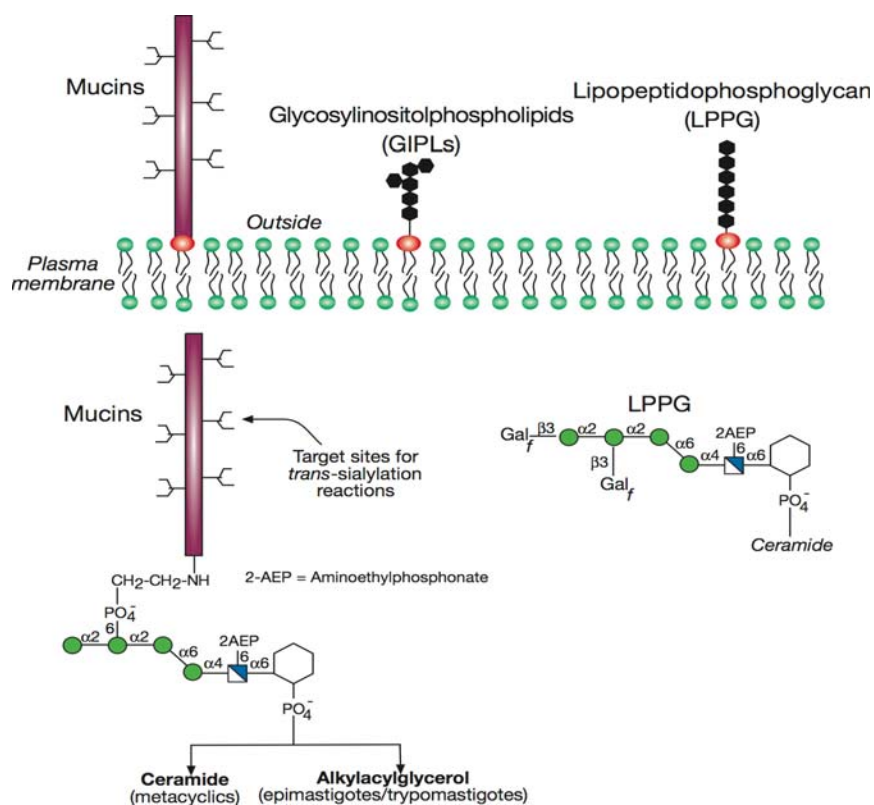


Figura 7. Representación esquemática de los principales glicoconjugados de superficie de *T. cruzi*. La superficie celular está cubierta con una densa capa de mucinas, glicosilinositolfosfolípidos (GIPLs), y lipopeptidofosfoglicanos (LPPG). Imagen tomada de www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi.

Los tripanosomas son incapaces de sintetizar ácido siálico *de novo* y presentan una habilidad inusual para adquirirlo a partir de los glicoconjugados del hospedero. La mucina rica en galactosa es el aceptor para la reacción de trans-sialilación en donde los residuos de ácido siálico son transferidos desde los glicoconjugados del hospedero por una enzima transialilasa (TS) a los residuos β -Gal terminales de la mucina (Mendonca-Previato y col., 2005). Esta TS es única, se encuentra específicamente en *T. brucei* procíclico (Nagamune y col., 2004) y *T. cruzi*, y participa en el ensamble del parásito a las células del hospedero (Todeschini y col., 2004), alterando la función inmune celular para mejorar el parasitismo (Todeschini y col., 2002). El principal glucano de la superficie celular de los epimastigotes de *T. cruzi* es el lipopeptidofosfoglicano (LPPG) y consiste de un glucano unido a inositolfosfoceramida. La estructura del glucano contiene manosa, galactofuranosa (Gal_f) y 2- aminoetilfosfonato (Mendonca-Previato y col., 2005).

1.1.2.3 *Trypanosoma brucei*

1.1.2.3.1 Generalidades

T. brucei es un protista parásito (Fig. 8), y al igual que *T. cruzi* pertenece a la familia Trypanosomatidae. Causa la tripanosomosis africana (enfermedad del sueño) en humanos y animales en África. Tres subespecies: *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense* y *T. b. brucei* son las responsables de la tripanosomosis africana que afecta a humanos (Barrett y col., 2003), y a animales (nagana) (<http://www.who.int/>).

El microorganismo parasita dos hospederos, un insecto (la mosca tsé-tsé) (Fig. 8) y un hospedero mamífero. Debido a la gran diferencia entre estos dos hospederos, la célula experimenta cambios complejos para facilitar su supervivencia en el intestino de los insectos y en la sangre de los mamíferos. El parásito cuenta con una única y variable cubierta glicoproteica, la glicoproteína variable de superficie (VSG) con el fin de evitar al sistema inmunológico del hospedero.

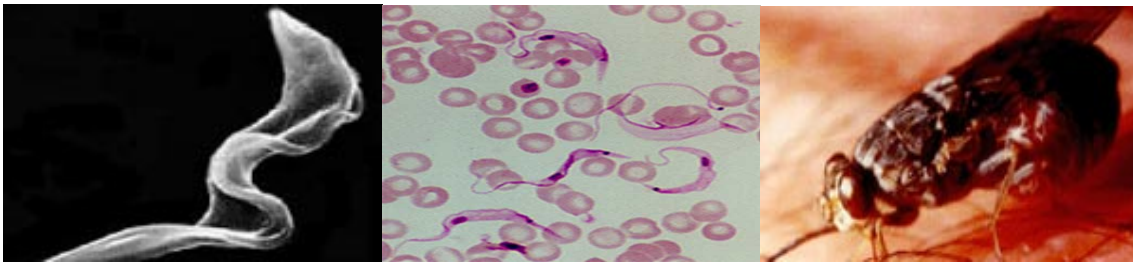


Figura 8. Fotografías de agente etiológico de la tripanosomiasis africana, *T. brucei* y del insecto vector (mosca tsé-tsé). Imágenes tomadas de <http://www.sciencemadecool.com/> y <http://www.engormix.com/>.

1.1.2.3.2 Morfología y ciclo de vida

Las formas en las que se presenta *T. brucei* son las siguientes:

Epimastigote: el cuerpo basal se encuentra en posición anterior al núcleo, con un flagelo largo conectado a lo largo del cuerpo celular.

Tripomastigote: el cuerpo basal es posterior al núcleo, con un flagelo largo conectado a lo largo del cuerpo celular.

T. brucei se presenta generalmente en la forma tripomastigote y se diferencia en epimastigote proliferativo en las glándulas salivares de los insectos (Matthews, 2005). La forma tripomastigote, a su vez, se diferencia en cuatro subtipos (Hoare, 1972):

- **Procíclico**, presente en el intestino de la mosca, proliferativo.
- **Metacíclico**, en las glándulas salivares de la mosca, no proliferativo.
- **Esbelto (slender)**, en el flujo sanguíneo del hombre, proliferativo.
- **Corto (stumpy)**, en el flujo sanguíneo del hombre, no proliferativo.

El ciclo biológico comprende las siguientes etapas (Fig. 9):

En el ser humano. La mosca tse-tse inyecta tripomastigotes metacíclicos en el flujo sanguíneo del hospedero al realizar una picadura (1). Estos se transforman en tripomastigotes sanguíneos esbeltos y se multiplican por fisión binaria en diferentes fluidos del cuerpo: sangre, linfa, líquido cefalorraquídeo, etc (2, 3). Algunos se transforman en tripomastigotes sanguíneos cortos preadaptados a la mosca tsé-tsé (4).

En la mosca tsé-tsé. Cuando una mosca pica a un hospedero infectado, los tripomastigotes cortos pasan al sistema digestivo de la mosca (5). En el intestino de la mosca se transforman en tripomastigotes procíclicos y se multiplican por fisión binaria (6). A continuación, abandonan el intestino y se convierten en epimastigotes (7). Estos se multiplican en las glándulas salivares y se transforman en tripomatigotes metacíclicos. Si la mosca pica al hombre, se inyectan los tripomatigotes metacíclicos y el ciclo se completa (1) (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>).

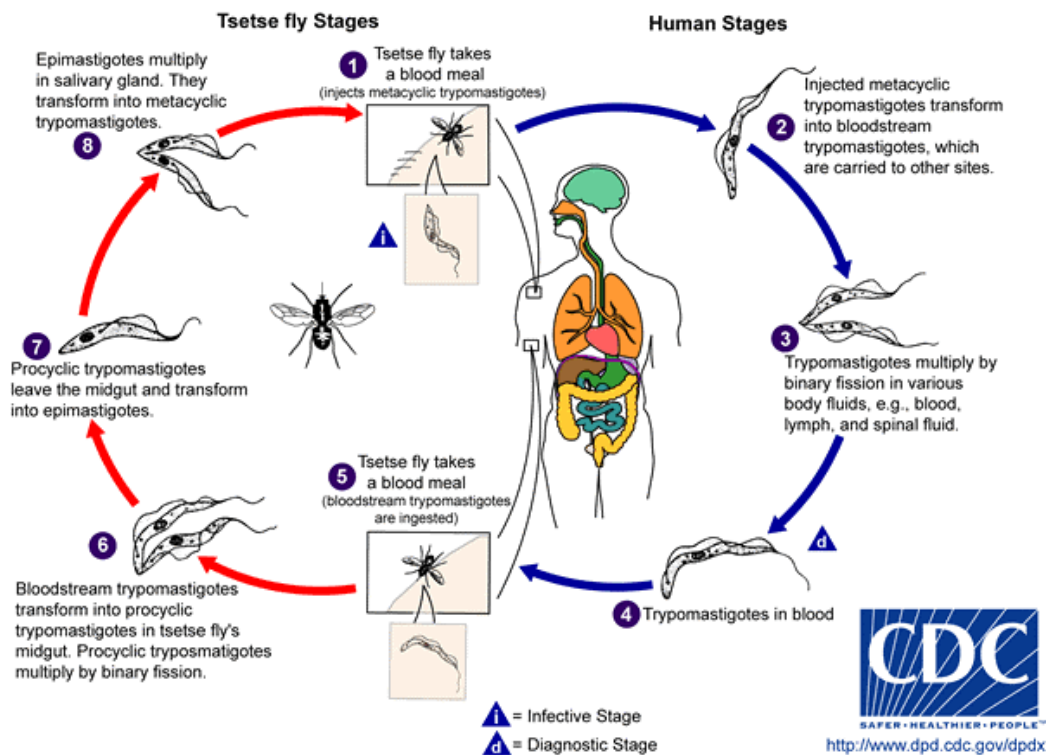


Figura 9. Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*. En el organismo vertebrado el parásito se encuentra en las formas de tripomastigote, mientras que en el insecto vector lo hace en las formas de tripomastigote procíclico, epimastigote y tripomastigote metacíclico. Imagen tomada de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>.

1.1.2.3.3 Enfermedad, transmisión y tratamiento

El parásito es transmitido a humanos por picaduras de la mosca tse-tse (género *Glossina*) infectadas al alimentarse de humanos o animales que hospedaban a los parásitos. Las moscas tsé-tsé se encuentran en el África subsahariana y parte de África Central. La transmisión se puede dar por varias vías, como ser: infección congénita (el tripanosoma puede cruzar la placenta e infectar al feto), transmisión mecánica y por infecciones accidentales (en laboratorios-agujas contaminadas).

La primera etapa de la enfermedad, se conoce como **fase hemolinfática**, y los síntomas son, entre otros, ataques de fiebre, jaquecas, y dolores de articulaciones. La segunda fase, **fase neurológica**, comienza cuando el parásito atraviesa la barrera hematoencefálica invadiendo el sistema nervioso central presentando síntomas como: confusión, alteraciones de los sentidos, escasa coordinación y alteraciones del ciclo de sueño, lo que le da el nombre a la enfermedad. Sin tratamiento, la enfermedad es letal.

El tipo de tratamiento depende de la etapa de la enfermedad. Las drogas utilizadas en la primer etapa son menos tóxicas, más fáciles de administrar y más efectivas (Pentamidina, Suramina). El éxito de un tratamiento en la segunda etapa depende de que la droga a utilizar pueda cruzar la barrera hematoencefálica para alcanzar al parásito. Estas drogas son tóxicas y difíciles de administrar (Melarsoprol, Eflornitina). Las cuatro drogas han sido registradas para el tratamiento de la enfermedad del sueño y entregadas gratuitamente a los países endémicos a través de una sociedad privado-pública de la OMS.

1.1.2.3.4 Cubierta de VSG

La superficie celular de estos tripanosomas se compone de una capa uniforme de glicoproteína variante de superficie (VSG) (Barry y McCulloch, 2001) que contienen Gal en el GPI (Fig. 10). Esta capa tiene dos funciones: es una barrera física que bloquea el reconocimiento de la célula por el sistema inmune específico del hospedero mamífero y oculta las proteínas invariantes de superficie (como los canales iónicos, receptores, etc) al reconocimiento del sistema inmunológico (Overath y col., 1994). Por otra parte, contener una superficie variable, le permite variar y adaptar específicamente las estructuras en la superficie, de manera de evitar al sistema inmunológico. Esta capa variable, es codificada por varios cientos de copias alternativas de un gen en el genoma. En cada célula, y en toda una población de células en el hospedero, se expresa la misma capa de proteínas, pero la expresión es inestable y probablemente cambie con la próxima generación. La proteína se compone de un dominio N-terminal muy variable de

alrededor de 300 aminoácidos, y un dominio C-terminal más conservado de unos 100 aminoácidos. La VSG se ancla a la membrana celular por medio de un GPI, unido covalentemente al dominio C-terminal, el cual interacciona con el ácido fosfatidilcolina-inositol fosfolípido de la membrana celular.

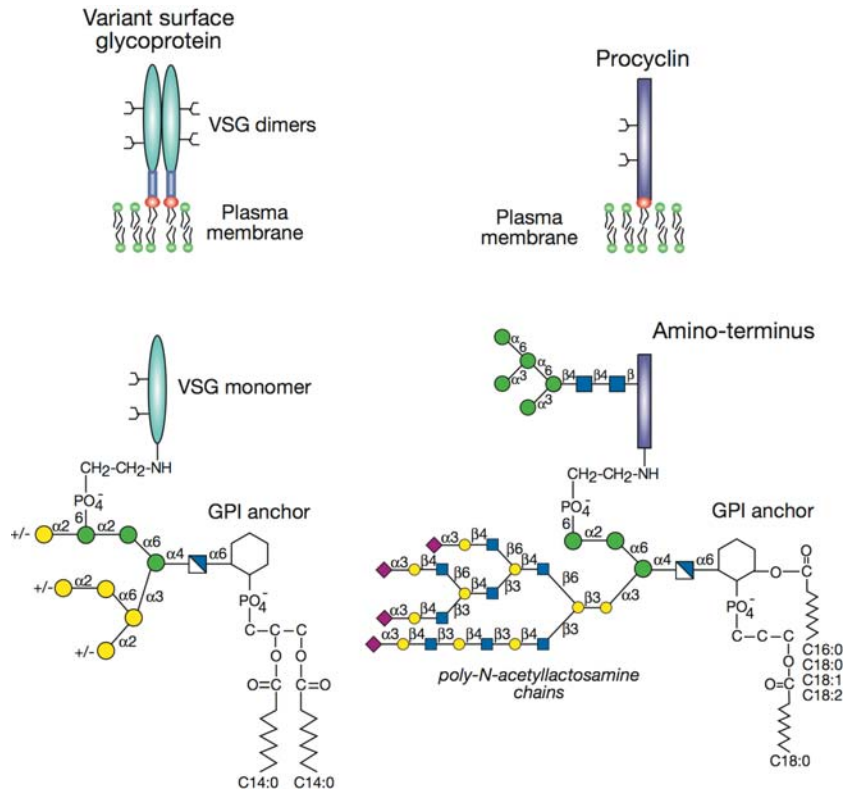


Figura 10. Representación esquemática de los principales glicoconjugados de *T. brucei* procíclico y metacíclico. La VSG es el principal componente de la forma metacíclica y cada molécula consiste de dos monómeros glicosilados con GPI. La superficie de la forma procíclica está densamente cubierta con prociclinas. Imagen tomada de www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi.

De las múltiples copias del gen que codifican las VSG, alrededor de 20 se encuentran en cromosomas largos e intermedios que están activos y posiblemente serán transcritos (aunque sólo uno por célula) (Pays, 2005) y otros 100 se encuentran cerca de los telómeros de los mini-cromosomas. Estos no están activos, pero si a través de una recombinación se trasladan a un lugar de transcripción activa, producirán una proteína VSG funcional. Por último, unos 1000 se encuentran en secciones repetidas en el interior de los cromosomas y están generalmente inactivos, debido a secciones omitidas o codones de terminación prematuros, pero son importantes en la evolución de nuevos genes VSG. Luego de la infección, el tripanosoma expresa una VSG en particular.

Como el sistema inmunológico del hospedero genera una respuesta concreta a esta capa de proteínas, se producirá una disminución de la población de tripanosomas. En este punto, una célula que exprese una VSG alternativa será fuertemente seleccionada y repoblará la infección. El efecto general de este ciclo de proliferación y decaimiento da lugar a una sucesión de episodios de infección, cada uno debido a una población con diferentes expresiones de cubiertas VSG.

Muchos son los glicoconjugados de la superficie celular que contienen residuos Gal. Además de las VSG, encontramos al receptor de transferrina, el cual es crítico para la adquisición de hierro del hospedero y varias proteínas invariables de superficie que contienen Gal en la forma de poli-N-acetilactosamina (Nolan y col., 1999). Recientemente, se han encontrado unas glicoproteínas reconocidas por ricina que también contienen Gal en las cadenas laterales de sus oligosacáridos y se las encuentra en el bolsillo flagelar y a través de todo el sistema endosomal/lisosomal del parásito (Atrih y col., 2005). La forma procíclica también expresa glicoconjugados que contienen Gal en las prociclina-glicoproteínas de la superficie (Treumann y col., 1997) y en la estructura GPI libre (Vassella y col., 2003).

En ningún estadio del ciclo de vida el parásito es capaz de incorporar Gal a través de la membrana ya que a pesar de poseer transportadores de hexosa (ej: glucosa), éstos son nulos para transportar Gal. Por lo tanto, al igual que lo que ocurre en *T. cruzi*, la única vía de obtención de este azúcar es a través de la epimerización de UDP-Glc a UDP-Gal (Roper y col., 2002; Roper y col., 2005).

1.1.2.4 *Entamoeba histolytica*

1.1.2.4.1 Generalidades

Entamoeba histolytica (Fig. 11) es un parásito anaerobio, eucariota protozoario con forma ameboide. Es patógeno para el humano, quien es su único hospedador, causa amebiosis, que incluye formas clínicas características como la colitis amébrica y el absceso hepático. La ameba se alimenta del bolo alimentario, bacterias intestinales, líquidos intracelulares de las células que destruye y de eritrocitos. Contiene proteínas de membrana capaces de formar poros en las membranas de las células humanas, destruyéndolas por choque osmótico y adhesinas que le permiten fijarse a las células de la mucosa, de modo que no sean arrastradas por el cuadro diarreico. Además, producen

enzimas como proteasas de cisteínas, que degradan el medio extracelular humano, permitiéndole invadir otros órganos (Walsh, 1986; Stanley y col., 1995; Espinosa-Cantellano y Martínez-Palomo, 2000).



Figura 11. Fotografías de trofozoíto *Entamoeba histolytica*. Imágenes tomadas de <http://www.acsmedchem.org/>, <http://www.sanger.ac.uk/> y <http://www.health-res.com/>.

Clasificación taxonómica

- Reino:** Protista
- Filo:** Amoebozoa
- Clase:** Archamoebae
- Orden:** Entamoebida
- Familia:** Entamoebidae
- Género:** *Entamoeba*
- Especie:** *Entamoeba histolytica*

1.1.2.4.2 Morfología y ciclo de vida

Se pueden distinguir varias formas o fases de desarrollo del parásito, presentes durante diferentes etapas de su ciclo de vida:

Trofozoíto: es la forma vegetativa y con movilidad de la especie. Se multiplica por fisión binaria y se caracteriza por tener un núcleo con una concentración de cromatina puntiforme y concéntrica llamada cariosoma central; así como la formación de cromatina en la periferia del núcleo.

Quiste: es la forma infectante. Dependiendo de la madurez del quiste, contiene de 1 a 4 núcleos. Son de forma redondeada, bordes refringentes y una membrana claramente demarcada. Con frecuencia se pueden observar en el citoplasma 1 a 3 inclusiones de glucógeno oscuras llamadas **cuerpos cromatidales**.

Metaquiste: tienen las mismas características que los quistes, por derivarse de estos durante el proceso de desenquistamiento en el colon proximal. Son los que darán origen

a los trofozoítos, por lo que tienen una membrana más irregular y delgada que un quiste (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>).

El ciclo de vida (Fig. 12) es relativamente sencillo. La infección se inicia con la ingesta de agua o alimentos contaminados con materia fecal (1). Los quistes son capaces de resistir el pH gástrico y llegados a el intestino delgado ocurre la exquistación (2), que consiste en la división del quiste cuatrinucleado que da origen a ocho núcleos (estado metaquístico transitorio), la división citoplásmica continúa y emergen ocho trofozoítos (3). Los trofozoítos se dirigen al intestino grueso (4) para colonizarlo, ahí se alimentan de bacterias y restos celulares (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>). Finalmente, los trofozoítos pueden enquistarse y ser eliminados junto a las heces para completar el ciclo (Ravdin, 1986). En la mayoría de los individuos infectados la ameba habita como comensal inofensivo en el intestino grueso (Trissl, 1982).

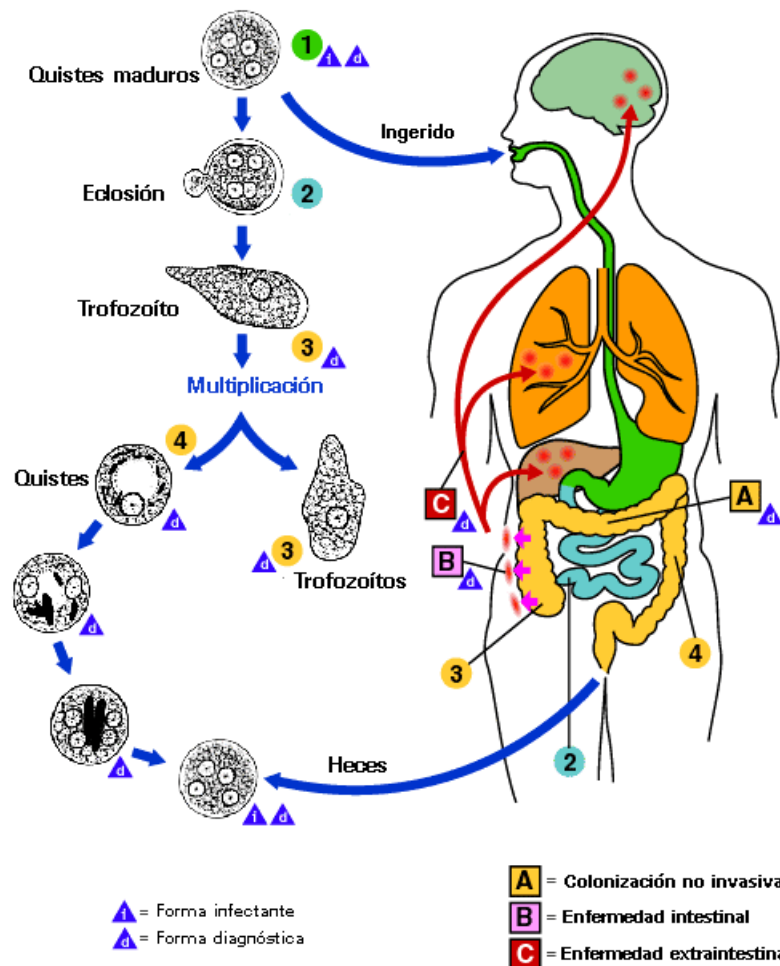


Figura 12. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. En el humano el parásito se encuentra en las formas de quiste y trofozoito. Imagen tomada de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>.

1.1.2.4.3 Enfermedad, transmisión y tratamiento

La amebiasis es más frecuente en regiones tropicales, climas cálidos y templados, sobre todo en áreas pobres y mal saneadas. Después del paludismo, es posible que *E. histolytica* sea la segunda causa de muerte por protozoarios en el mundo (Kucik y col., 2004). Alrededor del 10 al 20% de la población mundial se considera infectada y el 10% de ésta sufre la enfermedad, con una letalidad que oscila entre 0,10-0,25%. Según la Organización Mundial de la Salud, hay 50 millones de nuevas infecciones y 70.000 muertes por año (<http://www.who.int/es/>). La principal vía de transmisión de la enfermedad es a través de la ruta fecal-oral. La fuente de infección primaria es el ser humano infectado, esté enfermo o asintomático (portador sano), mientras que cualquier otro individuo puede ser un hospedador susceptible, en especial los inmunodeprimidos, desnutridos y los niños menores de dos años y preescolares.

Al comenzar a multiplicarse los trofozoítos, la mayoría de las infecciones son controladas por el sistema inmunológico, no habiendo generalmente síntomas, pero sí excreción de quistes infecciosos. A medida que aumenta el número de parásitos, provocan la destrucción de la mucosa intestinal, con ruptura de los vasos sanguíneos y destrucción de las células caliciformes. El sistema inmunológico rechaza su presencia generando focos diseminados de inflamación del intestino, produciendo diarrea mucosanguinolenta.

Otros síntomas frecuentes son los dolores intestinales, náuseas y vómitos. Si los parásitos se diseminan por el tracto gastrointestinal, pueden causar otros problemas. En el hígado hay destrucción de parénquima hepático, pudiéndose llegar a la formación de un absceso que al crecer provoca problemas en la funcionalidad del hígado. En algunos casos pueden formarse abscesos en el bazo o en el cerebro, con complicaciones muy peligrosas. Algunos de los factores patogénicos principales que aumentan la capacidad de causar daño al hospedador humano, son:

-Actividad colagenasa. Los trofozoítos tienen propiedades secretoras bioquímicas con actividad de proteasas, que degradan el colágeno, como en el tejido hepático (Sociedad Mexicana de Bioquímica, <http://www.smb.org.mx>), pudiendo ser ese uno de los métodos para la formación de los abscesos hepáticos.

-Enzimas proteolíticas. Además de colagenasas, se ha demostrado la acción de una enzima citotóxica llamada *EhCP112* (<http://www.smb.org.mx>), implicada en la disolución de la matriz intercelular que mantiene unidas las células de la mucosa epitelial. Tiene también un efecto destructivo en contra de ciertas células leucocitarias.

-Proteínas formadoras de poros. La producción de estas moléculas ocasionan lisis en la célula blanco por medio de cambios osmóticos.

-Sustancias neuro-hormonales. Crean disturbios en el transporte intestinal de electrolitos.

El tratamiento se realiza mediante el empleo de drogas como metronidazol, iodoquinol, paromomicina o furoato de diloxanida y tinidazol. (Petri y Singh, 1999). Algunos de los efectos secundarios asociados a la administración sistémica del metronidazol incluyen náusea, diarrea y un sabor metálico en la boca. La administración intravenosa de metronidazol se ha visto acompañada de tromboflebitis. Algunas reacciones no deseadas poco frecuentes incluyen reacciones de hipersensibilidad, dolor de cabeza, mareo, vómitos, estomatitis, orina oscura (<http://www.facmed.unam.mx/>).

1.1.2.4.4 Características del metabolismo redox

E. histolytica, durante la fase extraintestinal, se expone a una presión de oxígeno mayor y consecuentemente, a concentraciones elevadas de especies reactivas del oxígeno (ROS). Se han identificado en este organismo, enzimas pertenecientes a los diferentes sistemas antioxidantes, como ser:

- una flavin reductasa bifuncional (NADPH:flavin:oxidoreductas, p34), que posee actividad disulfuro reductasa y además es capaz de reducir oxígeno a peróxido de hidrógeno (Bruchhaus y col., 1998).

- una piruvato:ferredoxina oxidoreductasa, que cataliza la decarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA y dióxido de carbono (Wassmann y col., 1999).

- una superóxido dismutasa, que cataliza la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno (Bruchhaus y Tannich, 1994).

- una peroxirredoxina (Prx) de dos cisteínas (2CysPrx), que tiene la capacidad de eliminar el peróxido de hidrógeno, es considerada también como enzima clave para la protección contra el ataque oxidativo durante la infección a los tejidos (Bruchhaus y col., 1997; Tekwani y Mehlotra, 1999; Cheng y col., 2004) y para llevar a cabo la detoxificación de los peróxidos, la enzima requiere la presencia de un sistema que actúe como dador de equivalentes de reducción. En este sentido, trabajos recientes describen la presencia de un sistema TRXR/TRX, el cual utiliza equivalentes de reducción de NADPH y en la ameba estaría involucrado en diferentes procesos biológicos tales como la protección contra el daño oxidativo, regulación de la síntesis de ADN, transcripción, crecimiento celular y apoptosis (Arias y col., 2007; Arias y col., 2008).

El parásito presenta otras características notables como la ausencia de catalasa (Bruchhaus y col., 1997) y de glutatión (como de todas las enzimas asociadas a éste compuesto presentes en otros eucariotas) (Fahey y col., 1984). El principal tiol de bajo peso molecular es la cisteína, que se encuentra en altos niveles a nivel intracelular y es sintetizada por la cisteína sintetasa (McLaughlin y Aley, 1985). La presencia de tripanotión no está del todo resuelta, ya que diferentes trabajos presentan diferentes puntos de vista al respecto (Ondarza y col., 1997; Ariyanayagam y Fairlamb, 1999).

1.1.2.4.5 Metabolismo celular

E. histolytica es un microorganismo fermentador obligado por carecer de ciclo de Krebs y de respiración mitocondrial. La fuente de energía principal son los glúcidos, los cuales son transportados desde el exterior de la célula para ser degradados por fermentación anaeróbica generando, como productos finales, dióxido de carbono, etanol, acetato y alanina. Este microorganismo presenta características distintivas en cuanto al metabolismo de hidratos de carbono (emplea pirofosfato en vez de ATP) (Mertens, 1993), al metabolismo de lípidos (habilidad para sintetizar fosfolípidos como ceramida, no puede sintetizar ácidos grasos) (Aley y col., 1980), al metabolismo de nucleótidos (incapaz de sintetizar purinas y pirimidinas) y al metabolismo de proteínas (síntesis de ácido glutámico, cisteína y prolina). *E. histolytica* no contiene mitocondria (Fahey y col., 1984), y en su lugar poseen organelas que podrían derivar de ésta, los mitosomas. Éstos contienen algunas proteínas asociadas con las mitocondrias pero carecen del ADN y de los elementos de la cadena respiratoria.

Si bien la ameba no contiene las organelas típicas de organismos eucariotas, se ha demostrado la existencia de genes que codifican enzimas características de mitocondria, aparato de Golgi y retículo endoplasmático (Mazzuco y col., 1997). En distintos trabajos se señala la presencia de sitios subcelulares de glicoconjugación y sus posibles vías o caminos biosintéticos, tareas que se llevan a cabo en vesículas similares al aparato de Golgi y retículo endoplasmático de otros eucariotas. En *E. histolytica* se caracterizaron transportadores de UDP-Gal, vesículas que transportan UDP-Gal, actividad galactosiltransferasa y un transportador de UDP-Glc (Bredston y col., 2005). Estos trabajos concluyen que *E. histolytica* contiene diferentes vesículas, análogas a las organelas de eucariotas superiores, que están involucradas en la glicosilación y en el control de calidad del plegamiento de proteínas (Hirschberg y Snider, 1987; Bakker-Grunwald y Wostmann, 1993; Bredston y col., 2005).

La D-Gal es activamente transportada por la ameba. Así, una vez dentro de la célula, es convertida a galactosa-1P por una galactoquinasa dependiente de ATP, luego es uridilada a UDP-Gal por una UTP:Gal-1P uridililtransferasa (EC 2.7.7.10). Luego la UDP-Gal es convertida en UDP-Glc por la UDP-Glc 4' epimerasa y de allí pasa a la ruta glucolítica vía glucógeno. Otro dato relevante en este análisis es que la ameba ha perdido la UDP:Gal-1P uridililtransferasa (EC 2.7.7.12) (Lobelle-Rich y Reeves, 1982). En *E. histolytica* existe una vía glicolítica ampliada (la ruta predominante para el metabolismo de la glucosa es la vía de Embden-Meyerhof (Bragg & Reeves, 1962), en la cual el piruvato es convertido a acetil-CoA por una piruvato: ferredoxina oxidoreductasa; y el acetil-CoA es convertido luego a acetato con generación de ATP, o reducido a etanol con generación de NAD⁺ (Reeves, 1984).

1.1.2.4.6 La superficie celular de la ameba

La superficie celular del parásito protozoario *E. histolytica* juega un rol clave en el reconocimiento y muerte de células blanco del hospedero. Un número de moléculas de la superficie celular han sido caracterizadas y su implicancia en la patogénesis ha sido documentado (Clark y col., 2000). La ameba posee una clase de glicoconjugados de la superficie celular anclados a GPI altamente polimórficos, los cuales no están presentes en *Entamoeba dispar* (no patógena) (Bhattacharya y col., 1992; Stanley y col., 1992; Moody y col., 1997; Bhattacharya y col., 2000) y otras especies de ameba (Srivastava y col., 1995). Estas moléculas son denominadas lipofosfoglicanos (LPPGs) (Bhattacharya y col., 1992; Stanley y col., 1992). Los anticuerpos contra LPPGs inhiben la adhesión de los trofozoitos a las células de mamíferos, indicando que estos pueden estar involucrados en la interacción hospedero-parásito (Stanley y col., 1992). La estructura de estos glicoconjugados consta de proteofosfoglicano (PPG) con un ancla de GPI (Gal₁Man₂GlcN-*myo* inositol) unido a un polipéptido altamente ácido (Arya y col., 2003). El polipéptido está modificado con cadenas de glucano lineal conteniendo la estructura general [Glcα1-6]₁₋₂₂Glcβ1-6Gal, unida a través de residuos de fosfoserina (Fig.13) (Moody-Haupt y col., 2000). La ruta biosintética para estos compuestos y demás glicoconjugados no está completamente elucidada en este organismo.

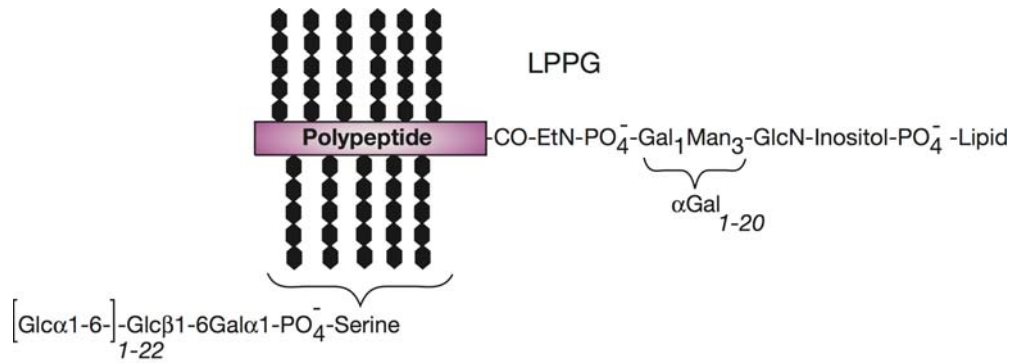


Figura 13. Estructura general de un lipopéptidofosfoglicano (LPPG) de *E. histolytica*. Imagen tomada de www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi.

El ataque de los trofozoitos de *E. histolytica* a las células blanco es requerido para la histólisis y este proceso está mediado por la lectina Gal/GalNAc (Saffer y Petri, 1991; Sahoo y col., 2003). Al igual que el PPG, la lectina está anclada a la membrana plasmática a través del GPI. Numerosos trabajos han demostrado la importancia que posee el GPI (composición y estructura) en la virulencia y patogenicidad (McCoy y col., 1993a; McCoy y col., 1993b; Katz y col., 2002) de la ameba, señalando a las enzimas involucradas en la biosíntesis de este compuesto como excelentes blancos para la quimioterapia, no sólo para este microorganismo sino para muchas otras afecciones parasitarias.

Hasta aquí hemos podido analizar la importancia que presentan los oligo- y polisacáridos estructurales de distintos microorganismos que fueron utilizados durante este estudio, destacando el rol clave que éstos desempeñan en el proceso de reconocimiento e interacción con las células del hospedero. Resulta claro del análisis general que el conocimiento del metabolismo de los hidratos de carbono en tales organismos, principalmente en lo que respecta a la interconversión de azúcares y a la síntesis de poliglucanos es fundamental para la comprensión de la fisiología y patología de los mismos.

1.2 Hidratos de Carbono

1.2.1 Características generales

Los hidratos de carbono, glúcidos o sacáridos (del griego σάκχαρον, sákcharon, que significa "azúcar") se definen como moléculas orgánicas compuestas por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, con estructura de polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas; siendo las biomoléculas más abundantes sobre la Tierra (Nelson y Cox, 2000). Éstos desempeñan funciones cruciales en los organismos vivos. Son moléculas parcialmente reducidas, sujetas a oxidación para generar intermediarios energéticos necesarios para conducir los procesos metabólicos y también constituyendo los sillares para el almacenamiento intracelular de la energía (Horton y col., 1995). Los hidratos de carbono pueden sufrir reacciones de esterificación, aminación, reducción, oxidación, etc, otorgándole a cada una de las estructuras una propiedad específica. En la naturaleza se encuentran en los seres vivos, formando parte de biomoléculas aisladas o asociadas a otras como, por ejemplo, proteínas y lípidos generando glicoproteínas y glicolípidos, proteoglicanos (cuando el componente glucosídico es mayoritario) y péptidoglicanos (esqueleto de glucano compuesto de ácido N-acetil murámico, N-acetil glucosamina y cadenas laterales de péptidos) (<http://www.ehu.es/biomoléculas>).

Los azúcares más simples, los monosacáridos, están formados por una sola molécula que consiste en una única unidad de polihidroxialdehído o cetona, y según el número de átomos de carbono pueden clasificarse en triosas, tetrosas, pentosas, hexosas y heptosas, siendo el monosacárido más abundante en la naturaleza un azúcar de seis carbonos, la D-glucosa (Nelson y Cox, 2000). Por otra parte, cabe remarcar que en el metabolismo de glúcidos, los intermediarios son derivados fosforilados de los mismos. La condensación del ácido fosfórico con un -OH da lugar a un éster fosfato, así por ejemplo, la glucosa puede transformarse en Glc-6P. Los monosacáridos son la principal fuente de combustible para el organismo, siendo utilizados tanto como una fuente de energía, como en la biosíntesis de compuestos más complejos. Cuando los monosacáridos no son necesarios en las células, rápidamente son convertidos en otros compuestos, frecuentemente en polisacáridos.

Por su parte, los disacáridos consisten en dos monosacáridos unidos por un enlace químico covalente, denominado enlace *o*-glucosídico, el cual se forma cuando un grupo hidroxilo de un azúcar reacciona con el carbono (C) anomérico de otro (Voet y Voet, 2006). Cuando un C anomérico forma parte de un enlace glucosídico, ya no puede actuar como reductor. Así los disacáridos que tienen un C anomérico libre son

reductores y los que tienen los dos C anoméricos formando el enlace glucosídico no lo son (<http://themedicalbiochemistrypage.org/carbohydrates>). La sacarosa es un disacárido no reductor formado por glucosa y fructosa. Es uno de los productos principales de la fotosíntesis y en plantas constituye la forma principal de transporte de azúcar desde las hojas a otras partes de la planta (Nelson y Cox, 2000). La lactosa, por su parte, es un disacárido reductor formado por galactosa y glucosa y está presente naturalmente sólo en la leche (Voet y Voet, 2006), mientras que otros disacáridos reductores notables son la maltosa, formada por dos moléculas de glucosa unidas por enlaces de tipo α 1-4 y se encuentra presente en los granos de cebada germinada y la celobiosa, la cual está formada por dos glucosas unidas por enlaces de tipo β 1-4, y se obtiene a partir de la hidrólisis de la celulosa (Horton y col., 1995).

Los oligosacáridos están compuestos por entre 3 y 9 monosacáridos pero muchos de los hidratos de carbono encontrados en la naturaleza aparecen como polisacáridos, polímeros de elevado peso molecular (Nelson y Cox, 2000). Son cadenas, ramificadas o no, de más de diez monosacáridos unidos mediante enlaces glucosídicos (Voet y Voet, 2006) y representan una clase importante de polímeros biológicos. Su función, en los organismos vivos, está usualmente relacionada con la estructura o almacenamiento. El almidón es usado como una forma de almacenar glucosa en las plantas, siendo una mezcla de dos polímeros: amilosa (polímero lineal de glucosa con enlaces α 1-4) y amilopectina (polímero de glucosa enlazadas por uniones α 1-4 con un alto número de ramificaciones α 1-6) (<http://www.themedicalbiochemistrypage.org/carbohydrates>). Por su parte, el glucógeno es un polisacárido de reserva de glucosa que se encuentra en animales y bacterias. Es estructuralmente similar a la amilopectina, pero más ramificado (o con mayor frecuencia en la ramificación). Su estructura ramificada es fisiológicamente importante, ya que puede ser degradado rápidamente por medio de la liberación de unidades de glucosa en el extremo no reductor de cada ramificación.

El papel estructural de los hidratos de carbono se puede apreciar también en donde se necesitan matrices hidrofílicas capaces de interactuar con medios acuosos, constituyendo un armazón con una cierta resistencia mecánica, como por ejemplo las paredes celulares de plantas, hongos y bacterias (<http://www.ehu.es/biomoléculas>). La celulosa y la quitina son polisacáridos estructurales. La celulosa está presente en la pared celular de plantas y otros organismos y es la molécula más abundante en la biosfera (Campbell, 1996). Por otra parte, la importancia de los polisacáridos en la célula no sólo es debida a sus funciones estructurales y de almacenamiento energético,

sino también, a que actúan, en combinación con lípidos y proteínas, como marcadores celulares importantes en el reconocimiento y la adherencia celular.

1.2.2 Los Glicoconjugados

Como se mencionó anteriormente los oligosacáridos pueden unirse de forma covalente a lípidos o a proteínas de membranas celulares. De esta manera los grupos hidrofílicos de los hidratos de carbono alteran la polaridad y la solubilidad de las proteínas y lípidos. Tanto las glicoproteínas como los glicolípidos de la superficie externa de la célula sirven como señales de reconocimiento para hormonas, anticuerpos, bacterias, virus u otras células. Cuando los oligosacáridos se unen a las proteínas desempeñan varias funciones:

- ayudan a un plegamiento correcto
- sirven como marcador para dirigirlos a su destino dentro de la célula o para ser secretadas
- evitan que la proteína sea digerida por proteasas
- aportan numerosas cargas negativas que aumentan la solubilidad de las proteínas, ya que la repulsión entre cargas evita su agregación.

Otro grupo de moléculas son los glucosaminoglucanos y los lipopolisacáridos. Los primeros son polisacáridos no ramificados de residuos no alternantes de ácido urónico y hexosamina, siendo un ejemplo de este grupo el ácido hialurónico (Voet y Voet, 2006). Los segundos son principales componentes de las membranas externas de bacterias.

1.2.3 Utilización de la glucosa

La glucosa, libre o combinada, es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza. Es la fuente primaria de energía de las células mediante su oxidación catabólica. Su degradación puede tener lugar en condiciones anaerobias (fermentación) o aerobias (respiración). La mayoría de las células vivas son capaces de obtener energía a partir de glucosa, lo que indica que esta vía metabólica es una de las más antiguas. Además, la glucosa es el componente principal de polímeros de importancia estructural, como la celulosa, y de polímeros de almacenamiento energético como el almidón y glucógeno (Lehninger y col., 2006).

Los organismos autótrofos, como las plantas, sintetizan la glucosa durante la fotosíntesis a partir de compuestos inorgánicos como agua y dióxido de carbono. Los seres heterótrofos, como los animales, son incapaces de realizar este proceso y toman la glucosa de otros seres vivos o la sintetizan a partir de diversos compuestos orgánicos. La glucosa puede sintetizarse a partir de otros azúcares, como fucosa o galactosa. Otra posibilidad es la síntesis a partir de moléculas no glucosídicas, proceso conocido como gluconeogénesis. Existen diversas moléculas como lactato, oxalacetato y glicerol que pueden actuar como precursoras en la síntesis. Aunque las reacciones de la gluconeogénesis son las mismas en todos los organismos, el contexto metabólico y la regulación de la vía difiere de organismo a organismo y de tejido en tejido (Lehninger y col., 2006).

Si bien los intermediarios en la glucólisis y gluconeogénesis son azúcares-P, muchas de las reacciones en las cuales las hexosas son transformadas o polimerizadas involucran un tipo diferente de grupo activador: un nucleósido-difosfato al que queda unido el azúcar. Los nucleótidos-azúcares son los sustratos requeridos en la síntesis de polisacáridos como glucógeno, almidón, celulosa, y polisacáridos extracelulares más complejo (Nelson y Cox, 2000). El rol de los nucleósidos-difosfo-azúcares (específicamente UDP-Glc) en la biosíntesis de glucógeno fueron descubiertos por Luis F. Leloir, promediando el siglo XX (Leloir, 1971). Leloir y su grupo establecieron que la biosíntesis y degradación de glucógeno ocurre por diferentes vías. Lo primero involucra el uso de una forma activada de glucosa, específicamente UDP-Glc en células de mamíferos, hongos y microorganismos eucariotas heterotróficos y ADP-Glc en bacterias y eucariotas fotosintéticos (Sivak y Preiss, 1998; Ballicora y col., 2003). Debido a la importancia metabólica que presenta la UDP-Glc a continuación se la describe con mayores detalles.

1.2.4 La molécula de UDP-Glc

La UDP-Glc es la forma de glucosa activada comúnmente empleada en todos los organismos para las reacciones de transferencia de glucosilos y como precursor para la conversión entre distintos azúcares (Roeben y col., 2006), jugando un rol esencial en el metabolismo de hidratos de carbono en todos los organismos (Steiner y col., 2007).

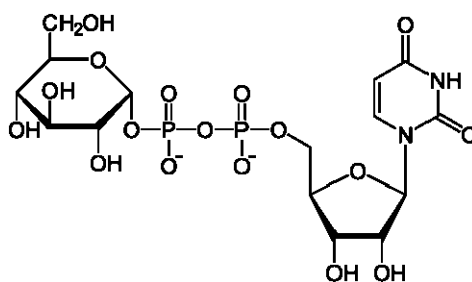


Figura 15. Estructura representativa de la UDP-Glc.

Como se destacó anteriormente, este compuesto tiene un rol central en la producción de glicoconjugados, teniendo relevancia fisiológica en la mayoría de los organismos. En eucariotas, la UDP-Glc, es sustrato de diferentes glicosil transferasas y actúa como dador glucosilo en la síntesis de polisacáridos de reserva como el glucógeno (por ejemplo, en animales) y de polisacáridos estructurales como la celulosa en plantas, de motivos glicano en glicolípidos y glicoproteínas y de los disacáridos trehalosa y sacarosa (Kleczkowski, 1994; Alonso y col., 1995; Gibeaut, 2000). También cumple un papel importante en la interconversión de Gal a Glc por la vía de Leloir (Leloir, 1951; Frey, 1996; Mollerach y col., 1998), en la regulación de la fuerza osmótica en el citoplasma, formación de flagelos y el metabolismo de trehalosa (Kleczkowski y col., 2004; Thoden y Holden, 2007b). Además, otros nucleótidos azúcares importantes como UDP-xilosa, UDP-ácido glucurónico y UDP-Gal son derivados de UDP-Glc (Turnock y Ferguson, 2007). En bacterias, algunos de estos azúcares activados son utilizados para construir la cápsula bacteriana compuesta por polisacáridos que frecuentemente representan el único determinante de virulencia de estos organismos (Bonofiglio y col., 2005). En una amplia variedad de organismos la UDP-Glc está involucrada en el monitoreo y asistencia del plegamiento de proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático debido a que es sustrato de la enzima UGGT: *unfolded glycoprotein glucosyltransferase* (Parker y col., 1995; Flores-Diaz y col., 1997; Trombetta y Parodi, 2003; Helenius y Aebi, 2004). De esta manera la UDP-Glc aparece como un compuesto clave en la biología de la mayoría de los organismos.

1.2.5 UDP-Glc pirofosforilasa

La enzima UDP-Glc pirofosforilasa (EC 2.7.7.9, UDP-GlcPPasa) cataliza la producción de UDP-Glc a partir de Glc-1P y UTP, con liberación de PPI, en presencia del catión Mg^{2+} mediante la siguiente reacción reversible (Fig. 16):

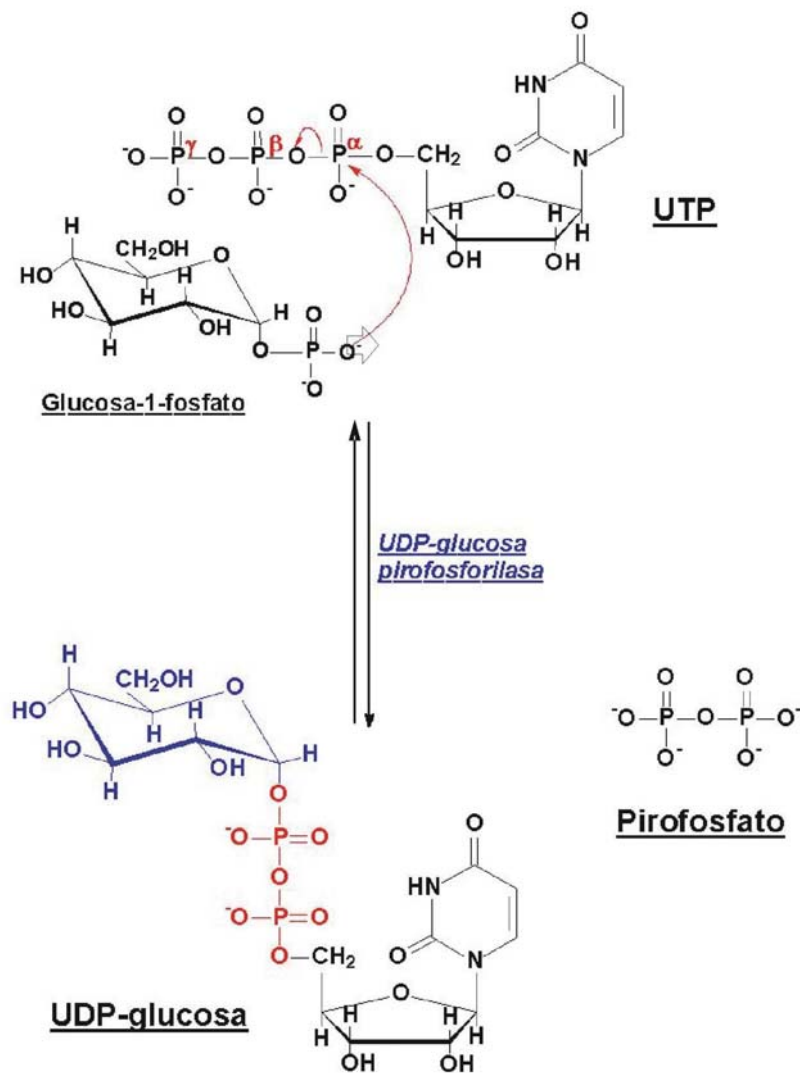


Figura 16. Mecanismo de reacción de la enzima UDP-GlcPPasa. Imagen tomada de <http://www.web.usal.es/>.

La enzima emplea el catión divalente como cofactor esencial para su actividad catalítica como ya ha sido establecido para otras nucleotidiltransferasas (Villar-Palasi y Larner, 1960; Pannbacker, 1967; Nakae y Nikaido, 1971). Esta proteína se encuentra presente en una variedad de organismos como plantas, animales y microorganismos en general. Las formas procariotas y eucariotas de la enzima no se encuentran relacionadas a nivel de secuencia de aminoácidos y estructura tridimensional (Flores-Diaz y col., 1997; Mollerach y col., 1998; Mollerach y Garcia, 2000). Las enzimas derivadas de organismos procariotas contienen alrededor de 300 aminoácidos mientras que las provenientes de organismos eucariotas poseen alrededor de 500 residuos aminoacídicos.

Existe una marcada diferencia, a nivel de los residuos aminoacídicos que, en organismos procariotas y eucariotas, están involucrados en la catálisis y en la unión a los sustratos, mostrando ser significativamente divergentes desde el punto de vista evolutivo (Chang y col., 1999).

1.2.5.1 UDP-GlcPPasas bacterianas

La UDP-GlcPPasa es una proteína fundamental para la adhesión y virulencia de numerosas bacterias Gram negativas debido a que está involucrada en la síntesis de polisacáridos capsulares y lipopolisacáridos (Genevaux y col., 1999). En bacterias entéricas tales como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* la enzima participa en el metabolismo de la galactosa, donde el azúcar es primeramente convertida en Gal-1P por una galactoquinasa, y luego es uridilada con UDP-Glc mediante la galactosa-1P uridililtransferasa para formar UDP-Gal. La Glc-1P generada es metabolizada en la vía glucolítica mientras que la UDP-Glc es regenerada a partir de la UDP-Gal mediante la UDP-Glc 4'epimerasa. Debido a que la UDP-Glc es necesaria para metabolizar galactosa, la UDP-GlcPPasa es esencial en este metabolismo (Hossain y col., 1994). De hecho mutantes de *E. coli* deficientes en UDP-GlcPPasa son incapaces de metabolizar Gal, por lo tanto la Glc y Gal no son incorporadas dentro de las paredes y membranas bacterianas, resultando en una síntesis incompleta de la cadena lateral de los lipopolisacáridos y del receptor para bacteriófago de la superficie celular (Fukasawa y col., 1962; Sundararajan y col., 1962).

Se ha determinado que la enzima UDP-GlcPPasa está asociada con la producción de exopolisacáridos (EPS) en algunas cepas de *Streptococcus thermophilus* cultivadas en medios con glucosa o lactosa como única fuente de carbono (Escalante y col., 1998). Otro ejemplo que destaca la participación metabólica de la UDP-GlcPPasa es el caso de *Streptococcus pneumoniae* el cual muestra (Fig. 17) un absoluto requerimiento de esta enzima para la producción del polisacárido de la cápsula que contiene Glc, Gal, UDP-ácido glucorónico (UDP-GlcA) o UDP-ácido galacturónico (UDP-GalA), operando como factor de virulencia. Este polisacárido también representa un blanco apropiado para el desarrollo de inhibidores (Mollerach y col., 1998; Bonofiglio y col., 2005)

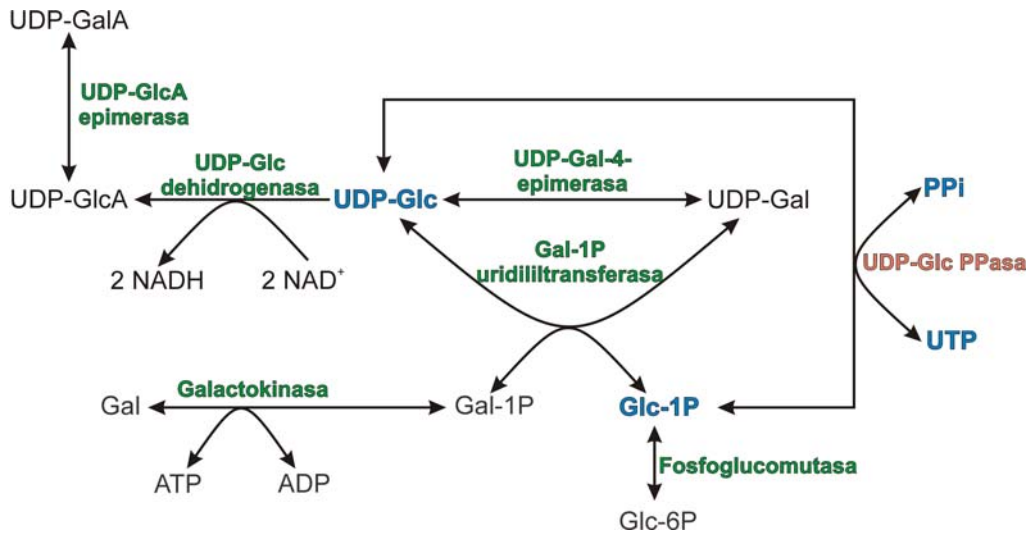


Figura 17. Esquema de la ruta metabólica propuesta para la UDP-Glc en *Streptococcus pneumoniae*. Imagen modificada tomada de Mollerach y col., 1998.

La bacteria *Sphingomonas elodea* es un microorganismo usado industrialmente para la síntesis de una goma de exopolisacáridos aprovechado como agente gelificante y estabilizante de alimentos. La vía de producción de este compuesto es un proceso de múltiples etapas comenzando con la formación intracelular de precursores de nucleótidos azúcares, UDP-Glc, UDP-GlcA y dTDP-L-Rha, donde la UDP-GlcPPasa juega un rol fundamental en la producción del polímero (Sa-Correia y col., 2002). En el mismo plano, bacterias del género *Xanthomonas* (*Xanthomonas sp*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*) producen polisacáridos estrictamente relacionados a UDP-Glc (goma xantano) y los genes *galU* que codifican para las pirofosforilasas han sido clonados y caracterizados recientemente (Becker y col., 1998; Bosco y col., 2009). Otro ejemplo es *Pseudomonas aeruginosa*, donde el producto del gen *galU* es un factor de virulencia requerido como facilitador de la infección de la córnea (Priebe y col., 2004).

La mayor parte de las enzimas provenientes de organismos procariotas reportadas hasta el momento, como ser *E. coli* (Fig. 18), *S. elodea* y *Corynebacterium glutamicum*, tienen la característica de tener una estructura tetramérica (dímeros de dímeros), mientras que la enzima de *Xanthomonas* es dimérica (Bosco y col., 2009).

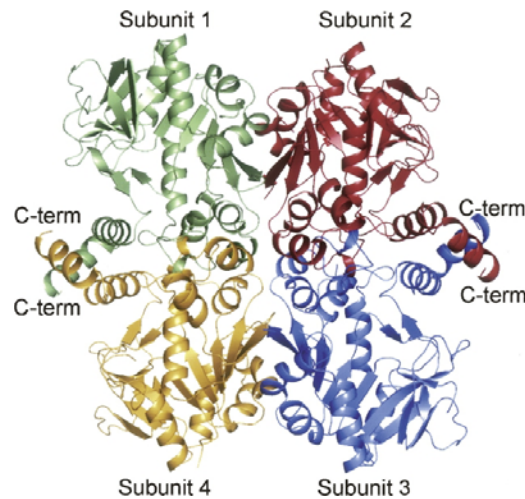


Figura 18. Esquema de la arquitectura molecular de la UDP-GlcPPasa de *E. coli*. Representación de un modelo de cintas para la enzima tetramérica, postulada como dímero de dímeros, en donde se observa la disposición de las cuatro subunidades. Imagen tomada de Thoden y Holden, 2007b.

Pese a diferencias a nivel de las secuencias aminoacídicas y de los estados de oligomerización, las estructuras cristalinas de estas enzimas (UDP-GlcPPasa) en comparación con otras nucleotidiltransferasas (citidililtransferasas y timidililtransferasas, por ejemplo), revelan un similar plegamiento del dominio catalítico (tipo Rossman, con hojas β centrales rodeadas por α -hélices). En las estructuras cristalinas de la enzima de *E. coli* y *C. glutamicum*, el dominio C-terminal de cada monómero está formado por una α -hélice que interactúa con la α -hélice del dominio C-terminal de la otra subunidad, formando un “dímero fuerte”. Esto indica que esta interacción es esencial en el ensamblado del dímero, junto con la región en donde una subunidad se cierra sobre el sitio activo de la otra subunidad (Thoden y Holden, 2007b; a).

1.2.5.2 UDP-GlcPPasas eucariotas

Diferentes trabajos científicos indican que las UDP-GlcPPasas de organismos eucariotas juegan un rol central en el metabolismo de hidratos de carbono ya que regulan la generación de uno de los metabolitos claves como lo es la UDP-Glc. Actualmente, se conocen las estructuras cristalinas de varias de ellas. En *Leishmania major*, un parásito protozoario causante de la leishmaniosis, se expresan a nivel de la superficie celular varios glicoconjugados que son dinámicamente modificados durante el ciclo celular. La biosíntesis de estos glicoconjugados depende fundamentalmente de la disponibilidad de azúcares nucleótidos activados. La

UDP-GlcPPasa es en este organismo una enzima clave para la activación de glucosa y galactosa (Fig. 18), representando un factor de virulencia (Steiner y col., 2007).

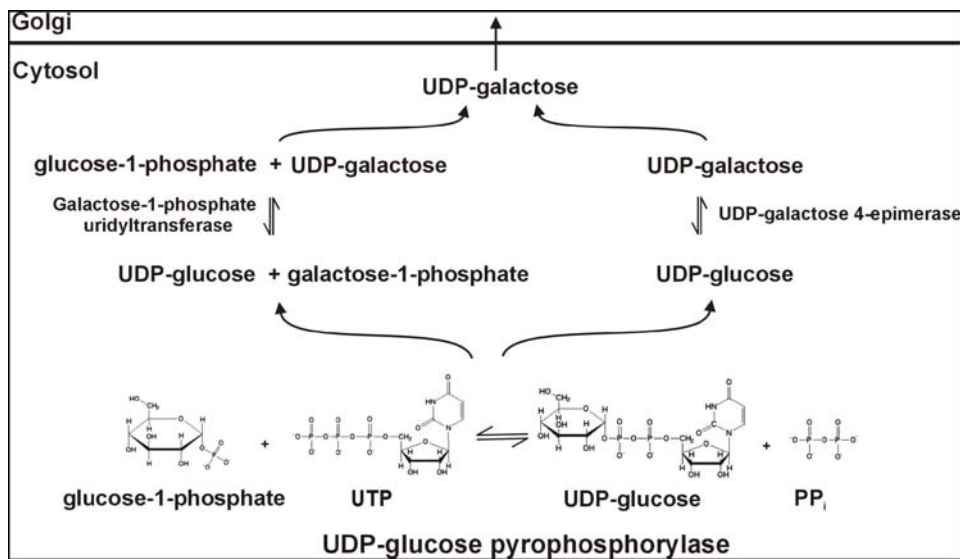


Figura 18. Esquema de la síntesis de UDP-Glc en *L. major*. La activación metabólica de la Gal depende de la actividad de la enzima UDP-GlcPPasa. Sólo el azúcar activado, UDP-Gal, puede ser transportado al aparato de Golgi. Imagen tomada de Lamerz y col., 2006.

En plantas, la enzima cobra especial importancia debido a que su rol primario es la biosíntesis y partición de sacarosa (Kleczkowski y col., 2004). En hojas jóvenes y también en hojas maduras la UDP-GlcPPasa se encuentra involucrada principalmente en la ruta biosintética de la sacarosa, proveyendo de UDP-Glc para la sacarosa-P sintetasa, mientras que en otros tejidos, incluyendo las hojas inmaduras apicales, la enzima está involucrada en la partición de sacarosa utilizando la UDP-Glc producida por la sacarosa sintasa. Se ha propuesto que en algunos tejidos vegetales, específicamente endosperma de cereales, la sacarosa generada por la vía de la UDP-Glc estaría generando ADP-Glc luego de la degradación del disacárido por la promiscuidad observada en la sacarosa sintasa. La ADP-Glc citosólica así generada (producto de conversión equimolar de ADP-Glc a partir de UDP-Glc) sería el sustrato utilizado para la síntesis de almidón en estos tejidos de plantas (Kleczkowski, 1994; Kleczkowski y col., 2004).

En tejidos animales y hongos las funciones de la UDP-GlcPPasa están asociadas a la partición de hexosas-P entre las distintas vías metabólicas y anabólicas celulares, quedando sujeta a regulaciones que se dan a varios niveles. La inactivación del gen que codifica para la UDP-GlcPPasa de fibroblastos generó un descenso en los niveles de

UDP-Glc y glucógeno, cualquiera de los cuales puede ser responsable de la pérdida de actividad de la enzima glucógeno sintasa (Higuita y col., 2003). En *S. cerevisiae*, la enzima es esencial y una PAS quinasa está implicada en la regulación de la actividad UDP-GlcPPasa y glucógeno sintasa por fosforilación directa y por fosforilación de factores traduccionales (Daran y col., 1995; Rutter y col., 2002).

Las UDP-GlcPPasas eucariotas son proteínas citosólicas abundantes. Sus secuencias aminoacídicas se encuentran altamente conservadas, por ejemplo la enzima humana y la de *S. cerevisiae* comparten un 55% de identidad de secuencia sugiriendo una elevada homología a nivel estructural (Daran y col., 1995). En animales se han encontrado tanto en forma de complejos octaméricos como formas monoméricas y diméricas, las cuales pueden coexistir. En plantas sólo la forma monomérica parece ser activa enzimáticamente. De igual manera para la enzima del parásito *L. major* (Martz y col., 2002; Geisler y col., 2004; Lamerz y col., 2006; McCoy y col., 2007).

Las estructuras resueltas a partir de la cristalización de la enzima de diferentes organismos eucariotas presentan un dominio central, en el cual se localiza el sitio activo de la enzima, y es un núcleo hidrofóbico altamente conservado, no así los dominios N- y C-terminales, los cuales difieren entre las UDP-GlcPPasas eucariotas, quizás reflejando la diversidad en funciones de la enzima para estos organismos (Geisler y col., 2004).

1.3 Cuestión de supervivencia

La mayoría de los microorganismos patógenos, tanto eucariotas como procariotas, desarrollaron a lo largo de la evolución diferentes mecanismos, los cuales les han permitido adaptarse a los cambios a nivel de los ecosistemas. Esta adaptación trajo consigo la necesidad de emprender el desarrollo de nuevos sistemas que les permitieran poder evadir, por ejemplo, al sistema inmune del hospedero, y potenciar su virulencia y patogenia para asegurar su existencia. La mayoría de estos sistemas se localizan a nivel de la superficie celular, debido a que es el primer punto de contacto del organismo con el medio ambiente y sobre todo con el hospedero. Es por eso que cada microorganismo en particular dispone de una vía de síntesis para determinadas moléculas de la superficie celular. Estas moléculas generalmente son glicoconjugados (Hamada y Slade, 1980; Haynes y col., 1996; Clark y col., 2000; Moody-Haupt y col., 2000; Guha-Nijoyi y col., 2001). Algunos están perfectamente definidos y otros se encuentran en estudio. Las rutas de síntesis de estos compuestos son tópicos de estudio de gran relevancia si se quiere avanzar en el entendimiento de la bioquímica, biología y fisiología de estos organismos y, en el caso de organismos patógenos, podrían ser de utilidad en el diseño racional de drogas efectivas para tratamientos alternativos.

La UDP-GlcPPasa es una de las enzimas que participa en el proceso de síntesis de distintos glicoconjugados de importancia a nivel celular. Más arriba, detallamos la importancia de distintos oligo- y polisacáridos en distintos procesos fisiológicos y en la patogenia en *S. mutans*, *E. histolytica* y *Trypanosoma* spp. Una visión integradora permite establecer que en estos microorganismos la UDP-GlcPPasa debiera jugar una función metabólica de particular relevancia, pese a lo cual la enzima de estas fuentes ha sido pobremente caracterizada hasta el presente. Este trabajo de Tesis doctoral trata sobre el clonado molecular de los genes codificantes para la UDP-GlcPPasa en *S. mutans*, *E. histolytica* y tripanosomátidos, así como la expresión heteróloga de los mismos, la purificación y caracterización cinética, regulatoria y estructural de las enzimas recombinantes. De esta forma, se busca la obtención de información a nivel molecular que permita una mayor comprensión del metabolismo de los hidratos de carbono y su relación con la fisiología y capacidad para interaccionar con diferentes células de organismos procariotas y eucariotas.

2. OBJETIVOS

- **Objetivo general:**

Realizar estudios de caracterización de UDP-GlcPPasas de diferentes microorganismos. Analizar en forma comparativa las propiedades estas enzimas con aquellas correspondientes a la ADP-GlcPPasa, con el objeto de avanzar en la comprensión del proceso de partición metabólica de la Glc-1P y de los mecanismos regulatorios en diferentes células.

- **Objetivos específicos:**

1. Identificación, clonado, expresión heteróloga y caracterización funcional de la enzima UDP-GlcPPasa de *S. mutans*. Generación de un gen quimérico *smUDP-GlcPPasa/ecADP-GlcPPasa C-terminal*, clonado, expresión heteróloga y caracterización funcional de la enzima quimérica. Analizar las propiedades cinéticas y regulatorias de la UDP-GlcPPasa en comparación con la ADP-GlcPPasa.
2. Clonado molecular del gen que codifica para UDP-GlcPPasa de microorganismos eucariotas. Expresión del gen en células heterólogas para permitir la purificación en cantidades que faciliten estudios estructurales y cinéticos.
 - a- Identificación, clonado, expresión heteróloga y caracterización funcional de la enzima UDP-GlcPPasa de *E. histolytica*. Realización de estudios de mutagénesis y análisis estructural, funcional y regulatorio de la enzima.
 - b- Identificación, clonado, expresión heteróloga y caracterización funcional de las isoenzimas UDP-GlcPPasa de *T. cruzi*. Estudio de los mecanismos de regulación de la actividad UDP-GlcPPasa.
 - c- Identificación, clonado, expresión recombinante y caracterización funcional de la UDP-GlcPPasa de *T. brucei*. Estudio de los mecanismos de regulación de la actividad de la enzima.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos y enzimas comerciales

Los reactivos químicos utilizados como sustratos o efectores en las reacciones enzimáticas se obtuvieron de la firma Sigma-Aldrich. Los reactivos utilizados en la preparación de soluciones reguladoras y medios de cultivo fueron de la mejor calidad disponible. Los reactivos y enzimas utilizadas en las técnicas de biología molecular fueron adquiridos de los representantes de Promega, Invitrogen y Fermentas en Argentina. Los materiales para purificación de proteínas fueron adquiridos de la firma GE Healthcare. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Genosys.

3.2 Vectores utilizados

a. pCR[®]4Blunt-TOPO[®] (Invitrogen Ltd.): Vector de clonado (3,9 kb) para productos de PCR con extremos romo, fragmentos amplificados usando *Pfu*DNA polimerasa. Se puede utilizar ampicilina y/o a kanamicina como antibiótico de selección (<http://invitrogen.com/>).

b. pGEM-T Easy (Promega): Vector de clonado (3,0 kb) para productos de PCR, contiene una secuencia de timidina en el extremo 3' que admite el clonado de productos de PCR generados con *Taq*DNA polimerasa. Permite alfa complementación y contienen gen de resistencia a ampicilina (<http://promega.com/>).

c. pRSET-B (Invitrogen Ltd.): Vector de expresión (2,9 kb) inducible por IPTG, contiene el promotor T7, permite obtener la proteína de interés fusionada a una etiqueta de histidinas en extremo N-terminal, y posee el gen de resistencia a ampicilina (<http://invitrogen.com/>).

d. pET24b (Novagen): Vector de expresión (5,3 kb) inducible por IPTG y contiene el promotor T7. Se puede emplear kanamicina como antibiótico de selección (<http://novagen.com/>). Este vector se utilizó únicamente para realizar la expresión de la enzima *Sm*UDP-GlcPPasa sin etiqueta de histidinas.

3.3 Cepas bacterianas utilizadas

- *Escherichia coli* TOP10: F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻ (Invitrogen).
- *Escherichia coli* BL21 (DE3): F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) (Invitrogen).

3.4 Medios de cultivo

- Luria-Bertani (LB). Composición: triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 5 g y agua desionizada (csp 1 l), pH 7.
- LB-agar. Composición: medio LB y agar-agar 1,8% (p/v).
- LB-glucosa. Composición: medio LB y Glc 2,0% (p/v).
- YT 2X. Composición: triptona 10 g, extracto de levadura 16 g, NaCl 5 g y agua desionizada (csp 1 l).

3.5 Antibióticos

- Kanamicina (Kan). Concentración final 50 µg/ml.
- Ampicilina (Amp). Concentración final 100 µg/ml.

3.6 Microorganismos empleados

- *Streptococcus mutans*

En este trabajo se empleó *S. mutans* de la cepa registrada con el número ATCC 25175, cedida por la Dra. María Cristina Apella del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA) de Tucumán.

- *Trypanosoma cruzi*

Se emplearon células de *T. cruzi* cepa CL-Brener y Tulahuen O. Los epimastigotes se cultivaron axénicamente (en Laboratorio de Bioquímica Microbiana- FBCB-UNL, Argentina) bajo condiciones de crecimiento exponencial a 28 °C en medio LIT suplementado con hemina 20 µg/ml y suero fetal bovino al 10% (Gomez y col., 1989).

- *Trypanosoma brucei*

Las células fueron cedidas gentilmente por la Dra. M. Teresa Tellez-Iñon (INGEBI-UBA, CONICET, Argentina).

- *Entamoeba histolytica*

Los trofozoitos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS fueron cultivados axénicamente en el Laboratorio del Dr. Hugo Lujan (Universidad Católica de Córdoba-CONICET,

Argentina) a 36,5 °C en medio TYI-S-33 suplementado con suero bovino de adulto inactivado por calentamiento al 12%(v/v) y complejo vitamínico de Diamond al 2% (p/v) (Diamond y col., 1978).

3.7 Extracción de ADN

- ADN genómico de *S. mutans*

El ADN se obtuvo empleando el siguiente protocolo: Se partió de 5 ml de un cultivo de *S. mutans* ATCC 25175 crecido durante 24 h a 37 °C en atmósfera al 3% de CO₂. Se centrifugó el cultivo a 10000 x g a 4 °C durante 10 min. Las células se resuspendieron en 1 ml de *Buffer* TE 1X (EDTA 0,1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0) y se centrifugaron a 10000 x g a 4 °C durante 10 min. Al precipitado resultante se lo resuspendió en *Buffer* SET (NaCl 75mM, EDTA 25mM, Tris-HCl 20mM pH 7,5) y lisozima (concentración final 1 mg/ml), incubando durante 2 h a 37 °C. Luego, se adicionaron 28,5 µl de SDS 10% (p/v) y 6,5 µl de proteinasa K 10mg/ml (Promega) y se procedió a incubar la muestra a 55 °C durante 2 h. Posteriormente, se adicionaron 112 µl de NaCl 5 M, mezclando por inversión y 430 µl de la mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se dejó reposar durante 30 min y se centrifugó a 6000 x g durante 10 min a 4 °C. A la fase acuosa obtenida en el paso anterior se le adicionó 1 ml de alcohol isopropílico e incubó a 4 °C durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó la muestra a 6000 x g por 3 min. Al precipitado resultante se lo lavó dos veces con etanol al 70% (v/v) y, finalmente, al ADN precipitado se lo resuspendió en 50 µl de agua estéril y se lo trató con ARNasa (50 µg/ml concentración final) durante 30 min a 37 °C, con posterior inactivación de la enzima durante 10 min a 95 °C. La muestra se conservó en alícuotas a -20 °C.

- ADN genómico de *T. cruzi*, *T. brucei* y *E. histolytica*

El ADN genómico de cada organismo se obtuvo según la metodología descrita por Sambrook (Sambrook y col., 1989) a partir de las células obtenidas según lo descrito en 3.6.

3.8 Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos de ADN se resolvieron electroforéticamente en geles de agarosa al 1% (p/v) con *Buffer* TAE (Tris 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM) en presencia de bromuro de etidio 0,3 µg/ml. Las muestras se acondicionaron con glicerol 3% (v/v) y Azul de Bromofenol 0,05% (p/v) antes de realizar la siembra. Las corridas electroforéticas se realizaron empleando el sistema Mini-Sub[®] Cell GT(Bio-Rad). Los

fragmentos se visualizaron con un transiluminador UV a 302 nm (DyNA Light, LabNet International Inc.).

3.9 Oligonucleótidos

Para amplificar el gen que codifica la UDP-GlcPPasa de las distintas fuentes microbianas se diseñaron los oligonucleótidos teniendo en cuenta secuencias disponibles en la base de datos de los proyectos genoma de cada uno de los microorganismos empleados. Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 3.1.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Sitio de Restricción
EhU Fo	<u>GGATCC</u> CATGGA ^{ACT} CAA ^{AAT} TAAATCA	<i>Bam</i> HI
EhU Re	AAGCTT ^{TT} AGAATGTTAATGTAGTAT	<i>Hind</i> III
SmU Fo	<u>GGATCC</u> CATGCCAAGTAAAAAAGTCAG	<i>Bam</i> HI
SmU Re	<u>GAATTC</u> CCTTAATCCGAGTTCTTTGAG	<i>Eco</i> RI
SmU _{SH} Fo	<u>CATATG</u> CCAAGTAAAAAAGTCAGAAAAGC	<i>Nde</i> I
SmU _{SH} Re	<u>GAATTC</u> CCTTAATCCGAGTTCTTTGAG	<i>Eco</i> RI
TbU Fo	<u>GGATCC</u> CATGCCGCTAAACCCTCCTTC	<i>Bam</i> HI
TbU Re	<u>GAATTC</u> CTACTCGACTACCACAACCT	<i>Eco</i> RI
TcU1 Fo	<u>GGATCC</u> CATGTCGTCTGTGACTGCGGC	<i>Bam</i> HI
TcU1 Re	<u>GAATTC</u> CCTAAACCTCCATCACTTCAT	<i>Eco</i> RI
TcU2 Fo	<u>GGATCC</u> CATGTCGTCTGTAAGTGGGG	<i>Bam</i> HI
TcU2 Re	<u>AAGCTT</u> CTAAACCTCCATCACTTCAT	<i>Hind</i> III

Tabla 3.1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para amplificar los genes que codifican las UDP-GlcPPasa de *E. histolytica* (Eh), *S. mutans* (Sm) (con y sin etiqueta de histidinas), *T. brucei* (Tb) y *T. cruzi* (Tc) (2 secuencias putativas). Las secuencias subrayadas corresponden a los sitios de restricción diseñados para introducir los genes amplificados en el correspondiente vector de expresión.

Los oligonucleótidos utilizados para introducir las mutaciones en el gen que codifica para la UDP-GlcPPasa de *E. histolytica* se diseñaron de forma tal que el codón a mutar se ubicara en el centro de la molécula, según lo detalla la Tabla.3.2.

Nombre	Secuencia 5'-3'
EhU M106C Fo	GGATTAGGAACATCT <u>TGT</u> GGATGACTGGT
EhU M106C Re	ACCAGTACATCC <u>ACA</u> AGATGTTCTAATCC
EhU M106S Fo	GGATTAGGAACATCT <u>TCG</u> GGATGACTGGT
EhU M106S Re	ACCAGTACATCC <u>CGA</u> AGATGTTCTAATCC
EhU C94S Fo	TTAAAGAAA <u>ACTTCT</u> ATTATTAAG
EhU C94S Re	CTTAATAAT <u>AGA</u> AGTTTTCTTTAA
EhU C108S Fo	CATCTATGGGAT <u>CT</u> ACTGGTCCAAAAAG
EhU C108S Re	CTTTTGGACCAGT <u>AGAT</u> CCCATAGATG
EhU C191S Fo	CTCTTCTCCTGTAT <u>TCT</u> ACTGAATTAATGG
EhU C191S Re	CCATTTAATTCAGT <u>AGATA</u> CAGGAAGAAGAG
EhU C354S Fo	GAAATTGCAGTTGGAT <u>TCT</u> GCAGTAAGTGCATTG
EhU C354S Re	CAAATGCACTTACTGC <u>AGA</u> TCCAAGTCAATTC
EhU C378S Fo	CCAGTAAAAGCATCTAATGATTTATTT
EhU C378S Re	AAATAAATCATT <u>AGAT</u> GCTTTTACTGG

Tabla 3.2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para amplificar los genes que codifican las UDP-GlcPPasa mutantes de *E. histolytica*. Las secuencias subrayadas corresponden a los codones necesarios para introducir las mutaciones deseadas en el gen blanco.

Los oligonucleótidos necesarios para generar el gen quimérico que codifica la enzima [N-term-*Sm*UDP-GlcPPasa/*Ec*ADP-GlcPPasa-C-term] fueron aquellos utilizados para el clonado de la UDP-GlcPPasa de *S. mutans* y los que se diseñaron teniendo en cuenta la secuencia de aminoácidos de la región C-terminal de la ADP-GlcPPasa de *Escherichia coli* (más precisamente desde la Pro 295) (Tabla 3.3). De esta forma se buscó generar una enzima quimérica que contuviese el gen completo de la *Sm*UDP-GlcPPasa con una adición del extremo C-terminal de las ADP-GlcPPasas, caracterizado como dominio involucrado en la regulación alostérica de estas últimas pirofosforilasas y ausente en las otras (incluyendo las UDP-GlcPPasas).

Nombre	Secuencia 5'-3'	Sitio de Restricción
SmU Fo	<u>GGATCC</u> CATGCCAAGTAAAAAAGTCAG	<i>Bam</i> HI
SmUEcA Fo	CTCGGACCCGGA <u>ACTGGATATGTACGATC</u>	
SmUEcA Re	GTTCCGGGTCCGAGTTCTTTT <u>GAGTCG</u>	
EcA Re	<u>CTCGAG</u> TTATCGCTCTGTTTATGCC	<i>Xho</i> I

Tabla 3.3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para amplificar el gen que codifica para la enzima quimérica *Sm*UDP-GlcPPasa/*Ec*ADP-GlcPPasa C-terminal. Las secuencias subrayadas corresponden a los sitios de restricción diseñados para introducir los genes amplificados en el correspondiente vector de expresión.

3.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar los genes de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizó el ADN de cada muestra y los oligonucleótidos específicos descritos anteriormente. Las reacciones se realizaron empleando ADN genómico o plasmídico según el caso, dNTPs 2 mM, oligonucleótidos 0,1 mM, MgCl₂ 2 mM, PCR *buffer* 1X y 1,25 U de *Pfu* ADN polimerasa (Fermentas) en un volumen final de 20-50 µl. El programa básico utilizado en todos los casos fue el siguiente: 95 °C, 1 min; 95 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 2 min; 30 ciclos; 72 °C, 5 min. Las reacciones se realizaron en un termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf), los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.11 Generación del gen quimérico

Para amplificar el gen quimérico *smUDP-GlcPPasa/ecADP-GlcPPasa c-terminal* se empleó la técnica *Overlap Extension PCR* (Higuchi y col., 1988), utilizando ADN plasmídico correspondiente a las construcciones p[TOPO/*SmUDP-GlcPPasa*] (1) y p[TEC/*EcADP-GlcPPasa*] (2) como molde y los oligonucleótidos específicos descritos anteriormente. Inicialmente, se realizaron dos reacciones de PCR por separado. En la reacción N° 1 se utilizó como molde el ADN plasmídico 1 y los oligonucleótidos *SmUFo* y *SmUEcARe* y en la reacción N° 2 el ADN plasmídico 2 y los oligonucleótidos *SmUEcAFo* y *EcARe*. Los productos de PCR obtenidos en las reacciones 1 y 2 se juntaron y la mezcla se empleó como molde para una tercera reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos *SmUFo* y *EcARe* como cebadores. Todas las reacciones se realizaron según lo descrito en el punto 3.10.

3.12 Mutagénesis sitio-dirigida

Con el objeto de introducir mutaciones en el gen que codifica para la UDP-GlcPPasa de *E. histolytica* se utilizó la técnica de *QuikChange* (<http://www.stratagene.com/>), la cuál consiste en la utilización de un par de oligonucleótidos portadores de la mutación y complementarios a una misma secuencia de ADN, en el centro de la cual se encuentra la región a mutar. Mediante la técnica de PCR se extienden ambas cadenas del ADN molde (plásmido). Luego, el templado se remueve por digestión con la enzima de restricción *DpnI* (la enzima reconoce la secuencia blanco: 5-Gm6ATC-3, donde el residuo A está metilado, por lo tanto digiere el ADN molde metilado pero no el ADN mutante sintetizado) y el ADN sintetizado en la reacción de PCR se utiliza para

transformar células de *E. coli* TOP10. La búsqueda de clones que contengan la mutación se realiza mediante secuenciación.

3.13 Clonado de los genes

Los productos amplificados por PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y la banda de interés se cortó del gel y purificó con el equipo comercial *Wizard[®] Plus PCR Preps DNA Purification System* (Promega) de acuerdo con las indicaciones suministradas por el fabricante. Las muestras purificadas se ligaron al vector de clonado pCR[®]4Blunt-TOPO[®] (Invitrogen Ltd.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Excepcionalmente, las muestras correspondientes al gen quimérico y al gen codificante de la enzima *SmUDP-GlcPPasa*, sin etiqueta de histidinas, se ligaron al vector de clonado pGEM-T Easy (Promega).

3.14 Transformación de *E. coli* por el método de CaCl₂

Se partió de un cultivo saturado de la cepa de *E. coli* correspondiente para inocular medio LB fresco en una dilución 1/20. Las células crecieron en agitación a 37 °C hasta DO₆₀₀ ~ 0,6, se colocaron en hielo por 10 min y se centrifugaron a 4 °C a 5000 x g durante 5 min. Luego, las células se resuspendieron en la mitad del volumen inicial con *ST1* (MOPS-NaOH pH 7,0 10 mM, KCl 10 mM). Inmediatamente, se lavaron con el mismo volumen de *ST2* (MOPS pH 6,5 100 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 100 mM) y finalmente se resuspendieron en 1/10 del volumen inicial con *ST2*. Para transformar las células competentes, a una alícuota de 100 µl se le adicionaron de 2 a 4 µl de ADN plasmídico (~100 ng). La mezcla se incubó en hielo durante 1 h y posteriormente las células se procesaron con un pulso térmico de 45 s a 42 °C. Las células se recuperaron en medio LB-glucosa durante 1 h a 37 °C y se sembraron en placas de Petri conteniendo medio LB-agar suplementado con el antibiótico correspondiente. Finalmente, las células se cultivaron durante 16 a 18 h a 37 °C y se seleccionaron de 10 a 20 clones para su posterior análisis.

3.15 Extracción de ADN plasmídico y secuenciación

Las *E. coli* transformadas que contenían el vector con el inserto se repicaron en medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente y se cultivaron a 37 °C durante 16 a 18 h. Las células se cosecharon por centrifugación y se extrajo el ADN plasmídico utilizando el equipo comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification*

System (Promega). La obtención del ADN plasmídico se corroboró por electroforesis en gel de agarosa. La secuenciación nucleotídica automática de los genes de interés fue llevada a cabo por la empresa Macrogen (Corea del Sur).

3.16 Subclonado

Para introducir el gen de interés dentro del vector de expresión, se procedió a digerir el ADN plasmídico con las enzimas de restricción adecuadas para cada caso, con el objeto de liberar el inserto. Rápidamente, la muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa y la banda de interés se purificó a partir del gel (según inciso 3.13). De la misma manera, se digirió el vector de expresión empleando las mismas enzimas con las que se liberó el gen de interés del vector de clonado. Posteriormente, el vector de expresión digerido se precipitó con etanol 67% (v/v) y acetato de sodio 0,1 M incubando a -20 °C durante 16 a 18 h y posterior centrifugación a 15000 x g durante 15 min a 4 °C. Finalmente, el vector digerido se resuspendió en agua Milli-Q esterilizada. El inserto y el vector se ligaron utilizando T₄ ADN ligasa (Promega) a 16 °C durante toda la noche. Se transformaron células de *E. coli* TOP10 con la mezcla de ligación.

3.17 Expresión de las proteínas recombinantes

3.17.1 Expresión de la UDP-GlcPPasa y quimera

Se transformaron células *E. coli* BL21(DE3) con las construcciones que contenían el gen de interés en el vector de expresión pRSET-B. Las células transformadas se cultivaron en medio YT 2X y LB (según corresponda a la enzima UDP-GlcPPasa ó quimera, respectivamente) suplementado con Amp 100 µg/ml hasta saturación. Luego, 1 l de medio YT 2X ó LB, suplementado con el mismo antibiótico, se inoculó con una dilución 1/100 del cultivo saturado y las células se cultivaron a 28 °C en agitador orbital a 180 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ ~1,2. Posteriormente, se indujeron las células con IPTG 0,8 mM ó 0,5 mM según corresponda, durante 16 h a 25 °C en agitador orbital a 200 rpm. Las células se cosecharon por centrifugación a 5000 x g durante 10 min y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

3.17.2 Expresión de la SmUDP-GlcPPasa sin etiqueta de histidinas

Se transformaron células *E. coli* BL21 (DE3) con la construcción [pET 24a/SmUDP-GlcPPasa]. Las células transformadas se cultivaron en medio YT 2X, suplementado con

Kan 50 µg/ml, hasta saturación. Luego, 100 ml de medio YT 2X, suplementado con el mismo antibiótico, se inocularon con una dilución 1/100 del cultivo saturado y las células se cultivaron a 28 °C en agitador orbital a 180 rpm hasta alcanzar una $DO_{600} \sim 1,2$. Alcanzado este punto, se indujeron las células con IPTG 0,8 mM durante 16 h a 25 °C en agitador orbital a 200 rpm. Las células se cosecharon por centrifugación a 5000 x g durante 10 min y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

3.18 Purificación de las enzimas recombinantes

3.18.1 Purificación de las UDP-GlcPPasas fusionadas a etiquetas de histidinas, quimera y mutantes

Las células se resuspendieron en ~20 ml de *Buffer A* (Tris/ClH, pH 8,0 20 mM; NaCl 300 mM y imidazol 10 mM) y se rompieron por sonicación. En cada caso, la suspensión resultante se centrifugó a 10000 x g durante 15 min a 4 °C y la fracción soluble se sometió a un fraccionamiento salino con sulfato de amonio entre 30% y 80% de saturación. El precipitado obtenido se resuspendió en *Buffer A* y la muestra resultante se desaló utilizando columnas de 10 ml de Bio-Gel P-6DG Gel (Bio-Rad). Debido a que los genes que codifican para las UDP-GlcPPasas se subclonaron en un vector que les adiciona una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal, las diferentes construcciones se purificaron mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC). La muestra desalada se sembró en una columna conteniendo 2 ml de resina *Sepharose-IDA-Ni²⁺* (Invitrogen Ltd.) previamente equilibrada con *Buffer A*. La columna se lavó con *Buffer A* (10 volúmenes de columna) y la elusión de las proteínas retenidas se realizó con concentraciones crecientes de imidazol (20, 40, 60, 80 y 30 mM) en *Buffer A*. Las fracciones que contenían la proteína de interés se reunieron y a la muestra resultante se le adicionó EDTA 0,1 mM y DTT 0,1 mM. Las muestras fueron conservadas a -80 °C convenientemente fraccionadas y de esta forma las enzimas mantuvieron sus respectivas actividades durante, al menos, 6 meses.

3.18.2 SmUDP-GlcPPasa sin etiqueta de histidinas

Las células se resuspendieron en *Buffer B* [MOPS-NaOH pH 8,0 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0,1 mM, sacarosa 5% (p/v)], se rompieron por sonicación y se centrifugaron a 10000 x g durante 15 min a 4 °C. La fracción soluble se sometió a un fraccionamiento salino con sulfato de amonio entre 30% y 80% de saturación. El precipitado obtenido se resuspendió en *Buffer A* y la muestra resultante se desaló utilizando una serie de columnas conteniendo Bio-Gel P-6DG Gel (Bio-Rad). La

muestra desalada se sembró en una columna de 1 ml de DEAE-*Sepharose* CL-6B (Sigma) previamente equilibrada con *Buffer B*. La columna se lavó con *Buffer B* y la elusión de las proteínas retenidas se realizó con un gradiente de NaCl de 0 a 0,5 M en *Buffer B*. Las fracciones que contenían actividad de UDP-GlcPPasa fueron conservadas a -80 °C y de esta forma las enzimas mantuvieron sus respectivas actividades durante 6 meses, aproximadamente.

3.19 Medida de actividad enzimática

La unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para producir/consumir 1 μmol de producto/sustrato en 1 min bajo las condiciones especificadas para cada ensayo.

3.19.1 Medida de actividad de UDP-GlcPPasa

3.19.1.1 Sentido de pirofosforólisis de UDP-Glc

En este caso se empleó un método radioactivo que emplea [^{32}P]PPi y que permite cuantificar la producción de [^{32}P]UTP (Ghosh y Preiss, 1966). Los ensayos se realizaron en un medio que contenía MOPS-NaOH pH 8,0 50 mM, MgCl_2 5 mM, UDP-Glc 1 mM, [^{32}P]PPi 1 mM (1000 a 3000 cpm nmol $^{-1}$), NaF 10 mM, albúmina sérica bovina (BSA) 0,2 mg/ml y la muestra (en una dilución adecuada) en un volumen de 150 μl . Luego de 10 min de incubación a 37 °C, la reacción se detuvo con la adición de 1 ml de ácido tricloroacético 5% (p/v). El [^{32}P]UTP generado se adsorbió en carbón activado 15% (p/v) en NaCl 1 M. Luego de lavar el carbón activado con el adsorbido con agua desionizada fría, la marca radioactiva fue liberada por hidrólisis por la adición de HCl 1N y calentamiento a 100 °C durante 10 min. La radiación liberada fue medida en un contador de centelleo líquido.

3.19.1.2 Sentido de síntesis de UDP-Glc

La actividad de la UDP-GlcPPasa en el sentido de síntesis de UDP-Glc se realizó empleando el método colorimétrico que utiliza el colorante Verde de Malaquita, puesto a punto en nuestro laboratorio (Fusari y col., 2006). La mezcla de reacción contenía MOPS-NaOH pH 8,0 100 mM, MgCl_2 5 mM, Glc-1P 1 mM, UTP 1 mM, BSA 0,2 mg/ml, 0,025 U de pirofosfatasa inorgánica (Sigma) y la muestra (dilución conveniente) en un volumen de 50 μl . Luego de 10 min de incubación a 37 °C, la reacción se detuvo con el agregado de 375 μl de reactivo de color, adicionando posteriormente 50 μl de citrato de sodio 34% (p/v) con el objeto de estabilizar el color

desarrollado. La lectura de la absorbancia de cada muestra se realizó a 630 nm en un lector de microplacas (MultiskanAscent, Thermo Electron Corporation).

3.20 Análisis cinético

Los datos de actividad enzimática obtenidos en los ensayos se graficaron en función de la concentración de sustrato o efector y se ajustaron a la ecuación de Hill utilizando el programa Origin 7.0 (OriginLab). Se define como $S_{0,5}$ [$A_{0,5}$] a la concentración de sustrato [activador] que produce un 50% de la velocidad máxima (V_{max}) [activación máxima], respectivamente. En cada caso, se obtuvo el coeficiente de Hill (n_H) correspondiente. Los valores de los parámetros cinéticos son el resultado de al menos dos determinaciones con una variación menor a $\pm 10\%$.

3.21 Contenido proteico

Para determinar la concentración de proteínas de las muestras se utilizó el reactivo de Bradford (Bradford, 1976) y BSA como estándar.

3.22 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se realizó siguiendo la técnica descrita por Laemmli (Laemmli, 1970). La concentración del gel de apilamiento fue del 4%, mientras que la concentración del gel de separación se varió del 10% al 12,5%, dependiendo de la masa molecular de las proteínas a separar. La pureza de las muestras fue estimada por densitometría, utilizando el programa LabImage 2.7 (Kapelan). Los marcadores de masa molecular utilizados fueron de GE-Healthcare.

3.23 Estimación de la masa molecular de las proteínas en estado nativo

Para estimar la masa molecular de las proteínas recombinantes en su estado nativo, las muestras se sometieron a cromatografía de exclusión molecular. Para ello, se equilibró una columna de *Superdex* 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech) con *Buffer G* (Tris-HCl pH 7,5 25 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM). Como patrones de masa molecular, se utilizaron proteínas de masa molecular conocida: ovoalbúmina (43 kDa), BSA (67 kDa) e IgG de suero equino (140 kDa). Las muestras fueron eluidas a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min.

3.24 Modelado por homología

Los modelos por homología para la enzima UDP-GlcPPasa de *E. histolytica* fueron realizados en colaboración con el Dr. Sergio Garay del Departamento de Física de la FBCB-UNL. La búsqueda de los modelos disponibles para usar como plantados se realizó con la herramienta de identificación de plantados de Swiss Model Workspace (Arnold y col., 2006). Los plantados utilizados para generar el modelo de la enzima de *Eh*UDP-GlcPPasa fueron 5 (UDP-GlcPPasa de *Arabidopsis thaliana* con UTP y UDP-Glc y con cada uno de los ligandos por separado, la enzima de *L. major* y la de *Saccharomyces cerevisiae*). Los plantados seleccionados fueron alineados usando el programa STAMP (Russell y Barton, 1992), el cual se encuentra disponible en el programa VMD (Humphrey y col., 1996). Luego cada uno de los modelos blanco generado se alineó con los previamente obtenidos utilizando Clustal X 1.81 (Thompson y col., 1994). En base a estos últimos alineamientos se obtuvieron 25 modelos para la *Eh*UDP-GlcPPasa utilizando el programa Modeller 8v2 (Sali y Blundell, 1993). Se estableció como mejor modelo aquel que presentó mayor *global score* en verify3D (Bowie y col., 1991; Luthy y col., 1992) y mayor valor potencial DOPE1. Se corrió el programa PROCHECK para validar la estructura final obtenida y corroborar la calidad estereoquímica del modelo.

3.25 Ensayos de oxido-reducción

Ensayo de Oxidación: Se ensayó el efecto de diferentes compuestos oxidantes, tales como diamida, peróxido de hidrógeno y nitroprusiato de sodio (NPS), sobre la actividad de las enzimas de interés. La mezcla de reacción, que contenía MOPS pH 8,0 50 mM, BSA y proteína recombinante (concentración final: 0,1 a 0,2 µg/ml), se incubó a 25 °C en presencia de diferentes concentraciones de oxidantes. La incubación con NPS se realizó con exposición directa a la luz, debido a que su descomposición fotolítica juega un rol clave en la generación de óxido nítrico y otras especies reactivas de nitrógeno (Aleryani y col., 1999). La actividad UDP-GlcPPasa fue determinada empleando el método colorimétrico antes descrito y graficada en función de la concentración de oxidante.

Ensayo de reducción: Las enzimas fueron oxidadas a una concentración fija de cada oxidante ensayado y, posteriormente, se procedió a la eliminación del oxidante empleando sistemas de centrifugación/filtración (Millipore Corporation). Una vez oxidadada la enzima se tomaron alícuotas de la misma y se incubaron con diferentes

concentraciones de tiorredoxina 8 de *E. histolytica* (*EhTRX8*), tiorredoxina 41 de *E. histolytica* (*EhTRX41*), tiorredoxina de *T. brucei* (*TbTRX*), tiorredoxina de *E. coli* (*EcTRX*) y triparredoxina de *T. cruzi* (*TcTXN*), según corresponda. Las proteínas tiorredoxinas fueron previamente purificadas de acuerdo a Arias y col., Reckenfelderbauer y col. y Wilkinson y col., respectivamente (Reckenfelderbauer y col., 2000; Wilkinson y col., 2000; Arias y col., 2007; Arias y col., 2008). Las mismas fueron reducidas, previas a su uso, en presencia de DTT 0,5 mM, por 30 min a 25 °C. El ensayo de reducción se realizó también empleando DTT y L-cisteína (Sigma-Aldrich). La actividad de la UDP-GlcPPasa fue determinada empleando el método colorimétrico antes descripto y graficada en función de la concentración del agente reductor correspondiente.

3.26 Electrotransferencia seguida de inmunodetección

Realizada la SDS-PAGE, se efectuó la electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa (Sigma). Ésta se llevó a cabo durante 60 min a 180 mA en una solución que contenía Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20% (v/v). La membrana de nitrocelulosa transferida se bloqueó con una solución de TBS (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 y NaCl 150 mM) más leche descremada al 4% (p/v), incubándose 1 h a 37 °C. Luego, se incubó con una dilución adecuada de anticuerpos primarios anti *Tb*UDP-GlcPPasa [generados en conejo en el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL, Argentina; acorde a lo descripto anteriormente (Vaitukaitis y col., 1971)] durante 30 min a 37 °C. Luego de realizar lavados con TBS, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (anti-IgG totales de conejo, Sigma, en dilución 1/5000) durante 30 min a 37 °C. Las diluciones de los anticuerpos se realizaron con solución TBS suplementada con leche descremada al 1% (p/v). La reacción de revelado se llevó a cabo por la adición de una solución de TBS adicionada de DAB 0,05% (p/v) y H₂O₂ 10 volúmenes 0,01% (v/v), dejándose reaccionar hasta aparición de señal, en oscuridad a temperatura ambiente.

3.27 Inmunolocalización de la UDP-GlcPPasa en *E. histolytica*

El ensayo fue realizado en colaboración con el Laboratorio del Dr. Hugo Lujan (Universidad Católica de Córdoba-CONICET, Argentina). El cultivo de trofozoitos de *E. histolytica* HM1:IMSS se colectó por centrifugación a 500 x g a temperatura ambiente. El paquete celular se lavó dos veces con solución PBS (KH₂PO₄ 2mM; Na₂HPO₄ 10 mM; NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; pH 7,4) de forma tal de remover los

componentes residuales del medio. Las células fueron fijadas con una solución de *p*-formaldehído al 4% (v/v) y permeabilizadas por 1 h a temperatura ambiente en una solución de PBS, Triton X-100 0,05% (v/v) y BSA al 3% (p/v). Posteriormente, los parásitos fueron incubados por 1 h a 37 C con anticuerpos policlonales de conejo contra la proteína UDP-GlcPPasa de *T. brucei* en una dilución 1/100 en PBS, Triton X-100 0,01% (v/v) y BSA 1% (p/v), seguido de la incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (ICN Biomedicals), en dilución final 1/1000 por 1 h a 37°C. Las muestras fueron examinadas con un microscopio de epifluorescencia CX31 (Olympus).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CAPÍTULO 1: Caracterización de la enzima UDP-GlcPPasa de *Streptococcus mutans*

Trabajos previos describen que la presencia de la enzima UDP-GlcPPasa (EC 2.7.7.9) en *S. mutans* es fundamental para el metabolismo de los hidratos de carbono (Yamashita y col., 1998). Este nucleótido-azúcar actúa como precursor para la formación de la cadena lateral de glucosa del antígeno del serotipo *c* de la bacteria. Posiblemente también actúe como precursor para la síntesis de componentes celulares como ácido teicoico y glicofosfolípidos, cuya deficiencia puede llevar a la pérdida de la tolerancia del microorganismo a condiciones de acidez y/o de elevadas temperaturas (Giaever y col., 1988; Bohringer y col., 1995). Pese a los numerosos procesos celulares donde está involucrada y la consecuente relevancia que juega en el metabolismo de esta bacteria, se han realizado escasos trabajos bioquímicos con la enzima de esta fuente. En el trabajo arriba citado, Yamashita y col. han expresado el gen *gluA* de *S. mutans* en *E. coli*, pudiendo detectar actividad de la enzima UDP-GlcPPasa recombinante en extractos celulares. Además, lograron generar una cepa nula de *S. mutans* en el gen *gluA* por inactivación insercional, resultando en la pérdida de la antigenicidad serotipo-*c*-específico y en una disminución de los niveles de UDP-Glc intracelular. A pesar de estos resultados aún existe escasa información sobre las propiedades cinéticas y estructurales de esta enzima. En el presente trabajo se realizó el clonado molecular del gen que codifica para la UDP-GlcPPasa en *S. mutans*, realizando la expresión heteróloga del mismo para obtener la enzima con un alto grado de pureza y así caracterizarla cinética y estructuralmente.

4.1.1 Aislamiento y clonado del gen que codifica para la UDP-GlcPPasa de *S. mutans*

A partir de la secuencia publicada en base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) que codifica para la glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (GenBank: AE014133.1) en *S. mutans* UA159 se confeccionaron oligonucleótidos específicos con el objetivo de poder amplificar el gen correspondiente mediante PCR. El gen de 921 pb fue amplificado empleando como molde ADN genómico de la bacteria y clonado dentro del vector pCR[®]4Blunt-TOPO[®]. La identidad del gen se corroboró mediante secuenciación.

Para expresar la enzima recombinante, el gen de interés se subclonó dentro del vector pRSET-B entre los sitios *Bam*HI y *Eco*RI, obteniéndose la construcción [pRSET-B/*Sm*UDP-GlcPPasa], donde el gen queda fusionado a una secuencia que introduce una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína codificada. Con el objeto de obtener, además, la enzima sin etiqueta de histidinas, se realizó la construcción [pET24b/*Sm*UDP-GlcPPasa], subclonando el gen de interés en el vector pET24b entre los sitios *Nde*I y *Eco*RI. El gen *smgluA* codifica para una proteína de 306 aminoácidos, la cual se corresponde con una masa molecular teórica de 34 kDa. Esta última es similar a la informada para otras UDP-GlcPPasas bacterianas, presenta una marcada similitud en cuanto a su secuencia aminoacídica con las enzimas bacterianas y en su estructura están presentes residuos aminoacídicos relacionados a la actividad catalítica y otros a la interacción con los sustratos (Fig. 4.1.1).

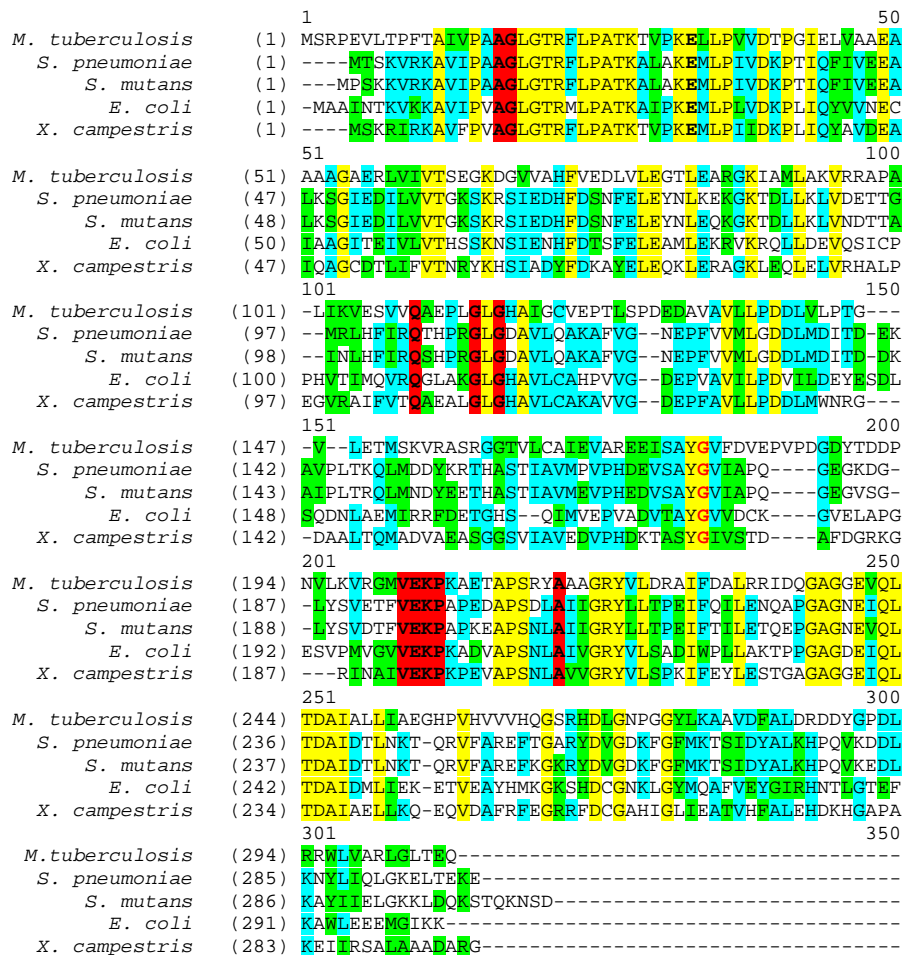


Figura 4.1.1. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de las UDP-GlcPPasas de las bacterias *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* y *Xanthomonas campestris*. El alineamiento se realizó con el programa Vector NTI 9.0. En amarillo se destacan las regiones conservadas entre las secuencias. Los residuos claves para la interacción con el ligando y la UDP-Glc se destacan en rojo.

4.1.2 Expresión y purificación de la enzima *Sm*UDP-GlcPPasa

Se transformaron células de expresión *E. coli* BL21(DE3) competentes con las construcciones [pRSET-B/*Sm*UDP-GlcPPasa] y [pET24b/*Sm*UDP-GlcPPasa]. La inducción de la expresión y purificación se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en las secciones 3.17 y 3.18 de Materiales y Métodos. Las enzimas recombinantes His-*Sm*UDP-GlcPPasa y *Sm*UDP-GlcPPasa se purificaron en forma nativa con un alto grado de pureza (90 %), eluyendo en la fracción que contenía 300 mM de imidazol (cromatografía de IMAC) y en la fracción de 0,5 M de NaCl (cromatografía de intercambio iónico), respectivamente. Cada una de las purificaciones se evaluó mediante SDS-PAGE (Figura 4.1.2). Las proteínas purificadas se almacenaron a -80°C durante al menos 6 meses con el agregado de 10% de glicerol.

Por otra parte, se realizaron ensayos de inmunodetección de la enzima recombinante según se detalla en la sección 3.26, en los cuales se emplearon anticuerpos policlonales anti-UDP-GlcPPasa de *Xantomonas campestris* producidos en conejo, que disponíamos en el laboratorio. Estos anticuerpos reconocieron a la enzima recombinante de *S. mutans*, pudiendo observar una banda de reconocimiento del tamaño esperado de 35 kDa, debido al elevado grado de similitud entre la enzima de *X. campestris* y *S. mutans*.

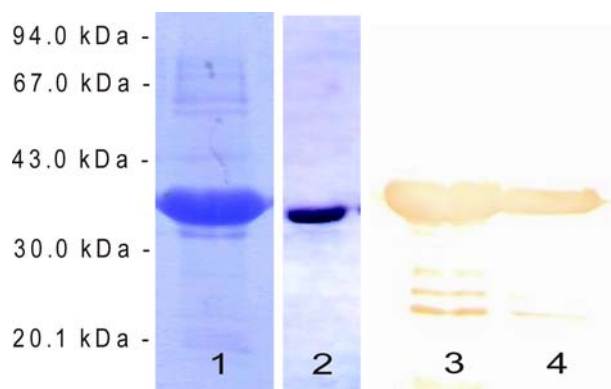


Figura 4.1.2. Análisis del SDS-PAGE al 12% de la purificación de la enzima His-*Sm*UDP-GlcPPasa (1) y *Sm*UDP-GlcPPasa sin etiqueta de histidinas (2), según lo descrito en la sección 3.22. **Ensayos de inmunodetección** de ambas enzimas según se detalla en la sección 3.26: Se observa una banda de reconocimiento por la unión del anticuerpo anti- *Xc*UDP-GlcPPasa a la altura de 35 kDa tanto para la enzima con (3) y sin (4) etiqueta de histidinas.

4.1.3 Caracterización funcional de la enzima *Sm*UDP-GlcPPasa

4.1.3.1 Evaluación de la actividad enzimática

Se determinó la actividad UDP-GlcPPasa de las dos proteínas purificadas en el sentido de síntesis de UDP-Glc utilizando el método colorimétrico (Verde de Malaquita) descrito en Materiales y Métodos. Ambas enzimas presentaron actividad como UDP-GlcPPasas; determinándose, en el sentido de síntesis del nucleótido-azúcar, un valor de actividad enzimática específica (A_e) de 10 U/mg. El mismo valor fue obtenido tanto para la enzima His-*Sm*UDP-GlcPPasa como para *Sm*UDP-GlcPPasa, lo que nos indica que la presencia de la etiqueta de histidinas no estaría afectando a la actividad de la enzima. También se evaluó la actividad enzimática en el sentido inverso de reacción (sentido de pirofosforólisis de UDP-Glc). En este caso la actividad específica resultó ser significativamente menor, pero también fue la misma para ambas formas recombinantes de la enzima.

4.1.3.2 Caracterización cinética de la enzima

Con el objeto de poder realizar una caracterización más detallada del comportamiento cinético de la enzima en estudio se procedió, en primer lugar, a determinar los parámetros cinéticos para cada uno de los sustratos de la enzima en ambos sentidos de la reacción. Se determinaron los valores de V_{max} , $S_{0,5}$ (parámetro que estima la afinidad de la enzima por el sustrato) y el número ó coeficiente de Hill (n_H , que indica el tipo de cinética de saturación que sigue la enzima para cada sustrato). En la Tabla 4.1.1 se muestran los resultados del análisis cinético de la His-*Sm*UDP-GlcPPasa, pudiendo observarse que la enzima presenta una cinética de saturación hiperbólica para la totalidad de los sustratos con afinidades similares para los mismos. Llamativamente, la afinidad de la enzima por el catión divalente, que actúa como cofactor esencial, fue un orden de magnitud mayor en el sentido de pirofosforólisis de UDP-Glc que en el sentido de síntesis (Tabla 4.1.1). Por otra parte, la V_{max} exhibida por la enzima para catalizar la reacción de síntesis de UDP-Glc fue 11 veces mayor que la alcanzada para la reacción inversa. Estos resultados muestran que la eficiencia catalítica de la enzima para convertir el UTP y la Glc-1P en UDP-Glc es un orden de magnitud mayor que para catalizar la pirofosforólisis del nucleótido-azúcar. Cabe mencionar que las mismas determinaciones se realizaron para la enzima sin etiqueta de histidinas, obteniéndose valores idénticos a los de la His-*Sm*UDP-GlcPPasa, confirmándose así que ambas enzimas tienen las mismas propiedades cinéticas. A partir

de esto, para continuar los estudios se utilizó (a menos que se indique lo contrario) la enzima que contiene la etiqueta de histidinas en el extremo N- terminal que es relativamente más fácil de obtener en forma pura.

Sustrato	$S_{0,5}$ (mM)	n_H	V_{max} (U/mg)
Glc-1P	0,31	1,1	10
UTP	0,54	1,0	
Mg²⁺ (sentido de síntesis)	0,40	1,2	
UDP-Glc	0,83	1,0	0,9
PPi	0,48	1,0	
Mg²⁺ (sentido de pirofosforólisis)	0,06	1,0	

Tabla 4.1.1. Parámetros cinéticos para los sustratos de la enzima His-*Sm*UDP-GlcPPasa.

Se realizaron ensayos de actividad en presencia de sustratos alternativos como TTP, ATP, GTP y manosa-1P (Man-1P). La enzima no exhibió actividad con ATP ni con GTP, pero si utilizó TTP y Man-1P. Estos resultados concuerdan, al menos parcialmente, con lo informado por otros autores respecto a la relativa promiscuidad de la enzima para utilizar otros sustratos alternativos, sobre todo TTP, o sea, de presentar actividad de timidililtransferasa (Mizanur y col., 2005; Silva y col., 2005; Mizanur y Pohl, 2008; Bosco y col., 2009). El valor de $S_{0,5}$ para TTP usando Glc-1P como segundo sustrato fue de 0,45 mM, indicando que la enzima presenta una afinidad similar por ambos nucleótidos, pero la V_{max} resultó 4 veces menor en comparación a la obtenida con UTP. En el caso de la Man-1P los valores de actividad específica fueron menores a los obtenidos con los sustratos convencionales de la enzima. Así, para la combinación Man-1P y UTP la V_{max} resultó 14 veces menor, y 80 veces menor para la combinación Man-1P y TTP. En la Tabla 4.1.2 se muestran las relaciones entre los azúcares-P para UTP y TTP.

	Glc-1P	Man-1P
UTP	100	7
TTP	26	1,26

Tabla 4.1.2. Actividades relativas de la enzima His-*Sm*UDP-GlcPPasa para cada combinación de los sustratos UTP y TTP en relación al azúcar fosfato utilizado. La combinación UTP/Glc-1P fue tomada como el valor de 100 %.

4.1.3.3 Determinación de la estructura cuaternaria

Las estructuras cuaternarias de las UDP-GlcPPasas de organismos procariotas estudiadas hasta el momento muestran que la forma activa de la enzima no es monomérica sino que se presenta con un estado de oligomerización al menos dimérico. Por ejemplo, la UDP-GlcPPasa de *E. coli* aparece como tetrámero al igual que la enzima de *C. glutamicum*, *P. aeruginosa* y *S. elodea* (Chang y col., 1999; Aragao y col., 2007; Thoden y Holden, 2007b; a), mientras que en el caso de las enzimas del género *Xanthomonas* se han descrito dímeros (Becker y col., 1998; Bosco y col., 2009). Incluso, se ha especulado que la estructura de tetrámero sería en realidad un dímero de dímeros (Bosco y col., 2009). Con el objetivo de determinar la estructura cuaternaria de la forma activa de la enzima de *S. mutans*, se realizó una corrida cromatográfica de la His-SmUDP-GlcPPasa a través de una columna de *Superdex 200* equilibrada con *Buffer G* según lo descrito en la sección 3.23. La His-SmUDP-GlcPPasa eluyó en un volumen tal que se corresponde con una masa molecular de 35 kDa, indicando que la enzima en su estado nativo y activo sería un monómero. Como estos resultados marcaban una diferencia importante con los datos publicados para otras UDP-GlcPPasas bacterianas, realizamos la misma determinación cromatográfica para la enzima sin etiqueta de histidinas, dada la posibilidad de que dicha etiqueta esté impidiendo la formación del oligómero. Sin embargo, la enzima sin histidinas presentó el mismo perfil cromatográfico que la His-SmUDP-GlcPPasa.

4.1.3.4 Generación de la enzima quimérica SmUDP-GlcPPasa/EcADP-GlcPPasaC-terminal y estudios de regulación

La ADP-GlcPPasa (EC 2.7.7.27) está involucrada en la síntesis de glucógeno y almidón en bacterias y plantas (Gardiol y Preiss, 1990; Iglesias y col., 1993; Sivak y Preiss, 1998; Ballicora y col., 2002; Ballicora y col., 2003; Ballicora y col., 2007). La enzima cataliza el paso regulatorio de la producción del polisacárido en estos organismos. La ADP-Glc, tanto de eucariotas como de procariotas, se encuentra regulada alostéricamente por distintos efectores, según el origen; pero en todos los casos los activadores e inhibidores son metabolitos clave de la ruta principal de utilización del carbono en el organismo respectivo (Iglesias y col., 1993; Sivak y Preiss, 1998; Ballicora y col., 2003; Ballicora y col., 2007). Además, la regulación es tal que los activadores están relacionados con un exceso de carbono y energía metabólica y viceversa para los inhibidores. Así, para las distintas ADP-GlcPPasas los metabolitos

involucrados en la regulación son la fructosa-1,6-bisfosfato (Fru-1,6bisP), 3-fosfoglicerato (3PGA), fosfoenolpiruvato (PEP), fructosa-6P (Fru-6P), glucosa-6P (Glc-6P), piruvato (Pyr), Pi y AMP, entre otros (Gardiol y Preiss, 1990; Iglesias y col., 1993; Sivak y Preiss, 1998; Ballicora y col., 2002; Ballicora y col., 2003; Ballicora y col., 2007).

En una primera etapa de nuestro trabajo, con el propósito de evaluar si la enzima UDP-GlcPPasa de *S. mutans* presentaba características de regulación alostérica, realizamos ensayos de medida de la actividad enzimática en presencia de los activadores e inhibidores comunes informados para las ADP-GlcPPasas. Los ensayos se realizaron utilizando 2 mM de PEP, 3PGA, Fru-1,6bisP, Fru-6P, Glc-6P, Pyr, AMP y Pi, adicionando un control negativo sin efector. Las actividades específicas obtenidas en presencia de los efectores fueron similares a las del control, indicando que esta enzima no se encuentra regulada alostéricamente por estos metabolitos. Estos resultados están de acuerdo con los antecedentes bibliográficos, respecto a que las UDP-GlcPPasa no son enzimas reguladas (Sowokinos, 1981; Kleczkowski y col., 2004; Bosco y col., 2009); siendo las ADP-GlcPPasas las únicas que exhiben regulación dentro de todas las nucleósido-difosfo-azúcar (NDP-azúcar) pirofosforilasas bacterianas (Ballicora y col., 2003; Ballicora y col., 2007).

Realizando un análisis a nivel estructural de diferentes NDP-azúcarPPasas, se pueden observar diferencias importantes en relación a la presencia y disposición de determinados dominios estructurales. Se ha establecido que las ADP-GlcPPasas poseen dominios comunes con otras pirofosforilasas pero, en general, las primeras son más grandes, debido a que contienen un dominio C-terminal más extendido (de unos 120-150 amino ácidos, aa) y un dominio N-terminal ligeramente más largo (alrededor de 10-40 aa) (Ballicora y col., 2003; Ballicora y col., 2007). Se ha puesto en evidencia que los extremos N- y C-terminal son responsables de las propiedades regulatorias de las ADP-GlcPPasas bacterianas (Ballicora y col., 2002; Ballicora y col., 2007) y que alteraciones en el dominio C-terminal causan modificaciones en la regulación de la enzima de plantas (Giroux y col., 1996; Salamone y col., 2002). Estudios con enzimas quiméricas, híbridas entre la ADP-GlcPPasa de *E. coli* y la de *Agrobacterium tumefaciens* refuerzan la idea de que el dominio C-terminal contribuye a determinar la afinidad por el activador Fru-1,6bisP, indicando que la regulación está determinada por un arreglo tridimensional de los dominios N- y C-terminales (Ballicora y col., 2002). También se puso en evidencia, con la caracterización de una ADP-GlcPPasa mutante

cortada en su cadena polipeptídica, que los dominios N- y C-terminal de la proteína de *E. coli* tienen una interacción fuerte, que se mantiene incluso sin que estén unidos covalentemente (Bejar y col., 2004).

A partir de los antecedentes de las propiedades de las ADP-GlcPPasas bacterianas arriba detallados y considerando los resultados obtenidos con la enzima *Sm*UDP-GlcPPasa, nos propusimos diseñar y construir un gen quimérico que codificara para una proteína híbrida entre ambos tipos de NDP-GlcPPasas. Dicho gen quimérico, *sm*UDP-GlcPPasa/*ec*ADP-GlcPPasa *c-terminal* (1338 pb), se generó mediante la técnica *Overlap Extension PCR* según lo descrito en la sección 3.11. Este gen codifica para la quimérica *Sm*UDP-GlcPPasa/*Ec*ADP-GlcPPasa C-terminal (50 kDa), constituida por UDP-GlcPPasa de *S. mutans*, a la que se le fusiona el dominio C-terminal de la enzima ADP-GlcPPasa de *E. coli* (Fig.4.1.3). Este último dominio comienza en el aminoácido prolina 295 (numerado según la enzima de *E. coli*) para estratégicamente incluir el *loop* que se encuentra precediendo al dominio C-terminal (residuo de metionina 328). El dominio C-terminal de la *Ec*ADP-GlcPPasa interactúa fuertemente con el dominio N-terminal de la misma enzima, según lo indica el estudio de la mutante cortada de la ADP-GlcPPasa enterobacteriana (Bejar y col., 2004). De esta manera, se buscó mantener la disposición espacial que facilita la movilidad relativa entre los dos dominios de una proteína regulada.

		1		50
Quimera	(1)	MPSKKVRKAVIPAAGLGTRFLPATKALAKEMLPIVDKPTIQFIVEEALKS		
SmUDP-GlcPPasa	(1)	MPSKKVRKAVIPAAGLGTRFLPATKALAKEMLPIVDKPTIQFIVEEALKS		
		51		100
Quimera	(51)	GIEDILVVVTGKSKRSIEDHFDSNFELEYNLEQKGKTDLLKLVNDTTAINL		
SmUDP-GlcPPasa	(51)	GIEDILVVVTGKSKRSIEDHFDSNFELEYNLEQKGKTDLLKLVNDTTAINL		
		101		150
Quimera	(101)	HFIRQSHPRGLGDAVLQAKAFVGNPEFVVMLGDDLMDITDDKAIPLTRQL		
SmUDP-GlcPPasa	(101)	HFIRQSHPRGLGDAVLQAKAFVGNPEFVVMLGDDLMDITDDKAIPLTRQL		
		151		200
Quimera	(151)	MNDYEETHASTIAVMEVPHEDEVSAYGVIAPQEGVSGLYSVDTFVEKPAP		
SmUDP-GlcPPasa	(151)	MNDYEETHASTIAVMEVPHEDEVSAYGVIAPQEGVSGLYSVDTFVEKPAP		
		201		250
Quimera	(201)	KEAPSNLAIIGRYLLTPEIFTILETQEPGAGNEVQLTDAIDTLNKTQRFV		
SmUDP-GlcPPasa	(201)	KEAPSNLAIIGRYLLTPEIFTILETQEPGAGNEVQLTDAIDTLNKTQRFV		
		251		300
Quimera	(251)	AREFKGKRYDVGDKFGFMKTSIDYALKHPQVKEDLKAYIIELGKKLDQKS		
SmUDP-GlcPPasa	(251)	AREFKGKRYDVGDKFGFMKTSIDYALKHPQVKEDLKAYIIELGKKLDQKS		
		301		350
Quimera	(301)	TQKNSDPELDMYDRNWPVRTYNESLPPAKFVQDRSGSHGNTLNSLVSGGC		
SmUDP-GlcPPasa	(301)	TQKNSD-----		
		351		400
Quimera	(351)	VISGSVVVQSVLFSRVRVNSFCNIDSAVLLPEVWVGRSCLRRRCVIDRAC		
SmUDP-GlcPPasa		-----		
		401		450
Quimera	(401)	VIPEGMVIGENAEEDARRFYRSEEGIVLVTREMLRKLGHKQER-----		
SmUDP-GlcPPasa		-----		

Figura 4.1.3. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la enzima *SmUDP-GlcPPasa* y la enzima quimérica. En celeste se visualizan los 150 aminoácidos correspondientes al dominio C-terminal de la enzima *EcADP-GlcPPasa*. En rojo se destacan los aminoácidos prolina 295 y metionina 328 de la ADP-GlcPPasa de *E. coli*, el primero elegido como comienzo del dominio C-terminal a partir de lo referenciado para el segundo en estudios previos (Bejar y col., 2004).

Una vez obtenido el gen quimérico se confirmó la identidad del mismo por secuenciación y posteriormente se procedió a su clonado en el vector de expresión pRSET-B entre los sitios *Bam*HI y *Xho*I. Para esto último, se utilizaron diferentes cepas de *E. coli* que se encontraban disponibles en nuestro laboratorio y se ensayaron distintas condiciones y medios de cultivo; obteniendo, en todos los casos ensayados, la enzima en forma insoluble. Finalmente, se pudo obtener la enzima en la fracción soluble empleando el sistema *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, cuyo cultivo se realizó en medio LB. La purificación de la enzima quimérica, que tiene fusionada una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal, se realizó mediante una cromatografía de afinidad de metal inmovilizado, como se indica en la sección 3.18.1. De esta forma, se alcanzó una pureza del 90%, de acuerdo a lo observado en el análisis por SDS-PAGE (Figura 4.1.4)

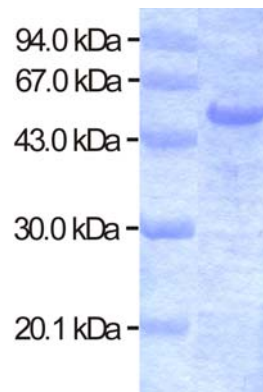


Figura 4.1.4. Análisis por SDS-PAGE al 12% de la enzima quimérica *SmUDP-GlcPPasa/EcADP-GlcPPasa C-terminal* (50 kDa) purificada por cromatografía de metal inmovilizado.

La enzima quimérica purificada exhibió actividad de UDP-GlcPPasa (*Ae* en el sentido de síntesis de UDP-Glc de 0,6 U/mg), pero no fue activa como ADP-GlcPPasa. La estructura cuaternaria, según los datos arrojados por la cromatografía de filtración por geles, revelan que la enzima quimérica es un monómero (50 kDa), al igual que lo determinado para la enzima *SmUDP-GlcPPasa* y diferente a lo que concierne a la ADP-GlcPPasa que es tetramérica (Ballicora y col., 2003).

Con la proteína quimérica purificada se realizaron ensayos de actividad de UDP-GlcPPasa en ambos sentidos de catálisis, en ausencia y en presencia de los efectores de las ADP-GlcPPasas antes mencionados (PEP, Fru-1,6bisP, Fru-6P, 3PGA, Glc-6P, Pyr, Pi y AMP). La actividad de la enzima no se vio modificada, excepto por la presencia de 3PGA en el medio de ensayo. Este compuesto incrementó 6 veces la actividad de la enzima ensayada en el sentido de síntesis de UDP-Glc y 1,7 veces la de pirofosforólisis del nucleótido-azúcar. La Figura 4.1.5 detalla la velocidad de síntesis de UDP-Glc catalizada por la enzima a concentraciones variables de 3PGA (entre 0-20 mM) en el medio de ensayo. Puede observarse que las curvas de saturación para el activador alostérico de la enzima quimérica fueron ligeramente sigmoideas y que el valor de $A_{0,5}$ para el mismo puede calcularse en 10,5 mM. Por otra parte, como se muestra en la Tabla 4.1.3, los parámetros cinéticos de la afinidad de la enzima quimérica para cada uno de los sustratos no se modificaron significativamente (en ninguno de los dos sentidos de catálisis) por la presencia del 3PGA (15mM).

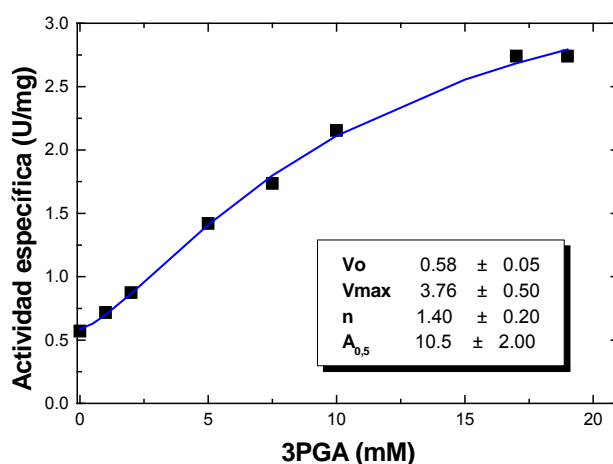


Figura 4.1.5. Curva de activación por 3PGA de la enzima quimérica *SmUDP-GlcPPasa/EcADP-GlcPPasa* C-terminal ensayada en el sentido de síntesis de UDP-Glc. En el recuadro pequeño se muestran los valores de V_0 y V_{max} (ambas en U/mg), así como el coeficiente de Hill (n) y el $A_{0,5}$ (en mM).

	Sin efector			Con 15 mM 3PGA		
	$S_{0,5}$ (mM)	n_H	V_{max} (U/mg)	$S_{0,5}$ (mM)	n_H	V_{max} (U/mg)
Glc-1P	0,04	1,0		0,15	1,3	
UTP	0,15	1,0	0,60	0,10	1,0	3,80
Mg²⁺ (sentido de síntesis)	0,32	1,7		0,80	1,3	
UDP-Glc	0,58	1,3		0,60	0,9	
PPi	0,79	1,0	0,09	1,69	0,8	0,15
Mg²⁺ (sentido de pirofosforólisis)	0,45	1,0		0,57	1,2	

Tabla 4.1.3. Parámetros cinéticos de la enzima quimérica en presencia y ausencia del activador 3PGA.

Hasta el momento, no se ha informado sobre ninguna UDP-GlcPPasa que responda a algún tipo de regulación alostérica (Bosco y col., 2009); a diferencia de lo que sí ocurre en la mayoría de las ADP-GlcPPasas que son reguladas por distintos efectores (Ballicora y col., 2003). En nuestro caso de estudio, la incorporación del dominio C-terminal de la enzima *EcADP-GlcPPasa* a la secuencia completa de *SmUDP-GlcPPasa*, generó un híbrido cuya actividad enzimática se ve incrementada en presencia de 3PGA. Este comportamiento, en donde el 3PGA actúa como activador de la enzima, es similar al encontrado para las ADP-GlcPPasas de cianobacterias y eucariotas fotosintéticos como plantas superiores y algas verdes (Ballicora y col., 2003). Los resultados obtenidos, están de acuerdo con lo propuesto por otros autores respecto a

que las NDP-azúcarPPasas posiblemente deriven, evolutivamente, de un ancestro común y que (salvo las ADP-GlcPPasas) habrían perdido parte del dominio C-terminal, por lo que no se comportan como enzimas alostéricas (Ballicora y col., 2007). Los resultados también son coincidentes con el hecho de que el dominio N-terminal es necesario pero no suficiente para tener una ADP-GlcPPasa activa y regulada, sino que también es necesaria la interacción con residuos presentes en el extremo C-terminal, siendo esto último crítico para la regulación de estas enzimas (Ballicora y col., 2002; Ballicora y col., 2003; Bejar y col., 2004; Ballicora y col., 2007).

4.2 CAPÍTULO 2: Caracterización de la enzima UDP-GlcPPasa de *Entamoeba histolytica*

Como se describió en el capítulo introductorio, la superficie celular de *E. histolytica* es determinante para su patogenia, siendo clave en el reconocimiento y muerte de células blanco del hospedero (Clark y col., 2000). Esta ameba patógena posee glicoconjugados de la superficie celular anclados a GPI, como ser la Gal/GalNAc lectina y los denominados lipofosfoglicanos (LPGs) (Saffer y Petri, 1991; McCoy y col., 1993a). Las estructuras de estos glicoconjugados involucran residuos de Man, Glc y Gal, que primariamente son interconvertidos metabólicamente como NDP-azúcares, pero la ruta biosintética de aquellos no está del todo esclarecida en este organismo. Como parte del trabajo de Tesis llevamos a cabo la caracterización de las propiedades cinéticas, regulatorias y estructurales de la UDP-GlcPPasa de *E. histolytica*, con el objeto de poder aportar más datos sobre el metabolismo de los hidratos de carbono en este organismo, que permitan una mayor comprensión de los mecanismos de síntesis de los compuestos de la superficie celular.

4.2.1 Aislamiento y clonado del gen que codifica para la enzima UDP-GlcPPasa de *Entamoeba histolytica*

Trabajos previos (Takeuchi y col., 1977; Lobelle-Rich y Reeves, 1983) informan sobre la presencia de la enzima UDP-GlcPPasa en extractos de *E. histolytica* (cepa HK9), realizando una mínima caracterización de la enzima purificada parcialmente desde la fuente natural. A partir de lo expuesto anteriormente, y con el objeto de obtener mayor información de enzimas involucradas en el metabolismo de azúcares, iniciamos el clonado molecular del gen para la obtención de la *Eh*UDP-GlcPPasa recombinante, a partir de ADN genómico de la ameba. Se diseñaron oligonucleótidos específicos en base a la secuencia del gen (CDS: 106.m00139) disponible en la base de datos del proyecto genoma de *E. histolytica* (Wellcome Trust, Sanger Institute, Pathogen Sequencing Unit, <http://www.genedb.org>) y se utilizaron para la amplificación del gen mediante PCR.

El gen amplificado (*ehugp*, 1446 pb) se clonó dentro del vector pCR[®]4Blunt-TOPO[®], corroborando posteriormente la identidad del mismo por secuenciación. El vector de clonado utilizado para la expresión de la enzima recombinante fue pRSET-B y la inserción del gen dentro del vector se realizó entre los sitios *Bam*HI y *Hind*III, quedando fusionado a una secuencia que codifica seis histidinas (fusión N-terminal). El

producto de la traducción del gen es una proteína de 54,8 kDa, cuyo punto isoeléctrico es de 6,6. La secuencia de aminoácidos de la proteína de interés presenta una elevada homología con UDP-GlcPPasas de otros organismos eucariotas, sobre todo con las de parásitos protozoarios (Fig 4.2.1), pero presenta diferencias notables (especialmente en longitud y dominios catalíticos) con las de organismos procariotas (véase sección 1.1.5).

<i>A. thaliana</i>	(1)	-----MAATATEKLPQLKSAVDGLTEMSENEKSGFINL
<i>S. tuberosum</i>	(1)	-----MATAATLSPADAELNLLKSAVALNQLSDNEKSGFINL
<i>H. sapiens</i>	(1)	SRFVQDLSKAMSQDGASQFQEVIRQELESVKKELEKILTTASSHEFEHKKDLDFGRKL
<i>L. major</i>	(1)	-----MENDMKLSAAAQACVKKMRDAKVNEACIRTF
<i>T. cruzi</i>	(1)	-----MSSVTAATSEAAACRAKMEAAAGVNEACIRTF
<i>T. brucei</i>	(1)	-----MPLONPPSAFSGAALACLEKMQASGVEEKCIHIF
<i>E.histolytica</i>	(1)	-----MELKINQMNTQETRTKTEELIQHLLQQGASEDDIKNLKSFQILH
<i>S. cerevisiae</i>	(1)	--MSTKKHTKTHSTYAFESNTNSVAASQMRNALNKLADSSKLDDAARAKFENELDSFLL
		61 120
<i>A. thaliana</i>	(34)	VSRVLSGEAQ--HLEWSKIQTPTDRIVVPYDKMANVSEDASETKYLDDKLVVLKLNGLLG
<i>S. tuberosum</i>	(40)	VGRVLSGEAQ--HLDWSKIQTPTDRIVVVYDKLAPLSEDPATKNNLDDKLVVLKLNGLLG
<i>H. sapiens</i>	(61)	FHRFLQEKGP--SVDWGKIQRPPELSTIQPYEKIK-ARGLPNNISVNLKLVVVKLNGLLG
<i>L. major</i>	(33)	IAQHVMSVSG----ETGSLPDSAIMPVDSLDALESLTIECD--NAVLSQSTVVLKLNGLLG
<i>T. cruzi</i>	(33)	LKQAFISKG----ETGNIPESLIPVESLDSLELTVPAI--PALLEHLVVLKLNGLLG
<i>T. brucei</i>	(34)	LIQHALVRKG----ETGYLPEKSLFPVESLPFLQGETKGEN-TALLRQAVVLKLNGLLG
<i>E.histolytica</i>	(45)	NAYLEQLDKKTTGLEWDKVESLPKLFSDVYSTLD-KDFTKKEIIEILLKKTCLIKINGGLG
<i>S. cerevisiae</i>	(59)	FRRYLVEKSSRTTLEWDKIKSPNPEVVKYKILIS----QQPENVNLSKLAVLKLNGLLG
		121 180
<i>A. thaliana</i>	(92)	TTMGCTGPKSVIEVRDGLTFLDLIVLQIENLNKNYNCKVPLVLMNSFNTHDDTQKIVEK-
<i>S. tuberosum</i>	(98)	TTMGCTGPKSVIEVRNGLTFLDLIVKQIEALNAKFGCSVPLLLMNSFNTHDDTLKIVEK-
<i>H. sapiens</i>	(118)	TSMGCKGPKSLIGVRNENTFLDLTVQQIEHLNKTNTDVPVPLVLMNSFNTHDDTKKILQK-
<i>L. major</i>	(87)	TGMGLCDAKTLLLEVKDGTFLDFTALQVQVLRQHCEHLRFMLMDSFNTHSASTKSFLLKAR
<i>T. cruzi</i>	(87)	TGMGLQTAKTLLPVKDGKTFIDFTVQLQELRKYSDHFRFMLMDSFATSSETKAHILK-
<i>T. brucei</i>	(89)	TGMGLNGPKSLLQVNGKQTFLDLTLQLKALYREYGVVPLVLMNSFNTHSSETKVEKVIK-
<i>E.histolytica</i>	(104)	TSMGCTGPKSVIEVRNGLTFLDLIILQLKALYREYGVVPLVLMNSFNTHSSETKVEKVIK-
<i>S. cerevisiae</i>	(115)	TSMGCVGPKSVIEVRNGTFLDLVSRQIEVLRNQQDSDVPLLLMNSFNTHDKTEHLIKK-
		181 240
<i>A. thaliana</i>	(151)	---YTKSNVDIHTFNQSKYPRVVADEFVWPWPKGKT---DKDGYPPGGHGDVFPVPSLMNSG
<i>S. tuberosum</i>	(157)	---YANSNDIHTFNQSQYPRLVTFDFAPLPCKENS---GKDGWYPPGGHGDVFPVPSLMNSG
<i>H. sapiens</i>	(177)	---YNHCRVLIYTFNQSRVPRINKESLLPVAKDVSYSGENTHAWYPPGGHDIYASFYNSG
<i>L. major</i>	(147)	YPWLYQVDFSEVELMQNQVPKILQDTLEPAAWAENP----AYEWAPPGGHDIYALYGGG
<i>T. cruzi</i>	(146)	YSWLFDTFDEVELIQNRVPKICQDILLPVTYEADA---SCEWAPPGGHDIYALYGGG
<i>T. brucei</i>	(148)	YPTLYEVFSDIELMQNRVPKIRQDNFFPVTYEADP----TCEWAPPGGHDIYALYSSG
<i>E.histolytica</i>	(163)	--YEQDNDVRIILTFLOKHFRIDAQILLPVCTELNG---RKEWYPPGGHDFLQSFVDSK
<i>S. cerevisiae</i>	(174)	---YSANRIRIRSFNQSRVPRVYKDSLLVPTEYDS---PLDAWYPPGGHDLFESLHVSG
		241 300
<i>A. thaliana</i>	(205)	KLDAFLSQGKEYVFLANSNGLGAVDLKILKHLIQNKN---EYCMVEVTPKTLADVKGGT
<i>S. tuberosum</i>	(211)	KLDALLAKGKEYVAVANSNGLGAVDLKILNHLILNKN---EYCMVEVTPKTLADVKGGT
<i>H. sapiens</i>	(234)	LLDTFTGEGKEYIFVSNIDNLGATVDLYILNHLNPPNGKRCFVMEVTKTRADVKGGT
<i>L. major</i>	(203)	KLQELVEQGYRYMFSNGDNLGATIDKRVLAYMEKEKI---DFLMEVCRRTESDKKGGH
<i>T. cruzi</i>	(202)	KLDDLLRSQKYMFSVNGDNLGATLDARLLAYMKLNQL---EFLMEVCRRTESDKKGGH
<i>T. brucei</i>	(204)	KLDYLLCKGYRYMFSNGLDNLGATLDVRLLDYMHEKQL---GFLMEVCRRTESDKKGGH
<i>E.histolytica</i>	(218)	AFQTLKEEGKEYLFLSNSDNLGAIPTDITIMHHSKNHL---DFALVETPKTLNDVKGGT
<i>S. cerevisiae</i>	(228)	ELDALAQGREILFVSNGLDNLGATVDLILNHLIETGA---EYIMELTDKTRADVKGGT
		301 360
<i>A. thaliana</i>	(261)	LISYEG-----KVQLLEIAQVPDEHVNEFKSIEKFKIFNTNNLWVNLKAIK
<i>S. tuberosum</i>	(267)	LISYEG-----KVQLLEIAQVPDEHVNEFKSIEKFKIFNTNNLWVNLKAIK
<i>H. sapiens</i>	(294)	LTQYEG-----KLRLVEIAQVPKAHVDEFKSVSKFKIFNTNNLWISLAAVK
<i>L. major</i>	(259)	LARQTVYVKGKDGQPDAAEKRVLLLRSAQCCKADMEVDFQDINKVYFFNTNNLWIRLPVLL
<i>T. cruzi</i>	(258)	LAYQTFCFDDDTAP----ERRFILRESAQCCKEDEASFQDVERHFFNTNNLWVLDLAAK
<i>T. brucei</i>	(260)	LAYQVIDETTGQT----RRFVLRSAQCCKEDEVDFQDVERHFFNTNNLWVLDLAAK
<i>E.histolytica</i>	(274)	LIRYGN-----KLKMLEIAQVPSEHVAEFKDKIKKFKVFNNTNNLWVNSAIQ
<i>S. cerevisiae</i>	(284)	LISYDG-----QVRLLEVAQVPEKHIDEFKNIRKFTNFNTNNLWINLKAIVK
		361 420
<i>A. thaliana</i>	(307)	KLVEADA--LKMEIIPNPKVEVDG----VKVLQLETAAGAAIRFFDRAIVNVPRSRFLP
<i>S. tuberosum</i>	(313)	RLVEADA--LKMEIIPNPKVEVDG----VKVLQLETAAGAAIRFFDRAIVNVPRSRFLP
<i>H. sapiens</i>	(340)	RLQEQNA--LDMEIIVNAKFLDGG----LVNLQLETAAGAAIKSFNSLGINVPRSRFLP
<i>L. major</i>	(319)	ETMQEHGGTLPVIRNEKIVDSSNSASPKVYQLETAAGAAIAMFASASAVVPRSRFAP
<i>T. cruzi</i>	(314)	KTMDSHSGALPLPVIRNAKTVNPVDGTSTKVYQLETAAGAAIGLFRSAAVVPRERFAP
<i>T. brucei</i>	(316)	KMMDEQLGVLRPLVIRNPKIVNPQDSQSTKVYQLEVAMGAAISLFRSEAVVPRERFAP
<i>E.histolytica</i>	(320)	HVVEKRTLLNMDIIVNRKKGQGR----DVIQLEIAVCAVSAFEHTTAYIVPRSRFLP
<i>S. cerevisiae</i>	(330)	RLIESN--LEMEIIPNQKTLTRDG-HEVNLQLETAACGAIRHFDGAGHVVVPRSRFLP



Figura 4.2.1. Alineamiento de secuencias de la UDP-GlcPPasa de organismos eucariotas: *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*, *Homo sapiens*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Entamoeba histolytica* y *Sacharomyces cerevisiae*. Se observa una elevada identidad de secuencia. En amarillo se marcan los aminoácidos conservados en todas las UDP-GlcPPasas, en azul se marcan los residuos aminoacídicos caracterizados como de unión a sustrato, en rojo los residuos de unión a nucleótido y en rosado se remarcan los aminoácidos histidina y lisina que interactúan con las cargas negativas del fosfato de la UDP-Glc.

4.2.2 Expresión y purificación de la enzima *Eh*UDP-GlcPPasa

Para expresar la *Eh*UDP-GlcPPasa recombinante se utilizaron células de *E. coli* BL21 (DE3) competentes, las cuales fueron transformadas con la construcción [pRSET-B/*Eh*UDP-GlcPPasa]. El agregado de la etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína de interés permitió realizar la purificación de la misma empleando una cromatografía de metal inmovilizado (IMAC) utilizando una resina del tipo IDA-Ni²⁺ (según sección 3.18.1). La proteína fue obtenida en forma soluble en el extracto crudo y la fracción eluida de la columna de IMAC con 300 mM de imidazol correspondió a la que contenía a la proteína His-*Eh*UDP-GlcPPasa con mayor grado de pureza. En la figura correspondiente al SDS-PAGE (Fig. 4.2.2) podemos observar la banda perteneciente a la proteína purificada (54,6 kDa más el agregado de 3kDa correspondiente a la etiqueta de histidinas). Por otra parte, la estructura cuaternaria de la enzima pura se determinó mediante el método de exclusión por tamaño o cromatografía de filtración por geles. La enzima recombinante generó un único pico de elución con un volumen de retención correspondiente a un monómero, hecho que es coincidente a lo informado para la enzima del parásito protozoario *L. major* (Lamerz y col., 2006).

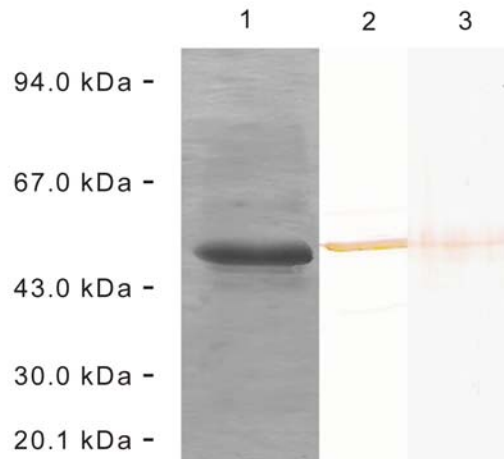


Figura 4.2.2. Purificación de la enzima *Eh*UDP-GlcPPasa. La calle 1 corresponde al SDS-PAGE al 10% de la enzima purificada por IMAC. La calle 2 y 3 corresponden a la inmunodetección (luego de la electroforesis y transferencia de las proteínas sobre membranas de nitrocelulosa) de la enzima recombinante purificada y de la enzima en un extracto crudo de *E. histolytica* respectivamente. En los ensayos de inmunodetección la enzima fue reconocida por los anticuerpos anti *Tb*UDP-GlcPPasa generados en conejo.

La Figura 4.2.2 también muestra que la *Eh*UDP-GlcPPasa recombinante purificada fue reconocida en experimentos de inmunotransferencia por anticuerpos policlonales específicos desarrollados en conejo contra la UDP-GlcPPasa de *T. brucei* (proteína que tiene un 30% de identidad con la enzima de *E. histolytica*). Estos anticuerpos también fueron utilizados para evidenciar la presencia de la enzima en células del parásito, ya que los mismos reconocieron, en extractos de *E. histolytica* resueltos por SDS-PAGE, una banda proteica de movilidad coincidente con la *Eh*UDP-GlcPPasa recombinante (Fig. 4.2.2). Además pudo realizarse la inmunolocalización intracelular de la enzima utilizando microscopía de epifluorescencia (Fig. 4.2.3). Se detectaron señales de reconocimiento en forma de partículas, lo que sugeriría que la proteína se localizaría en cuerpos vesiculares intracitoplasmáticos de la ameba. Esto indicaría, en principio, una posible ubicación a nivel de los microsomas del parásito. Nuestros resultados concuerdan con lo publicado anteriormente respecto a que la UDP-GlcPPasa se encuentra particulada (Takeuchi y col., 1977), y con lo propuesto por Salgado y colaboradores, basándose en el modelo de las rutas metabólicas descritas en *S. cerevisiae* (Salgado y col., 2005).

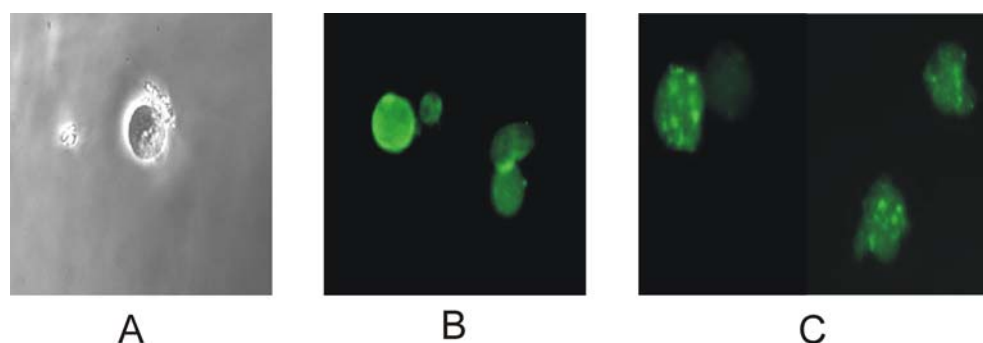


Figura 4.2.3. Microscopía de epifluorescencia de células de *E. histolytica*. (A) microscopía directa; (B) control positivo empleando anticuerpos primarios totales; (C) utilizando anticuerpos policlonales de conejo anti-*Tb*UDP-GlcPPasa. (B-C) tinción fluorescente utilizando anticuerpos primarios y secundario conjugado a FITC.

4.2.3 Caracterización funcional de la enzima *Eh*UDP-GlcPPasa

4.2.3.1 Evaluación de la actividad enzimática y determinación de los parámetros cinéticos

La *Eh*UDP-GlcPPasa recombinante purificada resultó activa, exhibiendo una *Ae* para la catálisis en el sentido de síntesis de UDP-Glc que fue alrededor de 30 veces mayor que en el sentido inverso de pirofosforólisis, con valores similares a los informados para la enzima de tubérculo de papa (Gupta y col., 2008). La caracterización cinética de la enzima permitió determinar los parámetros detallados en la Tabla 4.2.1. La enzima utiliza Mg^{2+} como cofactor esencial y presenta curvas de saturación hiperbólica para los sustratos Glc-1P y PPI, mientras que para UTP y UDP-Glc el patrón de la cinética de reacción mostró cooperatividad. Este tipo de comportamiento concuerda con lo publicado para pirofosforilasas de otros organismos (Iglesias y col., 1993) y los valores de V_{max} y $S_{0,5}$ calculados se encuentran en el mismo orden que los obtenidos por Gupta y col. (2008) para la UDP-GlcPPasa de plantas.

Sustrato	$S_{0,5}$ (mM)	n_H	V_{max} (U/mg)
Glc-1P	0,25	1,0	95
UTP	0,81	1,9	
Mg²⁺ (síntesis de UDP-Glc)	0,06	1,9	
UDP-Glc	0,44	1,6	3,0
PPI	0,94	1,2	
Mg²⁺ (pirofosforólisis)	0,06	1,0	

Tabla 4.2.1 Parámetros cinéticos para los sustratos de la enzima *Eh*UDP-GlcPPasa.

Por otra parte, se pudo determinar que la actividad de la enzima no es afectada por distintos metabolitos caracterizados como efectores alostéricos de ADP-GlcPPasas de diversas fuentes biológicas, tales como PEP, Fru-6P, Pyr, Glc-6P, 3PGA, Fru-1,6bisP, AMP y Pi (Sowokinos, 1981; Ballicora y col., 2003). Estos resultados son coincidentes con lo informado respecto a que las UDP-GlcPPasa no son enzimas reguladas (Sowokinos, 1981; Kleczkowski, 1994; Kleczkowski y col., 2004; Bosco y col., 2009). Por otra parte, la enzima no utilizó ATP, GTP, TTP ni Man-1P como sustratos alternativos, a diferencia de lo que ocurre con las enzimas bacterianas, como se ha descrito anteriormente en esta tesis para la enzima de *S. mutans*.

4.2.3.2 Regulación redox sobre la actividad de la enzima *Eh*UDP-GlcPPasa

La estructura primaria de la *Eh*UDP-GlcPPasa contiene cinco residuos de cisteína y once de metionina. Éstos son dos residuos aminoácidos susceptibles a la acción de agentes oxidantes, por lo que se decidió analizar si la actividad de la enzima recombinante purificada era afectada durante la incubación con tres de éstos compuestos: diamida, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y nitroprusiato de sodio (NPS), los cuales son capaces de modificar el estado redox de motivos que contienen azufre (-S). Cabe destacar que el NPS genera especies reactivas de nitrógeno (como óxido nítrico) capaces de producir S-nitrosilación de proteínas (Aleryani y col., 1999). En la Figura 4.2.4 podemos observar que la incubación de *Eh*UDP-GlcPPasa con cada uno de los tres agentes oxidantes afecta su actividad enzimática, presentando una inhibición irreversible en función del tiempo. Un estudio más detallado indicó que, variando los niveles del inhibidor, la pérdida de actividad enzimática sigue una cinética de pseudo-primer orden, con grados de reactividad establecidos a partir de constantes de inactivación (K_1) determinadas por el recíproco del producto entre el tiempo (para lograr el 50% de inactivación) y la concentración del agente oxidante. De esta manera, la diamida (K_1 de $0,095 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) exhibe el mayor grado de reactividad, seguida por H_2O_2 (K_1 de $0,070 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) y finalmente por NPS (K_1 de $0,022 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$). Sin embargo, los tres compuestos son oxidantes efectivos actuando en el mismo orden de concentración, con niveles de H_2O_2 y NPS capaces de inactivar la enzima en un rango de 1- 5 mM, en un período de 10 min. Esto último es compatible con los valores encontrados en diferentes células para especies oxidantes y S-nitrosilantes (Hess y col., 2005; Rhee, 2006).

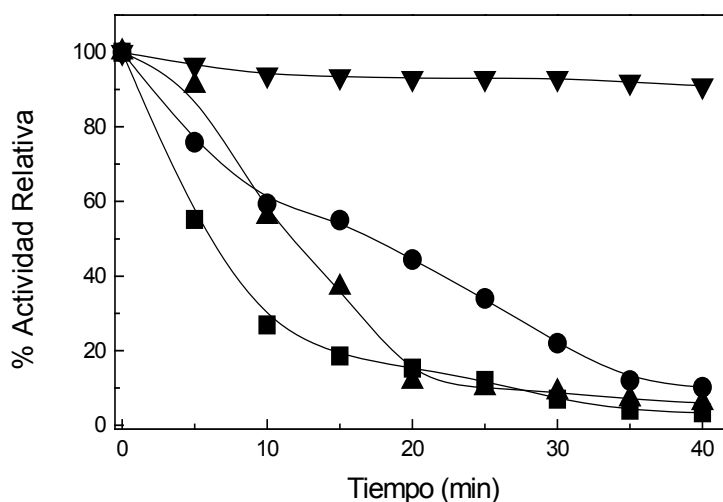


Figura 4.2.4. Inactivación de la enzima *EhUDP-GlcPPasa* en presencia de oxidantes. La enzima se incubó con 0,5 mM diamida (●), 1 mM peróxido de hidrógeno (▲), 5 mM de NPS (■) o en ausencia de oxidante (▼) (control) a pH 8,0 y 25 °C. En cada uno de los tiempos establecidos se tomaron alícuotas a las que se les determinó la actividad UDP-GlcPPasa en sentido de síntesis de UDP-Glc.

Conjuntamente, se realizaron ensayos para evaluar si los sustratos Glc-1P y UTP eran capaces de evitar la pérdida de actividad de la UDP-GlcPPasa cuando se incubaba a 25 °C con el oxidante diamida (Fig. 4.2.5). Cuando el tratamiento con diamida se realizó en presencia de Glc-1P 1 mM, la pérdida de actividad de la enzima fue similar a la observada en ausencia de sustratos. Por el contrario, cuando la oxidación se realizó en presencia de UTP 1 mM, la enzima presentó un comportamiento similar al de la enzima sin oxidar, indicando que el UTP se une a la proteína y esa unión hace que la misma no sea susceptible a la oxidación (efecto protector). Se sabe que este tipo de enzimas presentan un mecanismo de reacción secuencial en el cual primeramente se une el UTP y esta unión provoca un cambio de conformación que permite la entrada del azúcar-P al sitio activo (Geisler y col., 2004; Lamerz y col., 2006). Esto podría estar explicando de algún modo que el UTP actúe como protector en la pérdida de actividad de la enzima tras la oxidación.

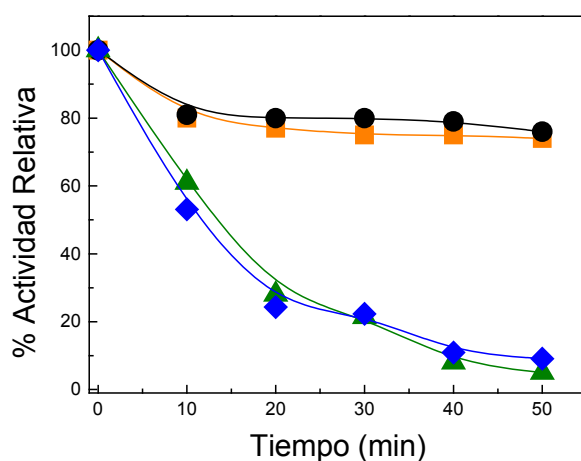


Figura 4.2.5. Ensayo de protección de la enzima *EhUDP-GlcPPasa* por los sustratos a la oxidación con diamida. La enzima se incubó a 25 °C y se tomaron alícuotas a intervalos regulares para ensayar la actividad remanente en el sentido directo de reacción. Control sin oxidante (●), enzima con diamida (▲), enzima con diamida y Glc-1P 1 mM (◆) enzima con diamida y UTP 1 mM (■).

Por otra parte, el efecto inhibitorio de los agentes oxidantes sobre la actividad de la *EhUDP-GlcPPasa* pudo ser revertido por incubación de la enzima oxidada con diferentes agentes reductores (Fig. 4.2.6). En la Figura 4.2.6 podemos observar que tanto agentes químicos como el DTT, como también efectores biológicos como *TcTXN* y *TbTRX*, fueron efectivos para revertir la actividad enzimática. Estos últimos tienen una relevancia fisiológica potencial, como agentes redox, ya que se encuentran dentro de las células en concentraciones comparables que son capaces de forzar la recuperación de la actividad enzimática.

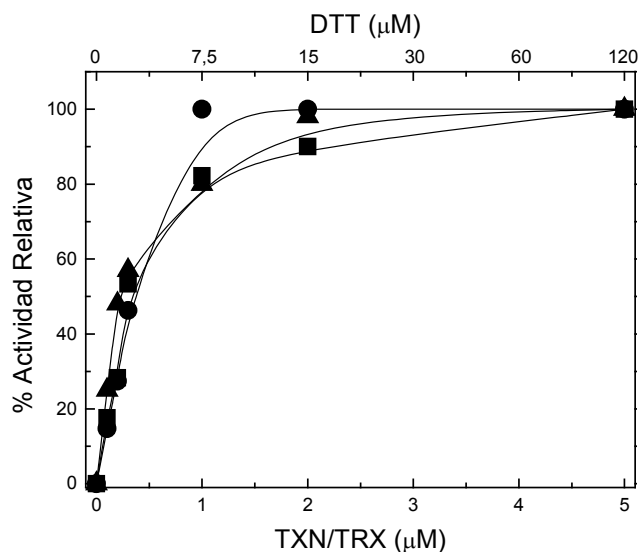


Figura 4.2.6. Efecto de diferentes agentes reductores sobre la *EhUDPGlcPPasa* oxidada. La UDP-GlcPPasa oxidada e inactiva se incubó a pH 8,0 y 25 °C con DTT (●), *TbTRX*_{red} (■), o *TcTXN*_{red} (▲) en las concentraciones específicas. Luego de 30 min a cada una de las muestras se les determinó la actividad UDP-GlcPPasa empleando el método colorimétrico (Fusari y col., 2006).

La Figura 4.2.7 refuerza este punto, debido a que agentes encontrados específicamente en *E. histolytica*, como L-Cisteína [principal tiol de bajo peso molecular encontrado en el parásito (McLaughlin y Aley, 1985)], *EhTRX8* y *EhTRX41* también fueron efectivos en revertir a la *EhUDPGlcPPasa* de un estado inactivo a un estado completamente activo. Un análisis de las formas reducida y oxidada de la enzima revela que la primera migra más rápidamente en el SDS-PAGE (Fig. 4.2.8). Como podemos observar en la Figura 4.2.8, los cambios en la motilidad aparente entre las dos formas redox de la enzima fueron alcanzados luego del tratamiento con diferentes agentes redox, causantes de la oxidación o reducción de la proteína. La diferencia en el tamaño aparente encontrado entre la enzima oxidada y la reducida es de aproximadamente 7 kDa y no es compatible con un entrecruzamiento intersubunidades, pero si sugiere la formación de puentes disulfuros intramoleculares luego de la oxidación. Se ha informado que el entrecruzamiento covalente entre residuos de cisteínas dentro de un polipéptido facilita la formación de una estructura más compacta (Loferer y col., 1995; Kang y col., 1999) y esto podría modificar la cantidad de SDS que se une por masa de proteína, afectando así la movilidad electroforética. Estos resultados sugieren fuertemente una regulación de la *EhUDPGlcPPasa*, donde la formación o ruptura de disulfuros podría ser un mecanismo relevante. Sería importante identificar residuos en la

enzima involucrados en dicha modificación redox, y el modelado por homología es una herramienta perfecta para poder establecer las distancias relativas entre cisteínas en la estructura 3D de la proteína.

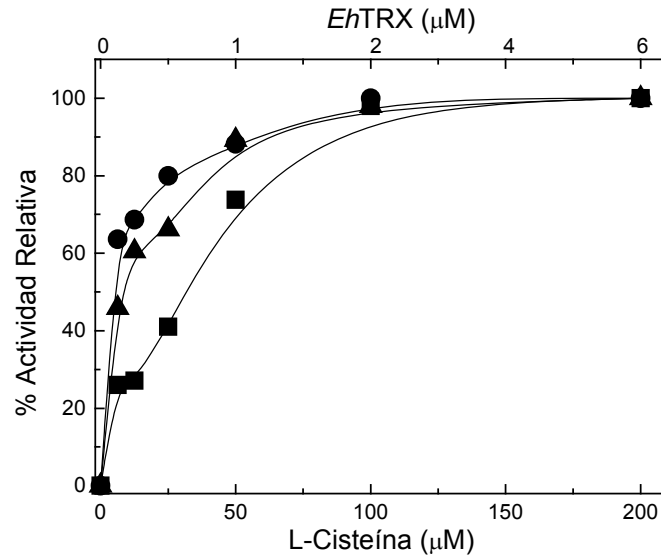


Figura 4.2.7. Efecto de la L-Cisteína y EhTRX sobre la EhUDP-GlcPPasa oxidada. La UDP-GlcPPasa oxidada e inactiva se incubó a pH 8,0 y 25°C con L-Cysteína (■), EhTRX41(●), o EhTRX8 (▲) en concentraciones específicas. Luego de 30 min a cada una de las muestras se les determinó la actividad UDP-GlcPPasa empleando el método colorimétrico.

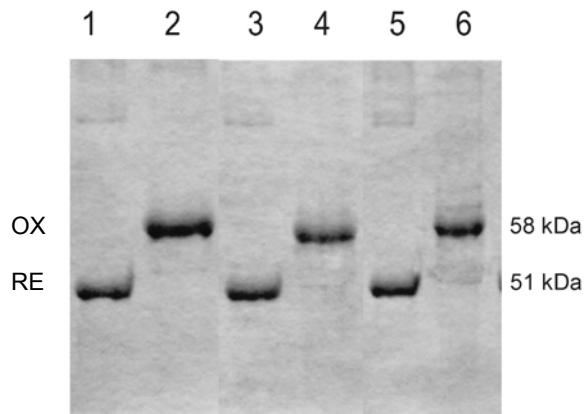


Figura 4.2.8. Análisis de los diferentes estados redox de la EhUDP-GlcPPasa por SDS-PAGE no reductor al 10%. Previo a realizar la electroforesis distintas alícuotas de la enzima recombinante purificada fueron tratadas con 0,5 mM de diamida (línea 1), 5 mM nitroprusiato de sodio (línea 3), o 1 mM peróxido de hidrógeno (línea 5) durante 30 min. La enzima oxidada por cada uno de los tres agentes oxidantes fue posteriormente reducida por el agregado de DTT 5 mM durante 30 min (líneas 2, 4, y 6) y finalmente fueron analizadas mediante SDS-PAGE.

4.2.4 Modelado por homología de la *Eh*UDP-GlcPPasa

Con el objeto de poder localizar los posibles residuos de aminoácidos involucrados en este fenómeno redox, se desarrolló un modelo por homología de la *Eh*UDP-GlcPPasa, utilizando los templados que se detallan en la Tabla 4.2.2, los cuales derivan de las estructuras de rayos X ya conocidas de enzimas homólogas de organismos eucariotas (Roeben y col., 2006; McCoy y col., 2007; Steiner y col., 2007). La mayoría de los templados seleccionados presentan un número significativo de residuos idénticos (44%). La UDP-GlcPPasa de *Leishmania major* (2oeg) tiene un menor porcentaje de residuos idénticos (33%) pero éste fue incorporado para ampliar la diversidad de posibilidades de plegamiento dentro de nuestro modelo. El *global score* asignado por verify3D fue de 181 mostrando que el mejor modelo cae dentro del rango esperado (para 481 residuos, *score* mínimo: 102, *score* máximo: 220).

Código PDB	Expect.	Longitud	Identidad	Positivos	Gaps	Resol. (Å)
1z90 (cadena A)	5.0E-098	460	192/433 (44%)	284/433 (65%)	9/433 (2%)	1.86
2i5k (cadena A)	7.0E-098	465	194/445 (43%)	280/445 (62%)	11/445 (2%)	3.10
2icy (cadena A)	1.0E-096	456	191/420 (45%)	277/420 (65%)	9/420 (2%)	1.64
2icx (cadena B)	5.0E-094	455	188/419 (44%)	274/419 (65%)	11/419 (2%)	1.85
2oeg (cadena A)	9.0E-057	482	133/403 (33%)	214/403 (53%)	32/403 (7%)	2.30

Tabla 4.2.2. Templados utilizados para construir la estructura de la *Eh*UDP-GlcPPasa: 1z90: UDP-GlcPPasa codificada por el gen At3g03250 de *Arabidopsis thaliana*, forma APO (McCoy y col., 2007); 2i5k: UDP-GlcPPasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Roeben y col., 2006); 2icy: UDP-GlcPPasa de *Arabidopsis thaliana* con la UDP-Glc unida (McCoy y col., 2007); 2icx: UDP-GlcPPasa de *Arabidopsis thaliana* con el UTP unido (McCoy y col., 2007); 2oeg: UDP-GlcPPasa de *Leishmania major* (Steiner y col., 2007).

En la Figura 4.2.9 se muestra el alineamiento utilizado para generar nuestro modelo. Con el objeto de comparar los elementos de las estructuras secundarias entre los datos experimentales y aquellos obtenidos a partir del modelo, se incluyó la estructura secundaria de la forma APO de la enzima de *Arabidopsis thaliana* (1z90, ver Tabla 4.2.2).

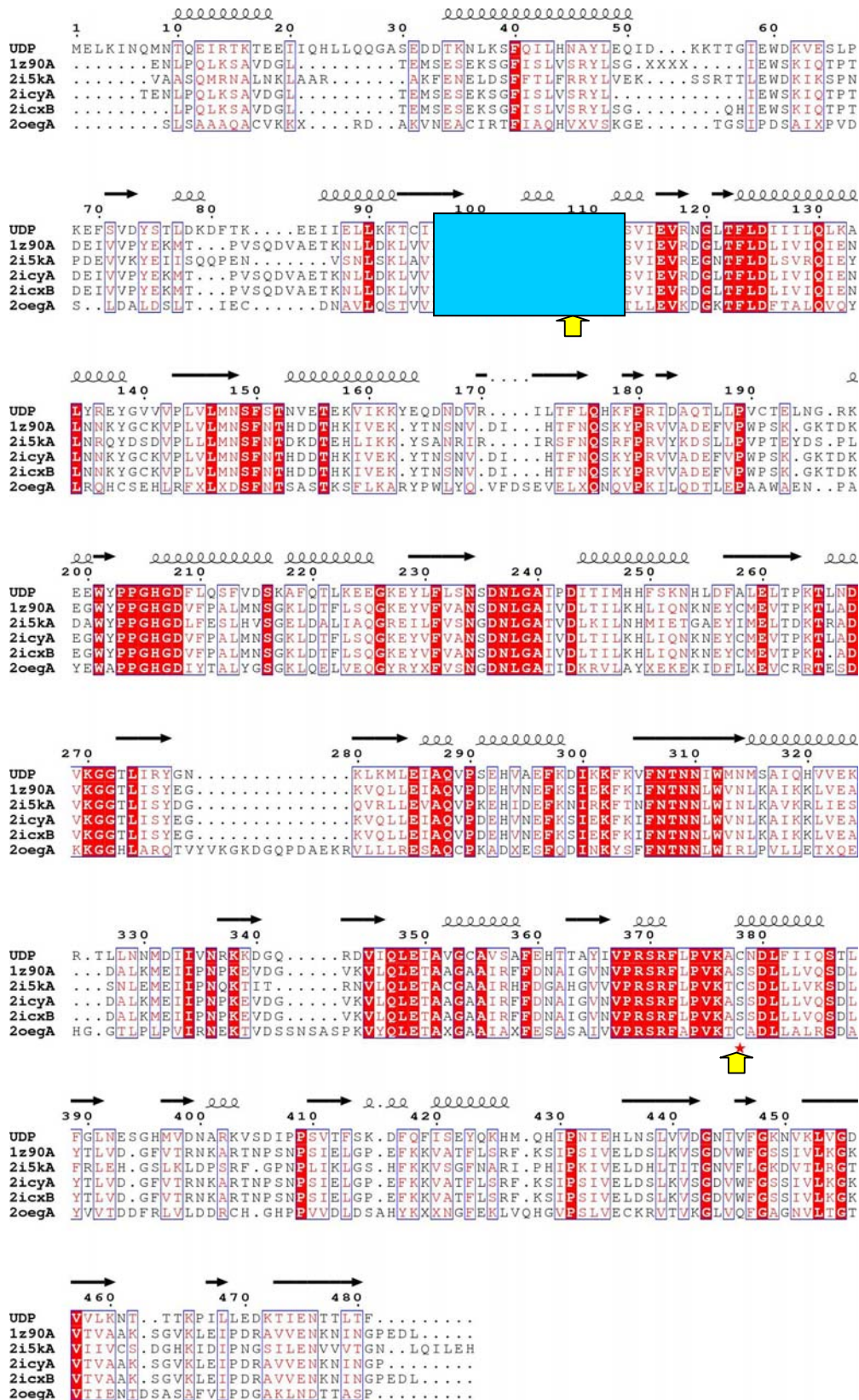


Figura 4.2.9. Alineamiento de estructuras secundarias de la *Eh*UDP-GlcPPasa (designada como UDP) y los plantados utilizados para generar el modelo. Las laminas β y las α hélices son indicadas con flechas y cintas bucles respectivamente. En celeste se resaltan los residuos involucrados en la unión al UTP y en amarillo (flechas) se destacan los residuos de cisteína (108 y 378) como posibles candidatos de la formación de un puente disulfuro.

La Figura 4.2.10A muestra el mejor modelo molecular obtenido para la *Eh*UDP-GlcPPasa. Las laminas β y hélices α están representadas con flechas verdes y resortes anaranjados respectivamente, mientras los *loops* aparecen coloreados en blanco. Además, podemos observar que la molécula presenta un dominio presente generalmente en las nucleotidiltransferasas, denominado pliegue de Rossmann, que consiste en una lamina β central rodeada de hélices α . En la Figura 4.2.10B se observa en color azul los residuos aminoacídicos correspondientes al sitio de unión al nucleótido, el cual es un dominio altamente conservado entre las UDP-GlcPPasas eucariotas. Los residuos C94, C108, C191, C354, C378 y M106 se muestran utilizando la convención CPK (oxígeno: rojo, carbomo: gris, nitrógeno: azul y azufre: amarillo). En anaranjado se destaca la molécula de UTP (Fig. 4.2.10C). La M106 se encuentra localizada en la secuencia conservada K-L-N-G-G-L-G-T-X-M-G-(X)₄-K, previamente identificada como el sitio de unión a nucleótido para las UDP-GlcPPasa (McCoy y col., 2007; Steiner y col., 2007). La C108 es también parte de la secuencia conservada y se encuentra conservada en los dominios alineados en la Fig 4.2.9. En lo que se refiere a la C378, ésta se encuentra menos conservada, siendo reemplazada por serina en tres de las seis secuencias alineadas (Fig 4.2.9).

Si todos los residuos de cisteína (C94, C108, C191, C354 y C378) encontrados en la *Eh*UDP-GlcPPasa se analizan de a pares, las distancias relativas respectivas son de aproximadamente 27-33 Å, excepto para el par C108 y C378, cuya distancia es de 7,33 Å. Si bien la distancia típica de un puente disulfuro es de 2,03 Å (Laskowski y col., 1993), es posible que esta sección de la molécula pueda cerrarse o acercarse en la estructura 3D como consecuencia del movimiento natural global de la misma (Gerstein y col., 1994). Esto último está de acuerdo con los datos mostrados en la Figura 4.2.8, donde se observa una movilidad electroforética menor para la enzima oxidada, lo que puede estar asociado a una estructura más compacta con menor accesibilidad del SDS. De esta manera a partir de la Figura 4.2.10, podemos proponer que C108 y C378, las cuales rodean a la M106, podrían estar involucradas en la formación de un puente disulfuro, lo que provocaría los cambios mencionados anteriormente en la actividad y en la movilidad en el SDS-PAGE, experimentados por la enzima de la ameba luego del tratamiento con diferentes agentes redox.

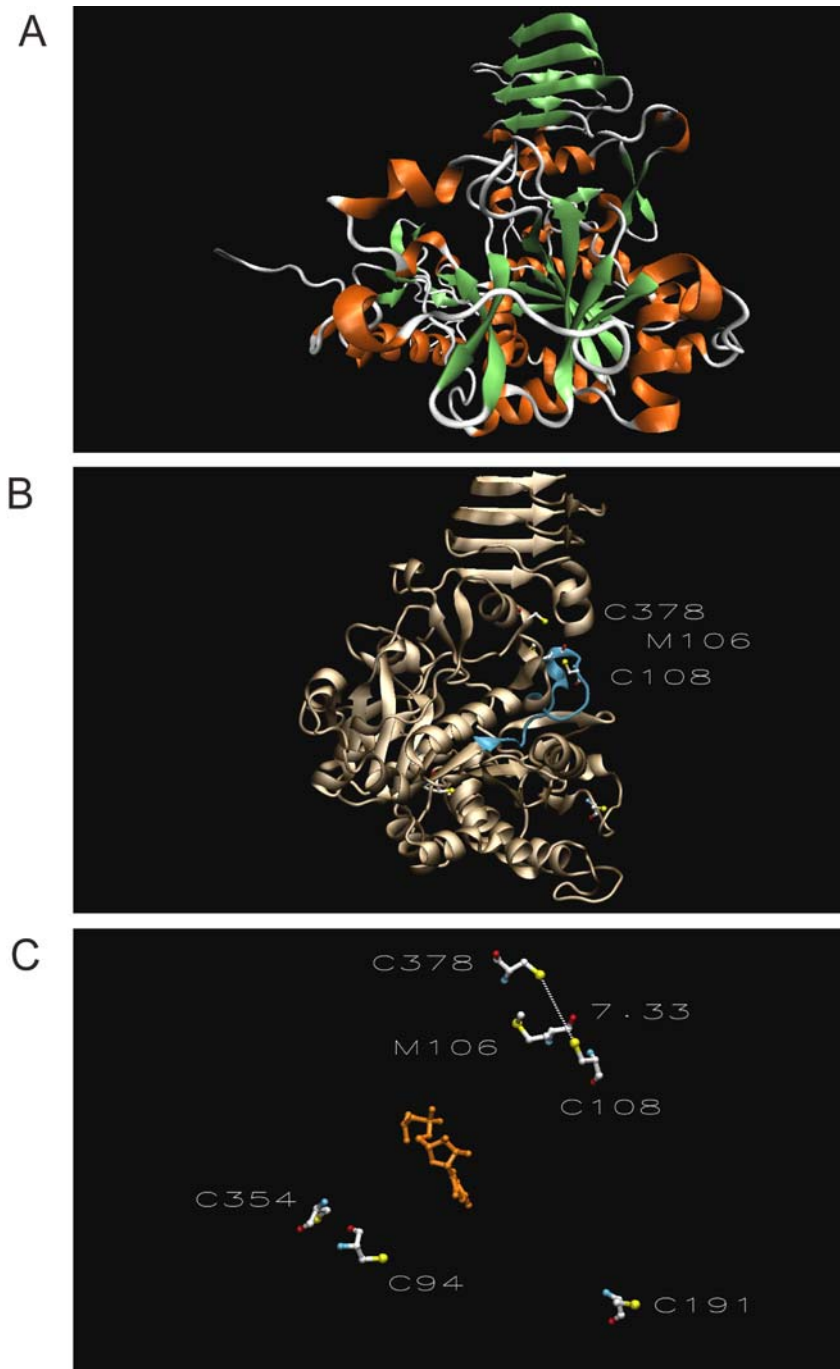


Figura 4.2.10. Modelo de la UDP-GlcPPasa de *Entamoeba histolytica*. (A) Se muestra la enzima coloreada según la estructura secundaria diferenciándose las láminas β (verde), α hélices (anaranjado) y *loops* (blanco). (B) Vista del modelo (ocre) con un giro de 180° donde se observan los 5 residuos de cisteína y la M106 (coloreados por tipo de átomo), destacándose en azul los residuos que forman parte del sitio de unión al nucleótido. (C) Vista amplificada de B en la cual sólo se destacan las cisteínas, la metionina del sitio activo y el UTP (anaranjado). Podemos observar la formación de un puente disulfuro entre los residuos C108 y C378 (distancia 7.33 Å), quedando la M106 entre medio del puente.

4.2.5 Caracterización de las enzimas mutantes en cisteínas y metionina

Para continuar explorando sobre el mecanismo molecular responsable de la regulación redox de la *Eh*UDP-GlcPPasa y para probar la validez de la predicción arrojada por el modelado molecular (Fig.4.2.10) se construyeron diferentes enzimas mutantes en los residuos de cisteína y metionina. En base a la información obtenida a partir del modelo 3D, se construyeron las enzimas mutantes C108S, C378S y C108/378S, como así también la M106S y M106C. Para realizar un estudio más exhaustivo, también se mutaron las tres cisteínas adicionales encontradas en la enzima entamoébrica, construyéndose las mutantes C94S, C191S y C354S. Todas las mutantes se sobreexpresaron en *E. coli* BL21 (DE3) y fueron convenientemente purificadas con una homogeneidad del 95%, mediante procedimientos experimentales idénticos a los descripto para la enzima salvaje.

Las mutantes C108S y C378S resultaron completamente activas, mientras que la actividad específica de la doble mutante C108/378S fue dos veces menor que la correspondiente a la enzima salvaje. La mutante M106S resultó inactiva, mientras que la M106C exhibió una V_{max} de sólo 4 U/mg, o sea el 5% de la actividad de la enzima salvaje. Estos resultados sostienen el modelo molecular representado en la Figura 4.2.10, incluyendo el rol esencial del -S del residuo de metionina localizado en el sitio de unión a nucleótido de la enzima (Steiner y col., 2007), como así también la organización arquitectónica 3D para el donimio funcional. Por otra parte, las enzimas mutantes C94S, C191S y C354S exhibieron niveles de actividad comparables a la proteína salvaje.

Cabe destacar que las mutantes simples C108S y C378S y la doble mutante C108/378S mostraron una respuesta alterada a los oxidantes sulfhidrilos, en general comportándose como más estables a la oxidación. Como se muestra en la Figura 4.2.11 los tratamientos con diamida o NPS causan una pérdida del 90% de la actividad en la enzima salvaje, pero inhibieron a las enzimas mutantes C108S, C378S o C108/378S en sólo un 55%, 45% o 20%, respectivamente. Un resultado similar se observó para la oxidación con peróxido de hidrógeno, donde la mutante C108S y la C108/378S fueron prácticamente insensibles al oxidante (Fig 4.2.10). Éstos resultados apoyan fuertemente el correcto modelado molecular obtenido en la Figura 4.2.10 y sus predicciones en lo que concierne a los residuos aminoacídicos involucrados en la regulación redox, y cómo la ausencia de al menos una cisteína anula la posibilidad de generar el puente disulfuro. Sin embargo, la mutante C378S no muestra diferencias en cuanto a la oxidación con

peróxido de hidrógeno respecto a la enzima salvaje (Fig 4.2.11). Una posible explicación para este comportamiento inesperado se podría atribuir al hecho de que el peróxido de hidrógeno es capaz de sobreoxidar residuos de cisteína y aún metioninas (Rhee, 2006). Así, en la mutante C378S el oxidante podría estar modificando a la C108 y/o M106 de una manera diferente que en la enzima salvaje. Un respaldo adicional, para la especificidad de los residuos de cisteína involucrados en la regulación redox, se obtuvo a partir de los resultados mostrados en donde las enzimas mutantes C94S, C191S y C354S se comportan como la enzima salvaje cuando son expuestas a cualquiera de los tres tratamientos oxidativos (Fig 4.2.11). Cabe destacar que todas las enzimas mutantes oxidadas revirtieron la inactivación por incubación con los agentes reductores.

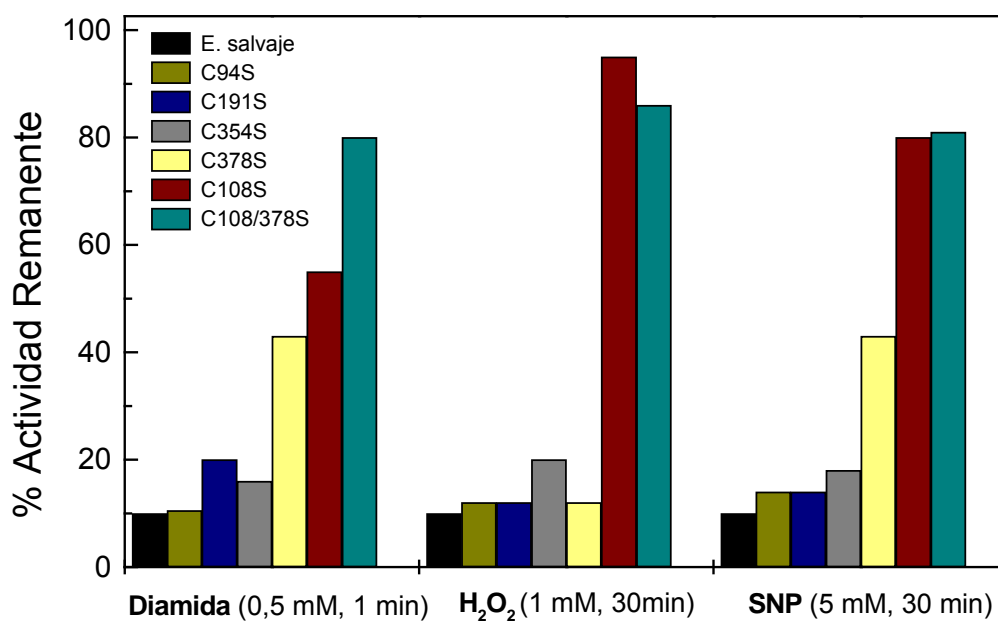


Figura 4.2.11. Respuesta a la oxidación de la enzima *Eh*UDP-GlcPPasa salvaje y las mutantes en cisteínas. La enzima recombinante UDP-GlcPPasa salvaje y las diferentes mutantes fueron incubadas a pH 8,0 y 25 °C con los agentes oxidantes específicos. Transcurrida la oxidación a las muestras se les determinó la actividad enzimática en el sentido de síntesis de UDP-Glc.

A diferencia de lo informado para las ADP-GlcPPasas (Fu y col., 1998; Ballicora y col., 2003; 2004), hasta el momento no se habían encontrado propiedades y mecanismos regulatorios para alguna UDP-GlcPPasa. Cabe remarcar que la enzima recombinante *Eh*UDP-GlcPPasa fue inactivada por incubación con agentes oxidantes, incluyendo

diamida, peróxido de hidrógeno y NPS. Esta inactivación pudo ser completamente revertida por reductores químicos (DTT) y biológicos (L-cisteína, TXN y TRX). De esta manera, los estudios hasta aquí realizados suponen fuertemente que en *E. histolytica* la enzima que cataliza la síntesis de UDP-Glc, un primer paso en el metabolismo de oligo y polisacáridos, puede ser un blanco para la regulación redox. Estos resultados son novedosos, no sólo con respecto a las propiedades de esta enzima, sino también concernientes con la ocurrencia de este tipo de regulación en protozoos.

La modulación redox de la actividad *Eh*UDP-GlcPPasa parece ser mediada por un mecanismo que involucra agentes oxidantes y reductores encontrados normalmente *in vivo*. El peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico han sido identificados como metabolitos redox claves en diferentes señales intracelulares bajo condiciones fisiológicas y de *stress* (Hess y col., 2005; Rhee y col., 2005; Rhee, 2006; Foster y col., 2009). Los mecanismos de acción para ambos agentes redox incluyen oxidación y S-nitrosilación de proteínas (Hess y col., 2005; Foster y col., 2009). De este modo, en *E. histolytica* estos oxidantes podrían estar involucrados en modificaciones específicas de proteínas, siendo la UDP-GlcPPasa uno de estos blancos, donde la enzima pierde actividad tras la modificación. En el estudio molecular realizado en este trabajo, el peróxido de hidrógeno y el NPS provocan la formación de un puente disulfuro entre la C108 y la C378, dos residuos aminoacídicos que están localizados cerca uno de otro en la estructura 3D y conforman un sitio de unión a nucleótido crítico junto con la M106 (Lamerz y col., 2006; Steiner y col., 2007). La formación del puente disulfuro intramolecular podría bloquear parcialmente el acceso del sustrato al sitio activo y de esta manera, reducir la actividad enzimática. La unión covalente entre ambas cisteínas pareciera producir un cambio conformacional a una molécula más compacta, generando un cambio en la migración en el SDS-PAGE, como se reportó para otras proteínas (Loferer y col., 1995; Kang y col., 1999).

La relevancia fisiológica de la modificación redox de la *Eh*UDP-GlcPPasa no está limitada a la inactivación oxidativa, pero es de remarcar que, metabolitos de bajo peso molecular y proteínas redox pueden reducir a la enzima oxidada con una recuperación total de la actividad. Entre las moléculas que resultaron efectivas en revertir el puente disulfuro entre dos cisteínas encontramos a las TXN y TRX encontradas en tripanosomátidos (Guerrero y col., 2000; Reckenfelderbaumer y col., 2000; Piattoni y col., 2006), como así también TRXs de *E. histolytica* y L- Cisteína, un compuesto que ha sido identificado como un metabolito clave en el parásito (McLaughlin y Aley,

1985). Estos resultados dan relevancia adicional a la funcionalidad del sistema TRX, recientemente identificado como un componente principal de la maquinaria redox en protozoos (Andrews, 1964; Aleryani y col., 1999). En este sentido, las TRXs en *E. histolytica* podrían estar involucradas, no sólo en procesar especies reactivas de oxígeno, sino principalmente participando en mecanismos de regulación de la actividad de enzimas a través de modificaciones post-traduccionales. Esta última función asignada a las TRXs ha sido demostrada en otros organismos, incluyendo animales y plantas superiores (Buchanan y Balmer, 2005; Meyer y col., 2009).

Los resultados del presente trabajo refuerzan la idea de que el metabolismo de hidratos de carbono que utiliza UDP-Glc podría estar estrictamente controlado, con una dependencia de las condiciones redox del ambiente intracelular del parásito. Esto podría ser relevante para la síntesis de diferentes sacáridos que juegan un rol crítico para la sobrevivencia del microorganismo y su patogénesis (Bhattacharya y col., 1992; Stanley y col., 1992; Clark y col., 2000). Podemos especular que tales mecanismos redox podrían estar también involucrados en la regulación de otras rutas metabólicas en *E. histolytica* y otros protozoos.

4.3 CAPÍTULO 3: Caracterización de la enzima UDP-GlcPPasa de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*

El parásito protozoario *T. cruzi* presenta una densa y continua cubierta, el glicocáliz, compuesto de una capa de superficie formada por compuestos glicoconjugados, entre los que encontramos a los GIPL, LPPG y una familia de mucinas que se proyectan por encima de la capa de GIPL. Estos compuestos juegan un rol fundamental en la supervivencia e infectividad del parásito (Previato y col., 1990; Previato y col., 1995; Mendonca-Previato y col., 2005). La enzima UDP-GlcPPasa es una enzima clave en la biosíntesis de precursores de estos compuestos ya que participa en la síntesis de UDP-Glc, el cual es sustrato obligado para la síntesis de los residuos de Gal, Xyl y Rha presentes en los glicoconjugados de la superficie celular. Trabajos previos han determinado que la enzima UDP-Glc 4-epimerasa, involucrada en la epimerización de UDP-Glc para generar UDP-Gal, es una macromolécula esencial ya que su ausencia genera cambios en la arquitectura molecular de la superficie y en la morfología celular del parásito (Roper y Ferguson, 2003; MacRae y col., 2006).

4.3.1 Aislamiento y clonado de los genes que codifican para la enzima UDP-GlcPPasa de *T. cruzi*

De la base de datos del proyecto genoma de *T. cruzi* (Wellcome Trust, Sanger Institute, Pathogen Sequencing Unit, <http://www.genedb.org>) fue posible identificar dos secuencias, Tc1047053503521.50 y Tc1047053506359.60, que codifican para dos posibles UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasas, *TcUDP-GlcPPasa1* y *TcUDP-GlcPPasa2*. Según la base de datos consultada las enzimas se encuentran codificadas por dos genes alelos de 1449 pb, con diferente localización en el cromosoma. Las secuencias nucleotídicas presentan una elevada identidad, presentando sólo 25 nucleótidos diferentes, lo que finalmente se traduce en una diferencia en 10 aminoácidos (Fig. 4.3.1).

		1		60
<i>T. cruzi</i> 1	(1)	MSSVTAAI	ISEAASACRAKME	EAAGVNEACIRTF
<i>T. cruzi</i> 2	(1)	MSSVTAGI	ISEAASACRAKMQ	EAAGVNEACIRTF
		61		120
<i>T. cruzi</i> 1	(61)	LEDLITV	PADPSLLEHLV	VVLKLNGLGLT
<i>T. cruzi</i> 2	(61)	LEDLITV	PADPSLLEHLV	VVLKLNGLGLT
		121		180
<i>T. cruzi</i> 1	(121)	YSDHLRF	MFLMDSFATS	SSETKAHIK
<i>T. cruzi</i> 2	(121)	YSDHLRF	MFLMDSFATS	SSETKAHIK
		181		240
<i>T. cruzi</i> 1	(181)	ASCEWAP	PGHGDLYTAL	YGSGKLDDLLR
<i>T. cruzi</i> 2	(181)	ASCEWAP	PGHGDLYTAL	YGSGKLDDLLR
		241		300
<i>T. cruzi</i> 1	(241)	FLMEVCR	RTESDKKGGH	IAYQTACFDD
<i>T. cruzi</i> 2	(241)	FLMEVCR	RTESDKKGGH	IAYQTACFDD
		301		360
<i>T. cruzi</i> 1	(301)	NTNNLWV	DLAALKKTMD	SHSGALPLP
<i>T. cruzi</i> 2	(301)	NTNNLWV	DLAALKKTMD	SHSGALPLP
		361		420
<i>T. cruzi</i> 1	(361)	SAAVVVP	PRERFAPVK	TCSDLLALRS
<i>T. cruzi</i> 2	(361)	SAAVVVP	PRERFAPVK	TCSDLLALRS
		421		480
<i>T. cruzi</i> 1	(421)	GLDALVK	DGVPSLRQCT	KLI IQGPVE
<i>T. cruzi</i> 2	(421)	GLDALVK	DGVPSLRQCT	KLI IQGPVE
		481		
<i>T. cruzi</i> 1	(481)	EV		
<i>T. cruzi</i> 2	(481)	EV		

Figura 4.3.1. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de las dos enzimas UDP-GlcPPasas de *T. cruzi*. En azul se demarcan los diez aminoácidos diferentes. Podemos observar que ningunos de estos cambios involucran a metioninas ni cisteínas.

Para poder amplificar los genes correspondientes mediante PCR se emplearon los juegos de oligonucleótidos detallados en la sección 3.9. En ambos casos se utilizó como molde ADN genómico del parásito. Los genes amplificados se clonaron dentro del vector pCR[®]4Blunt-TOPO[®], corroborando la identidad de los mismos por secuenciación. Posteriormente, cada uno de los genes de interés se subclonaron dentro del vector pRSET-B entre los sitios *Bam*HI-*Eco*RI y *Bam*HI-*Hind*III, quedando cada gen fusionado a una secuencia de nucleótidos que introduce una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína codificada. Según la base de datos utilizada, ambos genes codifican para una proteína de 485 aminoácidos, la cual presenta una masa molecular teórica de 53,6 kDa, siendo los puntos isoeléctricos para *Tc*UDP-GlcPPasa1 y *Tc*UDP-GlcPPasa2 de 5,8 y 6,2 respectivamente.

4.3.2 Expresión y purificación de las enzimas UDP-GlcPPasas de *T.cruzi*

Para poder expresar las proteínas recombinantes, se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) competentes con las construcciones [pRSET-B/*Tc*UDP-GlcPPasa1] y [pRSET-B/*Tc*UDP-GlcPPasa2] en ensayos independientes. Como ya se ha descrito anteriormente el agregado de la etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal de las proteínas de interés permitió su purificación mediante una cromatografía de metal inmovilizado (IMAC) empleando una resina del tipo IDA-Ni²⁺ (según sección 3.18.1). Del proceso de purificación se pudieron obtener ambas enzimas en forma soluble y activas en las fracciones eluidas de la columna cromatográfica con 300 mM de imidazol, las cuales se almacenaron a -80 °C, con el agregado de glicerol, para ser utilizadas en los ensayos posteriores. Las masas moleculares de las proteínas de *T. cruzi* son similares a las de otros eucariotas protozoarios, como en el caso de la enzima de *L. major*, *T. brucei* y *E. histolytica*, y en general presentan una marcada similitud en la secuencia de aminoácidos con el resto de las UDP-GlcPPasas de organismos eucariotas (ver Figura 4.2.1).

La Figura 4.3.2 muestra el SDS-PAGE realizado, donde podemos observar las bandas correspondientes a las enzimas recombinantes obtenidas con un alto grado de pureza. En la misma figura se muestran los experimentos de inmunotransferencia en los cuales fue posible detectar la presencia de la enzima en extractos de epimastigotes de *T. cruzi*, resueltos por SDS-PAGE, tanto en la cepa CL Brener como en la cepa Tulahuen O.

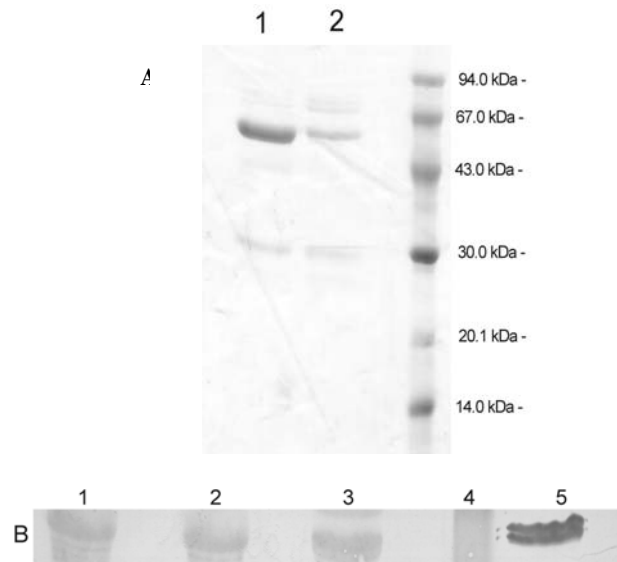


Figura 4.3.2. A-Purificación de las enzimas UDP-GlcPPasas de *T. cruzi*. La calle 1 corresponde al SDS-PAGE al 10%, en el cuál se sembró la proteína *TcUDP-GlcPPasa1* y la calle 2 a la proteína *TcUDP-GlcPPasa2*, ambas purificadas mediante cromatografía de metal inmovilizado. B- Inmunodetección de la enzima en extractos crudos de de *T. cruzi* TulO (1), *T. cruzi* CL Brener(2), *T. brucei* (3) y enzima recombinante purificada (5). La calle 4 corresponde al marcador de masa molecular. En la inmunodetección se utilizaron anticuerpos anti *TbUDP-GlcPPasa* generados en conejo.

Por otra parte, se determinó la estructura cuaternaria de las proteínas de *T. cruzi* mediante cromatografía de filtración por geles, donde se pudo corroborar que ambas enzimas (*TcUDP-GlcPPasa1* y *TcUDP-GlcPPasa2*) presentan una única subunidad proteica activa (monómero). Estos resultados son concordantes con los informados para la enzima de *L. major* (Lamerz y col., 2006) y los obtenidos en esta Tesis para las enzimas de *E. histolytica*.

4.3.3 Caracterización funcional de las enzimas *TcUDP-GlcPPasa1* y *TcUDP-GlcPPasa2*

4.3.3.1 Evaluación de la actividad enzimática y determinación de parámetros cinéticos

Con las enzimas recombinantes purificadas *TcUDP-GlcPPasa1* y *TcUDP-GlcPPasa2* se realizaron ensayos para determinar actividad UDP-GlcPPasa en ambos sentidos de reacción. En sentido de síntesis de UDP-Glc, la enzima *TcUDP-GlcPPasa1* presentó una V_{max} mayor que la enzima *TcUDP-GlcPPasa2* (40 y 28 U/mg respectivamente), mientras que en sentido de pirofosforólisis los valores de V_{max} fueron de 1 U/mg para *TcUDP-GlcPPasa1* y de 0,6 U/mg para *TcUDP-GlcPPasa2*, pudiendo observarse una

vez más una mayor eficiencia por parte de este tipo de enzimas para catalizar la reacción en sentido de síntesis de UDP-Glc. También fue posible determinar los parámetros cinéticos de las enzimas para cada sustrato (Tabla 4.3.1), observándose que la enzima utiliza como cofactor esencial al Mg^{2+} y presenta cinéticas de saturación hiperbólicas para la mayoría de los sustratos.

	<i>TcU1</i>			<i>TcU2</i>		
	$S_{0,5}$ (mM)	n_H	V_{max} (U/mg)	$S_{0,5}$ (mM)	n_H	V_{max} (U/mg)
Glc-1P	0,21	1,3	40	0,20	1,0	28
UTP	0,13	1,3		0,28	1,0	
Mg²⁺ (síntesis de UDP-Glc)	0,66	1,3		0,04	1,7	
UDP-Glc	0,72	1,1	1,0	1,12	1,1	0,6
PPi	0,62	1,1		0,73	1,2	
Mg²⁺ (pirofosforólisis)	0,06	2,1		0,05	1,3	

Tabla 4.3.1 Parámetros cinéticos para los sustratos de las enzimas *TcUDP-GlcPPasa1* (*TcU1*) y *TcUDP-GlcPPasa2* (*TcU2*).

Analizando la actividad de ambas isoenzimas en presencia de efectores alostéricos comunes de las ADP-GlcPPasas (PEP, Fru-6P, Pyr, Glc-6P, 3PGA, Fru-1,6bisP, AMP y Pi) no se observaron modificaciones significativas en las actividades enzimáticas. La enzima no utilizó ATP, GTP, TTP ni Man-1P como sustratos alternativos. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en el caso de las enzimas de organismos procariotas y eucariotas, que fueron objeto de estudio en este trabajo de Tesis, demostrando así que en estos organismos la enzima no se encuentra regulada alostéricamente.

4.3.3.2 Regulación redox sobre la actividad de las enzimas *TcUDP-GlcPPasa1* y *TcUDP-GlcPPasa2*

Con el antecedente de un fenómeno redox de regulación de la actividad de la enzima de *E. histolytica*, que fue caracterizada en este trabajo de Tesis, y conociendo la elevada homología que presentan entre si las UDP-GlcPPasas de parásitos protozoarios (ver Figura 4.2.1), realizamos sobre *TcUDP-GlcPPasa1* y *TcUDP-GlcPPasa2* un análisis del efecto de agentes oxidantes y reductores. Estudiamos las estructuras primarias de estas enzimas e identificamos diez residuos de cisteína (6 conservados entre las UDP-GlcPPasas de protozoos) y quince de metionina (el residuo metionina presente en

el sitio de unión al nucleótido es altamente conservado dentro de las UDP-GlcPPasas). Cisteínas y metioninas son residuos susceptibles de experimentar variaciones en sus estados redox, por lo que era posible un comportamiento de las enzimas de *T. cruzi* similar al observado para la *Eh*UDP-GlcPPasa.

Evaluamos el efecto de diferentes agentes oxidantes (diamida, H₂O₂, y NPS) sobre la actividad UDP-GlcPPasa en *T. cruzi* de la misma manera que en la sección 4.2.3.2. En la Figura 4.3.3A-B podemos observar que la incubación de *Tc*UDP-GlcPPasa1 y *Tc*UDP-GlcPPasa2 con cada uno de los tres agentes oxidantes, altera sus actividades enzimáticas, generando una inhibición irreversible en función del tiempo. La pérdida de actividad enzimática en estos casos también sigue una cinética de pseudo-primer orden, con grados de reactividad establecidos a partir de las constantes de inactivación K_I determinadas de la misma forma que para la enzima UDP-GlcPPasa de *E. histolytica*.

Los tres compuestos resultaron oxidantes sumamente efectivos, actuando en concentraciones menores a 10 mM. En la Tabla 4.3.2 podemos observar claramente que la diamida exhibe una mayor reactividad sobre las dos isoenzimas (el peróxido de hidrógeno y el NPS son menos reactivos). También surge de los datos experimentales una mayor susceptibilidad de *Tc*UDP-GlcPPasa2 frente a diamida y peróxido de hidrógeno, como lo demuestran las diferencias significativas en los valores de K_I entre esta enzima y *Tc*UDP-GlcPPasa1. Si bien existe una elevada identidad entre estas dos enzimas (sus estructuras primarias difieren sólo en 10 aminoácidos) resulta interesante remarcar puntualmente algunas de estas diferencias, pues podrían implicar cambios a nivel de la estructura, que de alguna manera, justificarían diferencias en la susceptibilidad frente a oxidantes. Así, si consideramos el cambio E20Q (*Tc*UDP-GlcPPasa1/*Tc*UDP-GlcPPasa2), podríamos considerar una ganancia de carga negativa para la isoenzima 1 respecto de *Tc*UDP-GlcPPasa2. Igualmente, encontramos un cambio L236S y A322T (*Tc*UDP-GlcPPasa1/*Tc*UDP-GlcPPasa2) que podría significar un aumento en la hidrofobicidad de *Tc*UDP-GlcPPasa1. Más importante aún, encontramos en *Tc*UDP-GlcPPasa1 los residuos P99 y P284 que podrían actuar como disruptores de α -hélices y afectar la estructura terciaria de la enzima. Estas consideraciones se sustentan en el hecho de que en este tipo de enzimas las modificaciones a nivel estructural pueden modificar su sensibilidad frente a compuestos como diamida o peróxido de hidrógeno. En este sentido, se realizaron con las dos isoenzimas de *T. cruzi* ensayos de protección por sustratos (Glc-1P y UTP) frente a diamida (Figura 4.3.4). Para ambas enzimas se observó un efecto protector por parte del

UTP, mostrando el mismo comportamiento que la enzima *E. histolytica*, donde la unión del UTP interferiría la accesibilidad del reactivo o provocaría un cambio conformacional que protegería a la enzima del efecto inhibitor del oxidante.

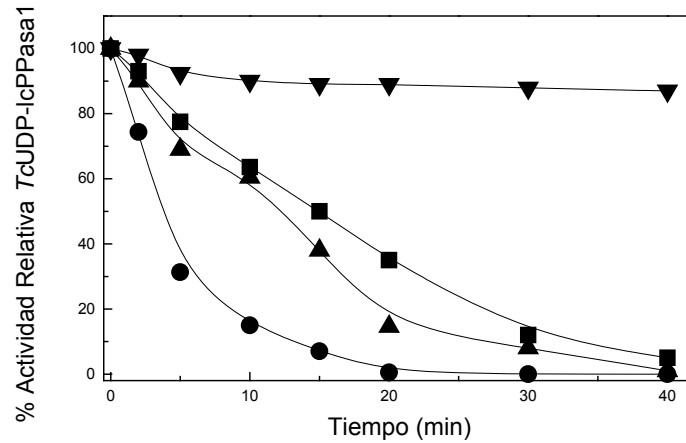


Figura 4.3.3A. Inactivación de la enzima *TcUDP-GlcPPasa1* en presencia de oxidantes. La enzima se incubó con 3 mM diamida (●), 10 mM peróxido de hidrógeno (▲), 10 mM de NPS (■) o en ausencia de oxidante (▼) (control) a pH 8,0 y 25 °C. En cada uno de los tiempos establecidos se tomaron alícuotas a las que se les determinó la actividad UDP-GlcPPasa en sentido de síntesis de UDP-Glc.

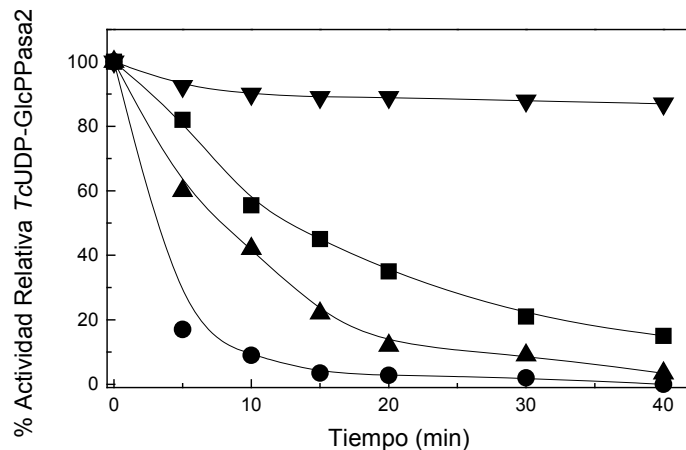


Figura 4.3.3B. Inactivación de la enzima *TcUDP-GlcPPasa2* en presencia de oxidantes. La enzima se incubó con 1 mM diamida (●), 2 mM peróxido de hidrógeno (▲), 10 mM de NPS (■) o en ausencia de oxidante (▼) (control) a pH 8,0 y 25 °C. En cada uno de los tiempos establecidos se tomaron alícuotas a las que se les determinó la actividad UDP-GlcPPasa en sentido de síntesis de UDP-Glc.

	<i>Tc</i> UDP-GlcPPasa1	<i>Tc</i> UDP-GlcPPasa2
Oxidante	K_I ($\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	K_I ($\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
Diamida	0,035	0,840
Peróxido de hidrógeno	0,007	0,047
NPS	0,005	0,005

Tabla 4.3.2 Constante de inactivación de los agentes oxidantes diamida, peróxido de hidrógeno y NPS correspondiente a las enzimas *Tc*UDP-GlcPPasa1 y *Tc*UDP-GlcPPasa2.

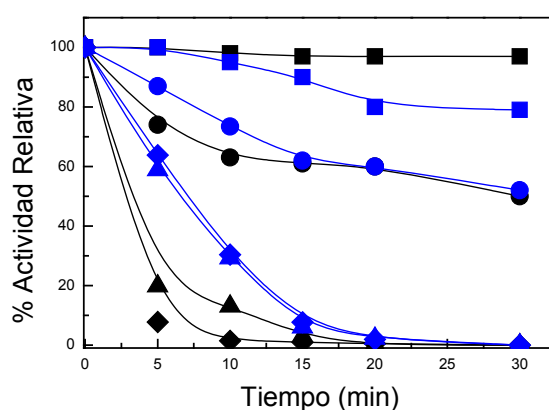


Figura 4.3.4. Ensayo de protección de las enzimas *Tc*UDP-GlcPPasa1 (azul) y *Tc*UDP-GlcPPasa2 (negro) por los sustratos a la oxidación con diamida. Las enzimas se incubaron a 25 °C y se tomaron alícuotas a intervalos regulares para ensayar la actividad remanente en el sentido de síntesis de UDP-Glc. Control sin oxidante (■), enzima con diamida (◆), enzima con diamida y Glc-1P 1 mM (▲) y enzima con diamida y UTP 1 mM (●).

Se analizó también si la pérdida de actividad luego de la oxidación de la enzima podía revertirse por acción de diferentes agentes reductores. El efecto inhibitorio de los oxidantes sobre la actividad de la *Tc*UDP-GlcPPasa1 y la *Tc*UDP-GlcPPasa2 pudo ser revertido mediante incubación con agentes reductores, tanto químicos como biológicos. Así, luego de la oxidación con diamida la enzima fue tratada con reductores como *Tb*TRX_{red}, *Tc*TXN_{red} y DTT. En los ensayos realizados pudimos apreciar (Fig.4.3.5) una recuperación total de la actividad de las enzimas en presencia de 200 μM de *Tb*TRX (ambas isoenzimas revirtieron totalmente la pérdida de la actividad en presencia de concentraciones de DTT relativamente bajas (5-10 mM)). Fue notable el hecho

mostrado en la Fig. 4.3.5 respecto a que la TRX fue mucho más efectiva que la TXN para revertir la inactivación de la enzima oxidada. Este resultado sugiere que habría funciones diferenciales para las proteínas del metabolismo redox (TRX y TXN) encontradas en tripanosomátidos, un hecho que al presente no había sido observado ni propuesto como hipótesis en la literatura respectiva. Es de destacar que, en todos los casos y a diferencia de lo observado para la oxidación, la reversión por reductores fue similar para ambas *Tc*UDP-GlcPPasas.

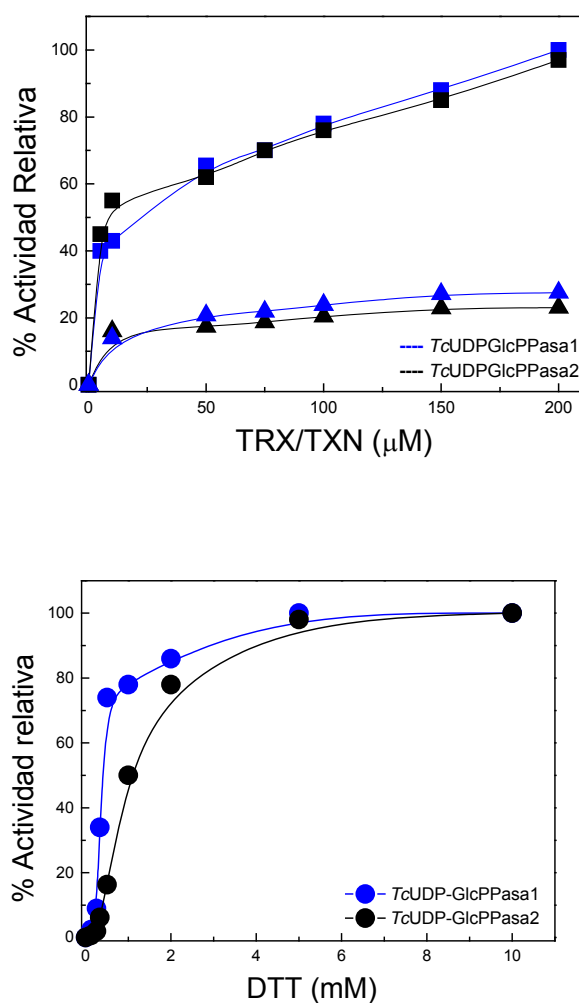


Figura 4.3.5. Efecto de diferentes agentes reductores sobre las enzimas de *T. cruzi* oxidadas. Ambas UDPGlcPPasas oxidadas e inactivas se incubaron a pH 8,0 y 25°C con *Tb*TRX_{red} (■), *Tc*TXN_{red} (▲) y DTT (●), según lo descrito en la sección 3.25. El color azul se corresponde con la enzima *Tc*UDP-GlcPPasa1 y el negro con *Tc*UDP-GlcPPasa2. Luego de 30 min se determinó la actividad UDP-GlcPPasa a cada una de las muestras empleando el método colorimétrico.

Además, fue posible detectar un patrón de migración diferencial en el SDS-PAGE no reductor (resultados no expuestos) para las dos isoenzimas de *T. cruzi*, en donde la enzima oxidada tiene una migración en la electroforesis en gel de poliacrilamida más acelerada que la forma reducida. Los cambios en la motilidad aparente entre las dos formas redox fueron observados después de tratar las enzimas con cada uno de los tres agentes redox, lo que estaría indicando que éstas UDP-GlcPPasas también podrían ser susceptibles a algún tipo de regulación redox, posiblemente por la generación de puentes disulfuros intramoleculares.

Estrechamente relacionado a *T. cruzi*, el microorganismo *T. brucei* también fue utilizado en este trabajo de Tesis como modelo biológico a partir del cual, y en base a información obtenida del proyecto genoma del parásito (Wellcome Trust, Sanger Institute, Pathogen Sequencing Unit, <http://www.genedb.org>) se clonó el gen que en este organismo codifica para UDP-GlcPPasa (*Tb* UDP-GlcPPasa), la proteína recombinante se expresó en *E. coli* y se purificó cromatográficamente. En este organismo, los glicoconjugados de la superficie celular, como por ejemplo las VSG, el receptor de transferrina, glicoproteínas unidas a ricina y varias proteínas de superficie (Nolan y col., 1999; Atrih y col., 2005), contienen residuos Gal. *T. brucei* es incapaz de incorporar Gal a través de la membrana, por lo que, como en *T. cruzi*, la única vía de obtención de este azúcar es a través de la epimerización de UDP-Glc a UDP-Gal (Roper y col., 2002; Roper y col., 2005). Así, la enzima UDP-GlcPPasa, aparece como una de las enzimas claves en la síntesis de precursores indispensables en los glicoconjugados de la superficie celular del parásito.

4.3.4 Clonado y expresión del gen que codifica para la enzima UDP-GlcPPasa de *T. brucei*

A partir de la secuencia que codifica para una UTP: Glc-1P uridililtransferasa (CDS: TB10.389.0330), publicada en base de datos del proyecto genoma de *T. brucei* (<http://www.genedb.org>), se confeccionaron oligonucleótidos específicos con el objetivo de poder amplificar el gen correspondiente mediante PCR. El gen (1458 pb) fue amplificado empleando como molde ADN genómico del parásito y clonado dentro del vector pCR[®]4Blunt-TOPO[®]. Posteriormente se corroboró la identidad del gen por secuenciación.

Para expresar la enzima *Tb*UDP-GlcPPasa recombinante, el gen de interés se subclonó dentro del vector pRSET-B entre los sitios *Bam*HI y *Eco*RI, quedando el gen

fusionado a una secuencia que introduce una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína codificada. La expresión y la purificación de la proteína recombinante de *T. brucei*, soluble y activa, se llevó a cabo empleando la misma metodología que la utilizadas para las enzimas de *E. histolytica* y *T. cruzi*. La Figura 4.3.6 muestra el SDS-PAGE de la purificación, donde podemos observar la banda correspondiente a la enzima recombinante (58 kDa), la cual presenta un elevado grado de pureza. Con la enzima purificada se generaron anticuerpos policlonales anti *TbUDP-GlcPPasa* en conejo según se describió en la sección 3.26. Estos anticuerpos fueron empleados en diferentes ensayos de inmunodetección de la enzima en extractos de *T. brucei*, *T. cruzi* y *E. histolytica* (ver secciones 4.2.2 y 4.3.2). Como se mostró en la Figura 4.3.2, los anticuerpos específicos anti *TbUDP-GlcPPasa* reconocieron en un ensayo de inmunodetección realizado sobre un extracto de *T. brucei*, una proteína que presentó una masa molecular coincidente con el tamaño de la proteína recombinante.

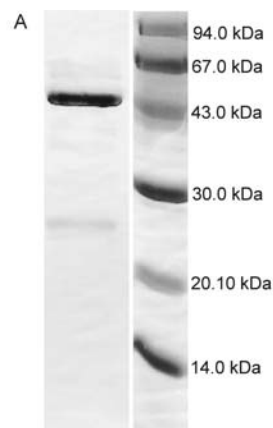


Figura 4.3.6. Purificación de la enzima *TbUDP-GlcPPasa*. La figura muestra el SDS-PAGE al 10%, en el cuál se sembró la proteína purificada obtenida mediante la cromatografía de metal inmovilizado.

Se determinó la estructura cuaternaria de la proteína pura mediante cromatografía de filtración por geles. La enzima presentó un único pico de elusión que se corresponde con un monómero, en concordancia con resultados obtenidos trabajando con la enzima de *L. major* (Lamerz y col., 2006), tubérculo de papa (Gupta y col., 2008) y los obtenidos en esta Tesis con las enzimas de *E. histolytica* y *T. cruzi*.

4.3.5 Caracterización funcional de la enzima *TbUDP-GlcPPasa*

4.3.5.1 Evaluación de la actividad enzimática y determinación de parámetros cinéticos

La *Tb*UDP-GlcPPasa recombinante purificada presentó actividad UDP-GlcPPasa, exhibiendo una V_{\max} 13 veces mayor en sentido de síntesis de UDP-Glc que en sentido de pirofosforólisis. La Tabla 4.3.3 muestra los resultados de la caracterización cinética de la enzima. El Mg^{2+} resultó ser un cofactor esencial de la *Tb*UDP-GlcPPasa. La enzima presentó cinéticas de saturación hiperbólica para la mayoría de los sustratos excepto para UTP (cooperatividad). Los valores de $S_{0,5}$ obtenidos se encuentran dentro del mismo orden de magnitud que los reportados por otros autores para la enzima de distintos organismos eucariotas (Lamerz y col., 2006) y en concordancia con aquellos obtenidos para las UDP-GlcPPasas de *E. histolytica* y *T. cruzi*. La presencia de efectores alostéricos comunes de las ADP-GlcPPasas (PEP, Fru-6P, Pyr, Glc-6P, 3PGA, Fru-1,6bisP, AMP y Pi) no afectaron la actividad de la enzima. Al igual que en el caso de las enzimas de *T. cruzi*, *Tb*UDP-GlcPPasa tampoco utilizó ATP, GTP, TTP ni manosa-1P como sustratos alternativos, indicando que la enzima tiene una elevada especificidad por los sustratos UTP y Glc-1P.

Sustrato	$S_{0,5}$ (mM)	n_H	V_{\max} (U/mg)
Glc-1P	0,12	1,0	200
UTP	0,30	2,3	
Mg²⁺ (síntesis de UDP-Glc)	0,14	1,0	
UDP-Glc	0,22	1,0	15
PPi	0,26	1,0	
Mg²⁺ (pirofosforólisis)	0,03	1,0	

Tabla 4.3.3 Parámetros cinéticos para los sustratos de la enzima *Tb*UDP-GlcPPasa.

4.3.5.2 Regulación redox sobre la actividad de la enzima *Tb*UDP-GlcPPasa

La enzima *Tb*UDP-GlcPPasa contiene en su estructura primaria, diez residuos cisteína y quince residuos metionina, que como mencionamos anteriormente son sensibles a la acción de agentes oxidantes. Se evaluó el efecto de diferentes agentes oxidantes (diamida, H_2O_2 , y NPS) sobre la actividad *Tb*UDP-GlcPPasa. Los ensayos se realizaron de la misma manera que en la sección 4.2.3.2. En la Figura 4.3.7 se puede observar que la enzima es inactivada completamente en presencia de cualquiera de los agentes oxidantes. Como en los casos que estuvimos analizando anteriormente la

inhibición fue total y siguió una cinética de pseudos-primer orden. Si se analizan en mayor detalle los valores de las constantes de inactivación (K_I) de cada oxidante vemos que la diamida resultó ser un oxidante más efectivo, con una mayor reactividad en comparación con el peróxido de hidrógeno ó el NPS (Tabla 4.3.4). Más aún, si comparamos los valores de K_I con los correspondientes a las enzimas de *T. cruzi*, vemos que éstos últimos son, al menos, un orden de magnitud mayor. Esto estaría indicando que la enzima, en *T. brucei*, sería menos sensible a la acción de oxidantes, siendo éste un hecho fisiológicamente conveniente para este organismo que, por las características de su ciclo biológico, tiene hábitats en donde la tensión de oxígeno es elevada (al menos en el hospedero vertebrado).

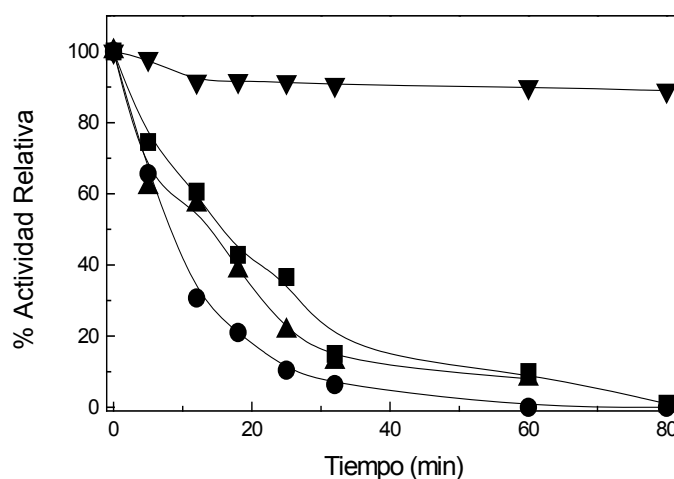


Figura 4.3.7. Inactivación de la enzima *TbUDP-GlcPPasa* en presencia de oxidantes. La enzima se incubó en presencia de 10 mM diamida (●), 40 mM peróxido de hidrógeno (▲), 50 mM de NPS (■) ó en ausencia de oxidante (▼) (control) a pH 8,0 y 25 °C. En cada uno de los tiempos establecidos se tomaron alícuotas a las que se les determinó la actividad UDP-GlcPPasa en sentido de síntesis de UDP-Glc.

Oxidante	K_I ($\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
Diamida	0,0090
Peróxido de hidrógeno	0,0014
NPS	0,0009

Tabla 4.3.4 Constante de inactivación de *TbUDP-GlcPPasa* por los agentes oxidantes diamida, peróxido de hidrógeno y NPS.

Del análisis de la figura correspondiente al SDS-PAGE no reductor (Fig.4.3.8) podemos observar que la proteína tratada con ditioneitol (reducida), presenta una motilidad electroforética menor que la enzima oxidada. Esta migración diferencial sugiere la formación de un (o tal vez más) puente disulfuro intramolecular cuando la enzima se encuentra oxidada, disminuyendo así la flexibilidad y el volumen hidrodinámico de la molécula (Loferer y col., 1995; Kang y col., 1999).

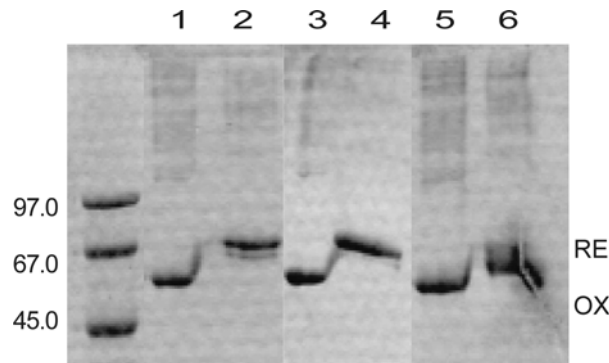


Figura 4.3.8. Análisis de los diferentes estados redox de la *TbUDP-GlcPPasa* por SDS-PAGE al 10%. Previo a realizar la electroforesis, distintas alícuotas de la enzima recombinante purificada fueron tratadas con 10 mM de diamida (línea 1), 50 mM de nitroprusiato de sodio (línea 3), ó 40 mM de peróxido de hidrógeno (línea 5) durante 30 min. La enzima oxidada por cada uno de los tres agentes oxidantes fue posteriormente reducida por el agregado de DTT 5 mM durante 30 min (líneas 2, 4, y 6) y finalmente fueron analizadas mediante SDS-PAGE.

Los ensayos de oxidación con diamida mostraron que la enzima no era protegida de la inactivación por oxidación en presencia de los sustratos Glc-1P y UTP (Fig. 4.3.9), a diferencia de lo observado en las enzimas de *T. cruzi* y *E. histolytica*.

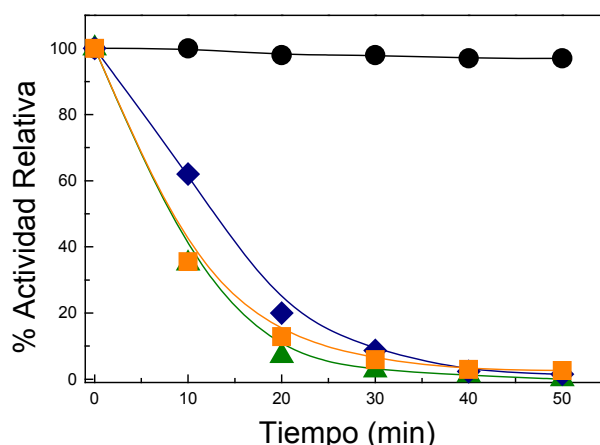


Figura 4.3.9. Ensayo de protección por sustratos de la oxidación de *Tb*UDP-GlcPPasa por acción de la diamida. La enzima se incubó a 25 °C y alícuotas de la misma fueron tomadas a intervalos regulares para ensayar la actividad remanente en el sentido directo de reacción. Control sin oxidante (●), enzima con diamida (▲), enzima con diamida y Glc-1P 1 mM (◆) y enzima con diamida y UTP 1 mM (■).

Conjuntamente, se analizó si la pérdida de actividad luego de la oxidación de la enzima podía ser revertida por acción de diferentes agentes reductores. Con este fin, luego de la oxidación con diamida la enzima fue tratada con reductores como *Tb*TRX, *Ec*TRX y *Tc*TXN previamente reducidos (ver sección 3.25). En los ensayos realizados pudimos apreciar una reversión total del efecto inhibitorio de la oxidación sólo por incubación con 150 μ M de *Tb*TRX (Fig.4.3.10). Esta reversión diferencial de la actividad de *Tb*UDP-GlcPPasa, también observada en *Tc*UDP-GlcPPasa1 y *Tc*UDP-GlcPPasa2, distingue por primera vez a nivel bioquímico una función específica para la TRX de tripanosomas (Reckenfelderbaumer y col., 2000; Piattoni y col., 2006), proteína que hasta el momento sólo había sido estudiada como un actor más dentro del metabolismo de detoxificación de sustancias reactivas del oxígeno.

En general, el comportamiento de *Tb*UDP-GlcPPasa fue distinto al observado en las otras UDP-GlcPPasas estudiadas. Así, las concentraciones de los agentes redox (oxidantes y reductores) ensayados y los tiempos de inactivación fueron superiores con respecto a los utilizados para la enzima de *E. histolytica*, y el ensayo de recuperación de actividad con DTT (se emplearon concentraciones de 1 a 100 mM) no superó el 30 % de reversión.

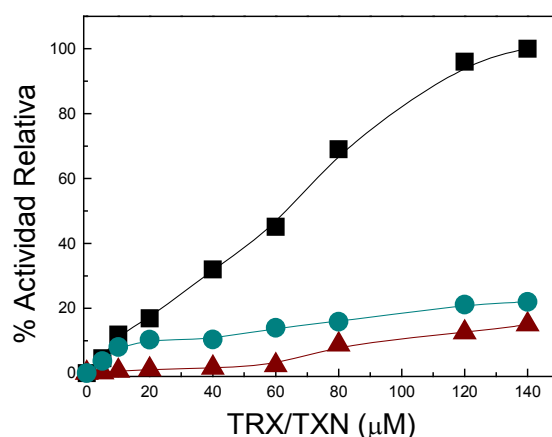


Figura 4.3.10. Actividad de la enzima *Tb*UDP-GlcPPasa en presencia de agentes reductores. La reducción se realizó a pH 8,0 y a 25°C, según lo descrito en la sección 3.26, con los agentes reductores, *Tb*TRX_{red} (■), *Ec*TRX_{red} (●) y *Tc*TXN_{red} (▲). Luego de 30 min se determinó la actividad UDP-GlcPPasa empleando el método colorimétrico.

Los resultados obtenidos sugieren que la actividad de la enzima de *T. brucei*, como en el caso de la enzima amébrica y de *T. cruzi*, es susceptible a una regulación de tipo redox, donde posiblemente la formación y ruptura de uno o varios puentes disulfuros podrían ser claves para el proceso. La interpretación del posible mecanismo de regulación redox de la actividad enzimática es, en el caso de la enzima de *T. brucei* (también en el caso de las enzimas de *T. cruzi*), más difícil. Las UDP-GlcPPasas de tripanosomas tienen un elevado número de residuos cisteínas y metioninas en su estructura (10 y 15 respectivamente). Si bien es claro que existe un fenómeno de pérdida de actividad por oxidación y recuperación de la actividad en presencia de reductores, el mismo no puede ser atribuible, en tripanosomátidos, a la dupla C108/C378 como se analizó en el caso de la enzima de *E. histolytica*. Esto es debido a que en el caso de los tripanosomátidos las UDP-GlcPPasas carecen del residuo C108. Alternativamente, se podría pensar en un mecanismo de reacción basado en la conocida reactividad entre tioles y sulfóxidos, en donde el grupo sulfidrilo de un tiol actúa como nucleófilo y ataca el átomo de azufre de un motivo sulfóxido. De esta manera se formaría un intermediario tetracoordinado covalente. La ruptura de este intermediario será consecuencia del ataque de un segundo grupo tiol que formará un puente disulfuro. Este puente disulfuro puede ser reducido por DTT, tiorredoxinas, etc. Esto último no es una especulación aislada sino que es un mecanismo que fue caracterizado en otras enzimas por Lowther y colaboradores (Lowther y col., 2000). Actualmente se está

trabajando sobre el modelo estructural de la *Tb*UDP-GlcPPasa recientemente publicado por Wernimont y colaboradores (PDB ID: 3GUE - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), con el objetivo de identificar residuos que nos permitan entender el funcionamiento de la enzima y avanzar en la caracterización del fenómeno de regulación redox que regula la actividad de *Eh*UDP-GlcPPasa, *Tb*UDP-GlcPPasa, *Tc*UDP-GlcPPasa1 y *Tc*UDP-GlcPPasa2.

Algunos autores han reportado que ciertas UDP-GlcPPasas presentan una fina regulación de su actividad. En levaduras, por ejemplo, lo hacen por fosforilación (Rutter y col., 2002); en mamíferos, por *O*-glicosilación (Wells y col., 2003) y en cebada, por oligomerización/deoligomerización (Martz y col., 2002). Además, en la enzima de plantas se han encontrado sitios conservados para Ser/Thr quinasas (Geisler y col., 2004) y para unión a enzimas del tipo 14-3-3 (Obenauer y col., 2003), lo que indicaría que la UDP-Glc no sólo sería un precursor para la biosíntesis de polisacáridos, sino que también podría actuar como molécula señal (Koch, 1996; Higuera y col., 2003).

Los resultados obtenidos durante este trabajo de Tesis contribuyen no sólo a la caracterización cinética de UDP-GlcPPasas de diferentes organismos, sino también a la caracterización de un mecanismo inédito en los organismos eucariotas unicelulares estudiados. Tal mecanismo de regulación implica a su vez la interacción entre distintas rutas metabólicas (metabolismo antioxidante y el metabolismo de los hidratos de carbono).

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones generales que se pueden plantear a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis pueden detallarse como sigue.

1- Respecto de la enzima *SmUDP-GlcPPasa*:

- Las enzimas His-*SmUDP-GlcPPasa* y *SmUDP-GlcPPasa* se expresaron en *E. coli*, en forma soluble y activa, presentando una estructura cuaternaria monomérica, a diferencia de otras UDP-GlcPPasas bacterianas.
- Los anticuerpos policlonales específicos contra UDP-GlcPPasa de *X. campestris*, producidos en conejo, reconocieron a la enzima recombinante de *S. mutans*, avalándose así la identidad de proteína recombinante.
- Tanto la enzima His-*SmUDP-GlcPPasa* como la *SmUDP-GlcPPasa* exhibieron la correspondiente actividad enzimática UDP-GlcPPasa, observándose, además, que la presencia de la etiqueta de histidinas no modificó los parámetros cinéticos. En el caso de la enzima recombinante etiquetada, se demostró que podía emplear TTP (no GTP ni ATP) y Man-1P como sustratos.
- La actividad de la enzima no fue modificada en presencia de los efectores alostéricos de las ADP-GlcPPasas como PEP, 3PGA, Fru-1,6bisP, Fru-6P, Glc-6P, Pyr, Pi y AMP.
- Se logró obtener en forma soluble la enzima quimérica *SmUDP-GlcPPasa/EcADP-GlcPPasa* C-terminal, la cual presentó actividad UDP-GlcPPasa, pero no fue activa como ADP-GlcPPasa. La estructura cuaternaria de la quimera, al igual que en el caso de enzima *SmUDP-GlcPPasa* resultó monomérica (50 kDa).
- La actividad de la enzima quimérica no fue modificada en presencia de los efectores alostéricos de las ADP-GlcPPasas como PEP, Fru-1,6bisP, Fru-6P, Glc-6P, Pyr, Pi y AMP. Como excepción, la presencia de 3PGA incrementó 6 veces la actividad de la enzima en el sentido de síntesis de UDP-Glc. Este comportamiento, en donde el 3PGA actúa como activador de la enzima, es similar al encontrado para las ADP-GlcPPasas de cianobacterias y eucariotas fotosintéticos como plantas superiores y algas verdes.
- Como mencionamos anteriormente, en *S. mutans*, el proceso de adherencia y la formación de la placa dental son importantes en el desarrollo de la caries dental. Este organismo crece ensamblado a la superficie de los dientes formando biofilmes inmersos en una matriz que le provee protección. Este trabajo de Tesis brinda una herramienta molecular que será muy importante para la continuidad de los trabajos de

caracterización de la enzima y su relevancia en la síntesis de polisacáridos de la matriz.

- La UDP-GlcPPasa de *S. mutans* fue de utilidad para construir una proteína quimérica, híbrida con la ADP-GlcPPasa de *E. coli*. La proteína quimérica construida básicamente contuvo la UDP-GlcPPasa de *S. mutans* como extremo N-terminal a la que se le fusionó el dominio C-terminal de la enzima enterobacteriana (este último identificado como funcional para la regulación alostérica de la ADP-GlcPPasa). La enzima quimérica resultante mostró ser activa como UDP-GlcPPasa y poseer regulación (activación) alostérica por el 3PGA. De esta forma pudo obtenerse, en forma inédita, una UDP-GlcPPasa regulada alostéricamente. Además, los resultados obtenidos con la proteína híbrida refuerzan lo postulado anteriormente respecto a que las propiedades alostéricas de las ADP-GlcPPasas están principalmente conferidas por el extremo C-terminal de estas enzimas.

2- Respecto de la enzima *Eh*UDP-GlcPPasa:

- La enzima recombinante UDP-GlcPPasa de *E. histolytica* pudo ser expresada soluble y activa en *E. coli*.
- La enzima recombinante presentó una estructura cuaternaria que se corresponde con un monómero, hecho que es coincidente a lo informado para la enzima del parásito protozoario *L. major*.
- La *Eh*UDP-GlcPPasa recombinante purificada fue reconocida, en experimentos de inmunotransferencia, por anticuerpos policlonales específicos desarrollado en conejo contra la UDP-GlcPPasa de *T. brucei* (30% de identidad). Mediante ensayos de inmunodetección realizados sobre extracto crudo de trofozoítos de la ameba se confirmó la expresión de la proteína en el parásito. El anticuerpo policlonal utilizado reconoció en el *westernblotting* una única banda de proteína al tamaño predicho mediante herramientas bioinformáticas, y con este suero policlonal específico se realizó la localización celular de la enzima utilizando microscopía de epifluorescencia. Este ensayo reveló señales de reconocimiento en forma de partículas, sugiriendo que la proteína podría localizarse en *E. histolytica* en cuerpos vesiculares. Esto podría estar indicando una ubicación a nivel de los microsomas del parásito.
- En cuanto a la actividad de UDP-GlcPPasa, la *Eh*UDP-GlcPPasa presentó una actividad específica para la catálisis en el sentido de síntesis de UDP-Glc 30 veces mayor que en el sentido inverso de pirofosforólisis.

- Se comprobó que la actividad de la enzima no es afectada por metabolitos caracterizados como efectores alostéricos de ADP-GlcPPasas, tales como PEP, Fru-6P, Pyr, Glc-6P, 3PGA, Fru-1,6bisP, AMP y Pi, y que la *Eh*UDP-GlcPPasa no emplea ATP, TTP, GTP ni Man-1P como sustratos alternativos.
- La actividad de la enzima recombinante purificada es modificada por incubación con oxidantes. La incubación con diamida, peróxido de hidrógeno y nitroprusiato de sodio, los cuales oxidan residuos aminoacídicos que contienen azufre (-S); presentando una inhibición irreversible, que sigue una cinética de pseudo-primer orden. El UTP actuó como sustrato protector de la inhibición de la enzima tras la oxidación.
- El efecto inhibitorio de los oxidantes sobre la actividad de la *Eh*UDP-GlcPPasa pudo ser revertido por incubación de la enzima oxidada con diferentes reductores tanto químicos (como el DTT), como biológicos (*Tc*TXN, *Tb*TRX, *Eh*TRX8, y *Eh*TRX41). *Eh*TRX8 y *Eh*TRX41 tienen relevancia fisiológica como reguladores redox, ya que se encuentran dentro de las células en concentraciones capaces de forzar la recuperación de la actividad enzimática.
- Las mutantes simples C108S y C378S y la doble mutante C108/378S mostraron una respuesta alterada a los agentes oxidantes en comparación con la enzima salvaje, en general comportándose como más estables a la oxidación. Nuestros resultados podrían estar indicando que, en *E. histolytica*, la participación de distintos oxidantes, a través de modificaciones específicas que producirían a nivel estructural en la enzima le harían perder su actividad en forma irreversible. Esta inactivación puede ser revertida en presencia de reductores. La formación del puente disulfuro intramolecular (oxidación) podría bloquear parcialmente el acceso del sustrato al sitio activo, reduciendo así, total o parcialmente, la actividad enzimática. La unión covalente entre ambas cisteínas parecería producir un cambio conformacional generando una molécula más compacta con un patrón de migración diferente en el SDS-PAGE no reductor. La inhibición de la actividad enzimática fue irreversible y sólo se revirtió en presencia de distintos agentes reductores. El sistema tiorredoxina, recientemente caracterizado por nuestro grupo de investigación, fue el único capaz de recuperar totalmente la actividad enzimática, subrayando así la importancia fisiológica de este sistema metabólico.

3- Respecto de las isoenzimas *Tc*UDP-GlcPPasas y *Tb*UDP-GlcPPasa:

- Ambas isoformas *Tc*UDP-GlcPPasa1 y *Tc*UDP-GlcPPasa2 y la *Tb*UDP-GlcPPasa se expresaron en forma recombinante exhibiendo actividad UDP-GlcPPasa y presentando

una estructura cuaternaria monomérica. Las actividades enzimáticas de las dos isoenzimas de *T. cruzi* no presentaron diferencias significativas aunque *TcUDP-GlcPPasa2* fue claramente más sensible a la diamida y al peróxido de hidrógeno que *TcUDP-GlcPPasa1*, como lo indican los correspondientes valores de K_i .

- Ninguna de las tres enzimas utiliza ATP, TTP, GTP, ni Man-1P como sustratos alternativos, y sus actividades no son afectadas por metabolitos caracterizados como efectores de las ADP-GlcPPasas.

- La expresión de las enzimas *TcUDP-GlcPPasa1*, *TcUDP-GlcPPasa2* y *TbUDP-GlcPPasa* fue confirmada mediante experimentos de electrotransferencia seguidos de inmunodetección realizados sobre extractos totales de epimastigotes de *T. cruzi* y tripomastigotes sanguíneos de *T. brucei* respectivamente. En estos ensayos se utilizaron anticuerpos policlonales específicos desarrollados en conejo contra la UDP-GlcPPasa de *T. brucei* recombinante.

- Compuestos oxidantes como diamida, peróxido de hidrógeno y nitroprusiato de sodio inactivaron a las tres enzimas, siendo el proceso reversible en presencia de reductores tales como DTT, TXN y TRX. Esto último es de gran importancia pues estaría indicando por primera vez, en *T. cruzi* y *T. brucei*, una actividad biológica diferencial para TRX respecto de las TXN. De esta forma, en tripanosomátidos (e incluso en protozoos en general), la TRX podría estar principalmente involucrada en un mecanismo de modificación post-traduccional de proteínas similar al encontrado en otros organismos (por ejemplo, en plantas y animales).

- Los resultados obtenidos sugieren que las UDP-GlcPPasas de *T. brucei* y de *T. cruzi* son enzimas cuya actividad enzimática es regulable por un mecanismo de oxidación-reducción. Pese a la elevada homología que existe entre éstas enzimas y la de *E. histolytica*, es importante remarcar que en *T. cruzi* y *T. brucei* las UDP-GlcPPasas carecen del residuo C108, uno de los residuos de cisteína que junto al residuo C378 (en la enzima amébrica), era considerado partícipe de la formación, por oxidación, del puente disulfuro que inactiva la enzima. Así, postulamos que es posible que en los tripanosomátidos estudiados, el fenómeno de regulación redox se lleve adelante mediante la formación y ruptura de al menos un puente disulfuro que podría estar siendo formado por la C378, altamente conservada en las enzimas de estos parásitos y el átomo de azufre de otro residuo aminoacídico que se encuentre a una distancia que permita la formación de esta unión covalente. En esta situación encontramos al residuo M106, un aminoácido que no es asociado normalmente a la formación de puente disulfuro. El

mismo contiene un azufre que también puede ser oxidado a –SOH, el cual podría participar en la formación de un puente disulfuro. Las UDP-GlcPPasas de *T. brucei* y de *T. cruzi* tienen 10 residuos cisteínas y 15 metioninas por lo que la caracterización del fenómeno de regulación redox será más complicado que en el caso de la enzima de *E. histolytica*. En cualquier caso, la posibilidad de contar con clones productores de las distintas enzimas recombinantes seguramente ayudará, de cara al futuro, al diseño de experimentos de mutagénesis dirigidas, simples y múltiples y también a la producción de suficiente cantidad de las enzimas mutantes para ensayos de cristalización y difracción de rayos X, tendientes a resolver estos nuevos interrogantes que surgen de la presente Tesis.

6. RESUMEN

Para establecer interacciones con otras células, así como para evadir al sistema inmune del hospedero y potenciar su virulencia y patogenicidad, muchos microorganismos han desarrollado estructuras que se localizan a nivel de la superficie celular, siendo los oligosacáridos componentes principales de las mismas. El estudio de la biosíntesis de los compuestos presentes en la superficie celular, generalmente glicoconjugados, es de gran relevancia, no sólo para fortalecer el conocimiento bioquímico de los distintos organismos, sino también para caracterizar blancos moleculares de potenciales inhibidores que puedan actuar como fármacos específicos. En una amplia variedad de microorganismos, el reparto de la glucosa para producir oligo- y polisacáridos estructurales o de reserva es una etapa central del metabolismo, y la producción de compuestos con diferentes funciones celulares está determinada en relación a cómo la Glc-1P es utilizada por diferentes enzimas. Por esto, el conocimiento de las propiedades de las enzimas involucradas en dichos procesos celulares es relevante para entender el metabolismo de los hidratos de carbono en un organismo y las derivaciones funcionales de los mismos. En bacterias, la UDP-glucosa pirofosforilasa (UDP-GlcPPasa) y la ADP-GlcPPasa son dos enzimas claves que utilizan Glc-1P, la que puede ser incorporada a la producción de polisacárido de reserva (vía ADP-Glc), a la interconversión de la hexosa ó a la producción de oligo- y polisacáridos estructurales (vía UDP-Glc). En otros microorganismos, la ocurrencia conjunta de ambas pirofosforilasas no es tan clara; pero de todas maneras la producción de distintos polímeros de Glc implica la existencia de un fraccionamiento metabólico de la Glc-1P. Así, se hace necesario estudiar en detalle la presencia y las propiedades de la UDP-GlcPPasa en diferentes organismos, para establecer rutas metabólicas de producción de polisacáridos.

La UDP-GlcPPasa cumple una función relevante para la producción de distintos glicoconjugados en los microorganismos que son objeto de estudio en la presente Tesis. Así, en *Streptococcus mutans*, una bacteria Gram positiva, la UDP-Glc es el metabolito precursor para la formación de la cadena lateral de poliglucosas del antígeno serotipo *c*-específico y es posible que actúe también como precursor para la síntesis de componentes celulares como ácido teicoico y glicofosfolípidos. Por otra parte, el parásito protozoario *Entamoeba histolytica* posee glicoconjugados de la superficie celular anclados a GPI, cuyas estructuras involucran residuos de manosa, glucosa y galactosa, que primariamente son interconvertidos metabólicamente como nucleósido-

difosfo-azúcares. Aunque la ruta biosintética de estos compuestos no está del todo esclarecida en este organismo, la participación de la UDP-Glc es potencialmente relevante. Respecto a *Trypanosoma cruzi*, el protozoo presenta una cubierta, el glicocáliz, que es fundamental para su supervivencia e infectividad. La UDP-Glc es el precursor obligado para la síntesis de los residuos de galactosa, ramnosa y xilosa presentes en los glicoconjugados de tal estructura de cubierta. Similar es el caso de *Trypanosoma brucei*, donde la superficie celular presenta glicoconjugados ricos en residuos de galactosa.

En este trabajo de Tesis se presenta la caracterización de la UDP-GlcPPasa de los microorganismos antes mencionados, así como la realización de un análisis comparativo de las propiedades de la enzima con las de otras pirofosforilasas, con el objeto de comprender cómo la Glc-1P es fraccionada metabólicamente y cómo este proceso es regulado en diferentes células. Se clonaron los genes que codifican para las UDP-GlcPPasas de *S. mutans*, *E. histolytica*, *T. cruzi* y *T. brucei*. Las enzimas se expresaron fusionadas a una etiqueta de histidinas en sistemas heterólogos (*Escherichia coli*), lo que permitió obtener a las proteínas de interés solubles, activas y en cantidades suficientes para realizar la caracterización de las mismas. Las propiedades cinéticas de las enzimas se compararon con las de UDP-GlcPPasas de otras fuentes. Los estudios sobre la estructura cuaternaria de las mismas determinaron que en su estado nativo todas son monoméricas.

En lo que respecta a la UDP-GlcPPasa de *S. mutans*, la misma no exhibió actividad con ATP ni con GTP, pero si utilizó TTP y manosa-1P; resultados que concuerdan parcialmente, con lo informado por otros autores respecto a la relativa promiscuidad de la enzima para utilizar otros sustratos alternativos, sobre todo presentar actividad de timidililtransferasa. Con el propósito de evaluar si la UDP-GlcPPasa bacteriana presentaba una regulación alostérica de su actividad, realizamos estudios cinéticos en presencia de los compuestos previamente caracterizados como efectores para las ADP-GlcPPasas. Estos ensayos nos indicaron que esta enzima no se encuentra regulada alostéricamente por metabolitos. Estos resultados están de acuerdo con los antecedentes bibliográficos, respecto a que las UDP-GlcPPasa no son enzimas reguladas. Conociendo las propiedades regulatorias de las ADP-GlcPPasas bacterianas y considerando los resultados obtenidos con la UDP-GlcPPasa de *S. mutans*, nos propusimos obtener la proteína quimérica, híbrida, formada por la fusión de esta última como extremo N-terminal y el dominio C-terminal de la ADP-GlcPPasa de *E. coli*. Quisimos en este

ensayo comprobar la importancia del extremo C-terminal de la ADP-GlcPPasa en el fenómeno de regulación alostérica. Así, la quimera que obtuvimos no fue activa como ADP-GlcPPasa pero si lo fue como UDP-GlcPPasa, y su actividad enzimática se vio incrementada en presencia de 3-fosfo-glicerato (activador). Este comportamiento es similar al encontrado para las ADP-GlcPPasas de cianobacterias y eucariotas fotosintéticos. Nuestro resultado concuerda con lo propuesto por otros autores respecto a que las nucleósido-difosfo-azúcarPPasas posiblemente deriven, evolutivamente, de un ancestro común y que habrían perdido parte del dominio C-terminal, por lo que no se comportan como enzimas alostéricas (salvo las ADP-GlcPPasas que son más grandes y muestran regulación). Los resultados además refuerzan la idea de que el dominio N-terminal de las ADP-GlcPPasas es necesario, pero no suficiente, para tener una enzima activa y regulada, sino que resulta necesaria la interacción con residuos presentes en el extremo C-terminal, siendo esto último crítico para la regulación de estas enzimas.

En cuanto a la UDP-GlcPPasa de *E. histolytica*, fue posible determinar que la misma no utiliza ATP, TTP, GTP ni manosa-1P como sustratos alternativos, ni tampoco parece ser regulada por efectores alostéricos comunes de las ADP-GlcPPasas. La actividad de la enzima recombinante pudo ser modificada variando las condiciones de óxido-reducción del medio. La enzima fue inactivada cuando se preincubó con distintos agentes oxidantes (diamida, peróxido de hidrógeno y nitroprusiato de sodio). La inhibición fue irreversible, pero pudo revertirse por tratamiento con distintos agentes reductores (ditiotreitól, tiorredoxina y triparredoxina). Uno de los agentes reductores analizados, la tiorredoxina, fue recientemente caracterizado en este parásito como componente del sistema antioxidante de detoxificación de sustancias reactivas del oxígeno y del nitrógeno. En este trabajo mostramos que el sistema tiorredoxina, en *E. histolytica*, puede participar también en la regulación redox de la actividad de enzimas que forman parte de otra ruta metabólica como es la síntesis de oligo y polisacáridos. Por modelado molecular y mutagénesis sitio-dirigida se identificaron los aminoácidos que estarían involucrados en la regulación redox (C108 y C378) a través de la formación y ruptura de un puente disulfuro. Fue posible también identificar un residuo de metionina presente en el sitio de unión a nucleótido, como un aminoácido esencial para la actividad catalítica de la UDP-GlcPPasa amébrica.

Estudios similares se realizaron con las UDP-GlcPPasas recombinantes de *T. cruzi* y *T. brucei*, donde se observaron comportamientos comparables respecto al efecto

causado sobre la actividad por los distintos agentes redox. Cabe mencionar que en *T. cruzi* se encuentran dos UDP-GlcPPasas con elevada similitud estructural, pero que mostraron diferencias significativas en sus propiedades cinéticas y de respuesta a oxidantes de cisteínas. Este comportamiento diferencial podría justificarse en base variaciones en la estructura tridimensional relacionada con la carga neta y su distribución superficial en cada macromolécula. De todas formas, la inactivación por diamida de las UDP-GlcPPasas de tripanosomátidos pudo ser revertida por incubación con ditiotreitól o tiorredoxina, no observándose para esto último comportamientos distintos entre las isoenzimas. Curiosamente, la tiorredoxina pudo revertir totalmente la inhibición de la actividad de estas enzimas mientras que la triparredoxina sólo logró recuperar un 20 % (promedio) de la misma. Esta es la primera caracterización de una actividad funcional de la tiorredoxina que no puede ser ejecutada con igual eficiencia por la triparredoxina.

Los resultados contribuyen a poner de manifiesto que en parásitos protozoarios existiría un mecanismo de regulación de la actividad de las UDP-GlcPPasas (que podría operar también sobre otras enzimas) por modificación post-traducciona redox. En tal sentido, algunas de las especies químicas producidas por reducción incompleta del oxígeno, no sólo generarían condiciones de estrés oxidativo sino que actuarían como reguladores redox de la actividad de enzimas que, como en el caso de las UDP-GlcPPasas, forman parte de otras rutas metabólicas dentro del parásito (al menos del metabolismo de los hidratos de carbono).

7. ABSTRACT

Many organisms have developed different structures on their cellular surface for interacting with other cells, promoting thus their virulence. These structures generally contain glycoconjugates as main components. The study of such cellular surface compounds thus constitutes a very attractive research subject. This is useful not only to gain knowledge about the organism biochemistry, but also to characterize molecular targets, which can be a rational tool for designing inhibitors as potential new chemotherapeutic agents. In a wide range of microorganisms, glucose partitioning to produce structural or storage oligo- and polysaccharides is a central step of cellular metabolism. Production of compounds with different cellular functions is directly related with Glc-1P availability. The knowledge about enzymes involved in such cellular processes is relevant to understand carbohydrates metabolism and their functional consequences in an organism. In bacteria, UDP-glucose pyrophosphorylase (UDP-GlcPPase) and ADP-GlcPPase are two key enzymes that use Glc-1P as a substrate for the production of both storage polysaccharides (via ADP-Glc) and structural oligo- and polysaccharides (via UDP-Glc). In other organisms, the rationale for the presence of both pyrophosphorylases is less clear; although production of different polyglucans entail the existence of a metabolic partitioning of Glc-1P. Thus, it is relevant the in depth study of the properties of UDP-GlcPPase in different organisms to better understand the occurrence and regulation of metabolic pathways related with polysaccharides production.

UDP-GlcPPase plays a relevant role for glycoconjugates synthesis in the microorganisms under study in the present Thesis work. Thus, in the Gram-positive bacterium *Streptococcus mutans*, UDP-GlcPPase is essential to synthesize the polyglucose rich side chain of the serotype-c-specific antigen as well as key cellular compounds like teichoic acid and glycopospholipids. On the other hand, the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica* has GPI-anchored glycoconjugates in the cell surface. These structures contain mannose, glucose and galactose moieties, which are metabolically processed as nucleoside-diphospho-sugars. Although metabolic pathways for synthesis of these complex glycosyl derivatives have been not completely elucidated, UDP-Glc is a potentially relevant metabolite. Concerning *Trypanosoma cruzi*, the protozoan has a cellular cover, the glycocalix, fundamental for its survival and infectivity, which consists of glycoconjugate compounds. UDP-Glc is

the obligate precursor to produce galactose, rhamnose and xylulose residues found in the glycoconjugates of such a cover structure. Similar is the case in *Trypanosoma brucei* where the cell surface contains galactose rich glycoconjugates.

In this Thesis work it is reported the characterization of UDP-GlcPPase from the microorganisms detailed above. The properties of the enzymes are comparatively analyzed with those exhibited by other pyrophosphorylases, thus seeking to better understand Glc-1P metabolic partitioning in the different cells. We cloned the genes coding for putative UDP-GlcPPases in *S. mutans*, *E. histolytica*, *T. cruzi* and *T. brucei*. The enzymes were expressed heterologously in *Escherichia coli*, obtaining recombinant enzymes soluble, active and in amounts suitable for their characterization. The kinetic properties of these enzymes were compared with those previously reported for UDP-GlcPPases from other sources. A monomeric quaternary structure was determined for all the recombinant enzymes.

UDP-GlcPPase from *S. mutans* did not use ATP or GTP as a substrate, but it used TTP and mannose-1P. These results agree with previous reports about pyrophosphorylases having some promiscuity for substrates, mainly acting as thymidyltransferases. To evaluate a possible allosteric regulation of *S. mutans* UDP-GlcPPase we assayed the enzyme activity in the presence of compounds previously characterized as effectors for ADP-GlcPPases. These assays indicated that this enzyme is insensitive to allosteric regulation, which is in agreement with the properties reported for other UDP-GlcPPases. Knowing the regulatory properties exhibited by bacteria ADP-GlcPPases and after the results we obtained with UDP-GlcPPase, we propose to construct a chimeric, hybrid protein containing the enzyme from *S. mutans* as the N-term and fused to the C-term domain of the *E. coli* ADP-GlcPPase. We sought to analyze the significance of C-terminal domain of ADP-GlcPPase in the allosteric regulation. The chimeric protein was not active as ADP-GlcPPase, but it exhibited UDP-GlcPPase activity. Moreover, the hybrid protein was activated by 3-phosphoglycerate, a known effector of ADP-GlcPPases from cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes. Results agree with the proposal that nucleoside-diphospho-sugarPPases might evolutionarily derive from common ancestor, which lost the C-term domain yielding enzymes lacking allosteric regulation (except for ADP-GlcPPases, larger enzymes with allosteric regulatory properties). Our results also support the idea that the N-term domain of ADP-GlcPPase is necessary but not

sufficient to render a regulated and active enzyme, being the interaction with residues present at the C-term domain of the enzyme critical for regulation of its activity.

UDP-GlcPPase from *E. histolytica* was not active with ATP, TTP, GTP or Man-1P as alternative substrates, and the enzyme was found insensitive to regulation by common allosteric effectors of ADP-GlcPPases. The activity of the entamoebic UDP-GlcPPase was modified after variations in the redox environment conditions. The enzyme was inactivated after incubation with different oxidizing agents (diamide, hydrogen peroxide and sodium nitroprusside). The inhibition was irreversible, but it could be reverted by treatment with different reducing agents (dithiothreitol, thioredoxin and tryparedoxin). Interestingly, thioredoxin was recently characterized in the amebic parasite as a component of the antioxidant system. In this work we show that this system could also participate in the redox regulation of enzyme activity. By molecular modeling and site-directed mutagenesis strategies we identified two amino acid residues (C108 y C378) in the enzyme that could be involved in the redox regulation after formation and rupture of a disulphide bridge. It was also possible to characterize a methionine residue, located in the nucleotide binding site, as an essential residue for the catalytic activity of *E. histolytica* UDP-GlcPPase.

Similar studies were carried out with recombinant UDP-GlcPPases from *T. cruzi* and *T. brucei*, we observing for the latter a behavior against redo agents comparable to the amoebic enzyme. Worth of mention is the fact that *T. cruzi* has two UDP-GlcPPases with high structure similarity, but exhibiting significant differences in the kinetic properties and in the response to cysteine oxidants. This differential behavior could be assigned to variants in the three-dimensional structure related with the net charge and its surface distribution in each macromolecule. Nevertheless, inactivation of trypanosomatid UDP-GlcPPases by diamide was reverted by incubation with dithiothreitol or thioredoxin, with almost no difference observed in this respect for the distinct isoenzymes. Interestingly, thioredoxin totally reverted enzymes inhibition caused by oxidation, whereas tryparedoxin was less effective (only reverting inhibition by 20%, in average). This is the first time that it is found a functional activity of thioredoxin that can not be executed with a similar efficiency by tryparedoxin.

Results contribute to identify in parasitic protozoa the possible occurrence of a mechanism for regulation of the activity of UDP-GlcPPases (potentially also effective for other enzymes) via posttranslational redox modification. In this context, chemical species derived from incomplete oxygen reduction could produce not only oxidative

stress, but also act as redox regulators of enzyme activities that, as it is the case of UDP-GlcPPases, are involved in different metabolic pathways in the parasite (as least related with carbohydrates metabolism).

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abranches, J.; Chen, Y.Y. y Burne, R.A. (2004) *Galactose metabolism by Streptococcus mutans*. Appl Environ Microbiol 70: p. 6047-52.
- Adl, S.M.; Simpson, A.G.; Farmer, M.A.; Andersen, R.A.; Anderson, O.R.; Barta, J.R.; Bowser, S.S.; Brugerolle, G.; Fensome, R.A.; Fredericq, S.; James, T.Y.; Karpov, S.; Kugrens, P.; Krug, J.; Lane, C.E.; Lewis, L.A.; Lodge, J.; Lynn, D.H.; Mann, D.G.; McCourt, R.M.; Mendoza, L.; Moestrup, O.; Mozley-Standridge, S.E.; Nerad, T.A.; Shearer, C.A.; Smirnov, A.V.; Spiegel, F.W. y Taylor, M.F. (2005) *The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists*. J Eukaryot Microbiol 52: p. 399-451.
- Aleryani, S.; Milo, E. y Kostka, P. (1999) *Formation of peroxyxynitrite during thiol-mediated reduction of sodium nitroprusside*. Biochim Biophys Acta 1472: p. 181-90.
- Aley, S.B.; Scott, W.A. y Cohn, Z.A. (1980) *Plasma membrane of Entamoeba histolytica*. J Exp Med 152: p. 391-404.
- Alonso, M.D.; Lomako, J.; Lomako, W.M. y Whelan, W.J. (1995) *A new look at the biogenesis of glycogen*. Faseb J 9: p. 1126-37.
- Andrews, P. (1964) *Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration*. Biochem J 91: p. 222-33.
- Aragao, D.; Fialho, A.M.; Marques, A.R.; Mitchell, E.P.; Sa-Correia, I. y Frazao, C. (2007) *The complex of Sphingomonas elodea ATCC 31461 glucose-1-phosphate uridylyltransferase with glucose-1-phosphate reveals a novel quaternary structure, unique among nucleoside diphosphate-sugar pyrophosphorylase members*. J Bacteriol 189: p. 4520-8.
- Arias, D.G.; Carranza, P.G.; Lujan, H.D.; Iglesias, A.A. y Guerrero, S.A. (2008) *Immunolocalization and enzymatic functional characterization of the thioredoxin system in Entamoeba histolytica*. Free Radic Biol Med 45: p. 32-9.
- Arias, D.G.; Gutierrez, C.E.; Iglesias, A.A. y Guerrero, S.A. (2007) *Thioredoxin-linked metabolism in Entamoeba histolytica*. Free Radic Biol Med 42: p. 1496-505.
- Ariyanayagam, M.R. y Fairlamb, A.H. (1999) *Entamoeba histolytica lacks trypanothione metabolism*. Mol Biochem Parasitol 103: p. 61-9.
- Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J. y Schwede, T. (2006) *The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling*. Bioinformatics 22: p. 195-201.
- Arya, R.; Mehra, A.; Bhattacharya, S.; Vishwakarma, R.A. y Bhattacharya, A. (2003) *Biosynthesis of Entamoeba histolytica proteophosphoglycan in vitro*. Mol Biochem Parasitol 126: p. 1-8.
- Atrih, A.; Richardson, J.M.; Prescott, A.R. y Ferguson, M.A. (2005) *Trypanosoma brucei glycoproteins contain novel giant poly-N-acetyllactosamine carbohydrate chains*. J Biol Chem 280: p. 865-71.
- Bakker-Grunwald, T. y Wostmann, C. (1993) *Entamoeba histolytica as a model for the primitive eukaryotic cell*. Parasitol Today 9: p. 27-31.
- Bakker, B.M.; Mensonides, F.I.; Teusink, B.; van Hoek, P.; Michels, P.A. y Westerhoff, H.V. (2000) *Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A 97: p. 2087-92.
- Bakker, H.; Kleczka, B.; Gerardy-Schahn, R. y Routier, F.H. (2005) *Identification and partial characterization of two eukaryotic UDP-galactopyranose mutases*. Biol Chem 386: p. 657-61.

- Ballicora, M.A.; Erben, E.D.; Yazaki, T.; Bertolo, A.L.; Demonte, A.M.; Schmidt, J.R.; Aleanzi, M.; Bejar, C.M.; Figueroa, C.M.; Fusari, C.M.; Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2007) *Identification of regions critically affecting kinetics and allosteric regulation of the Escherichia coli ADP-glucose pyrophosphorylase by modeling and pentapeptide-scanning mutagenesis*. J Bacteriol 189: p. 5325-33.
- Ballicora, M.A.; Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2003) *ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis*. Microbiol Mol Biol Rev 67: p. 213-25.
- Ballicora, M.A.; Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2004) *ADP-Glucose Pyrophosphorylase: A Regulatory Enzyme for Plant Starch Synthesis*. Photosynth Res 79: p. 1-24.
- Ballicora, M.A.; Sesma, J.I.; Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2002) *Characterization of chimeric ADPglucose pyrophosphorylases of Escherichia coli and Agrobacterium tumefaciens. Importance of the C-terminus on the selectivity for allosteric regulators*. Biochemistry 41: p. 9431-7.
- Banas, J.A. y Vickerman, M.M. (2003) *Glucan-binding proteins of the oral streptococci*. Crit Rev Oral Biol Med 14: p. 89-99.
- Barrett, M.P.; Burchmore, R.J.; Stich, A.; Lazzari, J.O.; Frasch, A.C.; Cazzulo, J.J. y Krishna, S. (2003) *The trypanosomiasis*. Lancet 362: p. 1469-80.
- Barrett, M.P.; Tetaud, E.; Seyfang, A.; Bringaud, F. y Baltz, T. (1998) *Trypanosome glucose transporters*. Mol Biochem Parasitol 91: p. 195-205.
- Barry, J.D. y McCulloch, R. (2001) *Antigenic variation in trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite*. Adv Parasitol 49: p. 1-70.
- Becker, A.; Katzen, F.; Puhler, A. y Ielpi, L. (1998) *Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective*. Appl Microbiol Biotechnol 50: p. 145-52.
- Bejar, C.M.; Ballicora, M.A.; Gomez-Casati, D.F.; Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2004) *The ADP-glucose pyrophosphorylase from Escherichia coli comprises two tightly bound distinct domains*. FEBS Lett 573: p. 99-104.
- Berriman, M.; Ghedin, E.; Hertz-Fowler, C.; Blandin, G.; Renauld, H.; Bartholomeu, D.C.; Lennard, N.J.; Caler, E.; Hamlin, N.E.; Haas, B.; Bohme, U.; Hannick, L.; Aslett, M.A.; Shallom, J.; Marcello, L.; Hou, L.; Wickstead, B.; Alsmark, U.C.; Arrowsmith, C.; Atkin, R.J.; Barron, A.J.; Bringaud, F.; Brooks, K.; Carrington, M.; Cherevach, I.; Chillingworth, T.J.; Churcher, C.; Clark, L.N.; Corton, C.H.; Cronin, A.; Davies, R.M.; Doggett, J.; Djikeng, A.; Feldblyum, T.; Field, M.C.; Fraser, A.; Goodhead, I.; Hance, Z.; Harper, D.; Harris, B.R.; Hauser, H.; Hostetler, J.; Ivens, A.; Jagels, K.; Johnson, D.; Johnson, J.; Jones, K.; Kerhornou, A.X.; Koo, H.; Larke, N.; Landfear, S.; Larkin, C.; Leech, V.; Line, A.; Lord, A.; Macleod, A.; Mooney, P.J.; Moule, S.; Martin, D.M.; Morgan, G.W.; Mungall, K.; Norbertczak, H.; Ormond, D.; Pai, G.; Peacock, C.S.; Peterson, J.; Quail, M.A.; Rabbinowitsch, E.; Rajandream, M.A.; Reitter, C.; Salzberg, S.L.; Sanders, M.; Schobel, S.; Sharp, S.; Simmonds, M.; Simpson, A.J.; Tallon, L.; Turner, C.M.; Tait, A.; Tivey, A.R.; Van Aken, S.; Walker, D.; Wanless, D.; Wang, S.; White, B.; White, O.; Whitehead, S.; Woodward, J.; Wortman, J.; Adams, M.D.; Embley, T.M.; Gull, K.; Ullu, E.; Barry, J.D.; Fairlamb, A.H.; Opperdoes, F.; Barrell, B.G.; Donelson, J.E.; Hall, N.; Fraser, C.M.; Melville, S.E. y El-Sayed, N.M. (2005) *The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei*. Science 309: p. 416-22.
- Beverley, S.M.; Owens, K.L.; Showalter, M.; Griffith, C.L.; Doering, T.L.; Jones, V.C. y McNeil, M.R. (2005) *Eukaryotic UDP-galactopyranose mutase (GLF gene) in microbial and metazoal pathogens*. Eukaryot Cell 4: p. 1147-54.

- Bhattacharya, A.; Arya, R.; Clark, C.G. y Ackers, J.P. (2000) *Absence of lipophosphoglycan-like glycoconjugates in Entamoeba dispar*. Parasitology 120 (Pt 1): p. 31-5.
- Bhattacharya, A.; Prasad, R. y Sacks, D.L. (1992) *Identification and partial characterization of a lipophosphoglycan from a pathogenic strain of Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 56: p. 161-8.
- Bohringer, J.; Fischer, D.; Mosler, G. y Hengge-Aronis, R. (1995) *UDP-glucose is a potential intracellular signal molecule in the control of expression of sigma S and sigma S-dependent genes in Escherichia coli*. J Bacteriol 177: p. 413-22.
- Bonfiglio, L.; Garcia, E. y Mollerach, M. (2005) *Biochemical characterization of the pneumococcal glucose 1-phosphate uridylyltransferase (GalU) essential for capsule biosynthesis*. Curr Microbiol 51: p. 217-21.
- Bosco, M.B.; Machtey, M.; Iglesias, A.A. y Aleanzi, M. (2009) *UDPglucose pyrophosphorylase from Xanthomonas spp. Characterization of the enzyme kinetics, structure and inactivation related to oligomeric dissociation*. Biochimie 91: p. 204-13.
- Bourassa, S.; Gauthier, L.; Giguere, R. y Vadeboncoeur, C. (1990) *A IIIman protein is involved in the transport of glucose, mannose and fructose by oral streptococci*. Oral Microbiol Immunol 5: p. 288-97.
- Bowden, G.H. y Hamilton, I.R. (1998) *Survival of oral bacteria*. Crit Rev Oral Biol Med 9: p. 54-85.
- Bowie, J.U.; Luthy, R. y Eisenberg, D. (1991) *A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure*. Science 253: p. 164-70.
- Bradford, M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem 72: p. 248-54.
- Bredeston, L.M.; Caffaro, C.E.; Samuelson, J. y Hirschberg, C.B. (2005) *Golgi and endoplasmic reticulum functions take place in different subcellular compartments of Entamoeba histolytica*. J Biol Chem 280: p. 32168-76.
- Bruchhaus, I.; Richter, S. y Tannich, E. (1997) *Removal of hydrogen peroxide by the 29 kDa protein of Entamoeba histolytica*. Biochem J 326 (Pt 3): p. 785-9.
- Bruchhaus, I.; Richter, S. y Tannich, E. (1998) *Recombinant expression and biochemical characterization of an NADPH:flavin oxidoreductase from Entamoeba histolytica*. Biochem J 330 (Pt 3): p. 1217-21.
- Bruchhaus, I. y Tannich, E. (1994) *Induction of the iron-containing superoxide dismutase in Entamoeba histolytica by a superoxide anion-generating system or by iron chelation*. Mol Biochem Parasitol 67: p. 281-8.
- Buchanan, B.B. y Balmer, Y. (2005) *Redox regulation: a broadening horizon*. Annu Rev Plant Biol 56: p. 187-220.
- Campbell, N.A. (1996) *Biology*. Benjamin Cummings, Nueva York.
- Caputto, R.; Leloir, L.F.; Cardini, C.E. y Paladini, A.C. (1950) *Isolation of the coenzyme of the galactose phosphate-glucose phosphate transformation*. J Biol Chem 184: p. 333-50.
- Carlsson, J. (1968) *A numerical taxonomic study of human oral streptococci*. Odontol Revy 19: p. 137-60.
- Carlsson, J. y Griffith, C.J. (1974) *Fermentation products and bacterial yields in glucose-limited and nitrogen-limited cultures of streptococci*. Arch Oral Biol 19: p. 1105-9.

- Cazzulo, J.J.; Franke de Cazzulo, B.M.; Engel, J.C. y Cannata, J.J. (1985) *End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids*. Mol Biochem Parasitol 16: p. 329-43.
- Clark, C.; Cantellano, M. y Bhattacharya, A. (2000) *Entamoeba histolytica: an overview of the biology of the organism*. En: *Amebiasis*. (Eds: JI, R.). Imperial College Press, London, UK, p. 1-46.
- Curtis, H.; Barnes, N.S.; Schnek, A. y Massarini, A. (2008) *Biología*. Edit. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Chang, H.Y.; Huang, H.C.; Lee, J.H. y Peng, H.L. (1999) *Characterization of a putative Pseudomonas UDPglucose pyrophosphorylase*. Proc Natl Sci Counc Repub China B 23: p. 74-84.
- Cheng, X.J.; Yoshihara, E.; Takeuchi, T. y Tachibana, H. (2004) *Molecular characterization of peroxiredoxin from Entamoeba moshkovskii and a comparison with Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 138: p. 195-203.
- Chorpenning, F.W.; Cooper, H.R. y Rosen, S. (1975) *Cross-reactions of Streptococcus mutans due to cell wall teichoic acid*. Infect Immun 12: p. 586-91.
- Daran, J.M.; Dallies, N.; Thines-Sempoux, D.; Paquet, V. y Francois, J. (1995) *Genetic and biochemical characterization of the UGP1 gene encoding the UDP-glucose pyrophosphorylase from Saccharomyces cerevisiae*. Eur J Biochem 233: p. 520-30.
- de Jesus, A.R.; Cooper, R.; Espinosa, M.; Gomes, J.E.; Garcia, E.S.; Paul, S. y Cross, G.A. (1993) *Gene deletion suggests a role for Trypanosoma cruzi surface glycoprotein GP72 in the insect and mammalian stages of the life cycle*. J Cell Sci 106 (Pt 4): p. 1023-33.
- Diamond, L.S.; Harlow, D.R. y Cunnick, C.C. (1978) *A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba*. Trans R Soc Trop Med Hyg 72: p. 431-2.
- Drucker, D.B. y Melville, T.H. (1968) *Fermentation end-products of cariogenic and non-cariogenic streptococci*. Arch Oral Biol 13: p. 565-70.
- Ebisu, S.; Kato, K.; Kotani, S. y Misaki, A. (1975) *Structural differences in fructans elaborated by streptococcus mutans and Strep. salivarius*. J Biochem 78: p. 879-87.
- El-Sayed, N.M.; Myler, P.J.; Bartholomeu, D.C.; Nilsson, D.; Aggarwal, G.; Tran, A.N.; Ghedin, E.; Worthey, E.A.; Delcher, A.L.; Blandin, G.; Westenberger, S.J.; Caler, E.; Cerqueira, G.C.; Branche, C.; Haas, B.; Anupama, A.; Arner, E.; Aslund, L.; Attipoe, P.; Bontempi, E.; Bringaud, F.; Burton, P.; Cadag, E.; Campbell, D.A.; Carrington, M.; Crabtree, J.; Darban, H.; da Silveira, J.F.; de Jong, P.; Edwards, K.; Englund, P.T.; Fazelina, G.; Feldblyum, T.; Ferella, M.; Frasch, A.C.; Gull, K.; Horn, D.; Hou, L.; Huang, Y.; Kindlund, E.; Klingbeil, M.; Kluge, S.; Koo, H.; Lacerda, D.; Levin, M.J.; Lorenzi, H.; Louie, T.; Machado, C.R.; McCulloch, R.; McKenna, A.; Mizuno, Y.; Mottram, J.C.; Nelson, S.; Ochaya, S.; Osoegawa, K.; Pai, G.; Parsons, M.; Pentony, M.; Pettersson, U.; Pop, M.; Ramirez, J.L.; Rinta, J.; Robertson, L.; Salzberg, S.L.; Sanchez, D.O.; Seyler, A.; Sharma, R.; Shetty, J.; Simpson, A.J.; Sisk, E.; Tammi, M.T.; Tarleton, R.; Teixeira, S.; Van Aken, S.; Vogt, C.; Ward, P.N.; Wickstead, B.; Wortman, J.; White, O.; Fraser, C.M.; Stuart, K.D. y Andersson, B. (2005) *The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease*. Science 309: p. 409-15.

- Escalante, A.; Wacher-Rodarte, C.; Garcia-Garibay, M. y Farres, A. (1998) *Enzymes involved in carbohydrate metabolism and their role on exopolysaccharide production in Streptococcus thermophilus*. J Appl Microbiol 84: p. 108-14.
- Espinosa-Cantellano, M. y Martinez-Palomo, A. (2000) *Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease*. Clin Microbiol Rev 13: p. 318-31.
- Fahey, R.C.; Newton, G.L.; Arrick, B.; Overdank-Bogart, T. y Aley, S.B. (1984) *Entamoeba histolytica: a eukaryote without glutathione metabolism*. Science 224: p. 70-2.
- Fairlamb, A.H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B.T. y Cerami, A. (1985) *Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids*. Science 227: p. 1485-7.
- Fairlamb, A.H. y Cerami, A. (1992) *Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida*. Annu Rev Microbiol 46: p. 695-729.
- Finegold, S.M.; Flora, D.J.; Attebery, H.R. y Sutter, V.L. (1975) *Fecal bacteriology of colonic polyp patients and control patients*. Cancer Res 35: p. 3407-17.
- Flores-Diaz, M.; Alape-Giron, A.; Persson, B.; Pollesello, P.; Moos, M.; von Eichel-Streiber, C.; Thelestam, M. y Florin, I. (1997) *Cellular UDP-glucose deficiency caused by a single point mutation in the UDP-glucose pyrophosphorylase gene*. J Biol Chem 272: p. 23784-91.
- Foster, M.W.; Hess, D.T. y Stamler, J.S. (2009) *Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective*. Trends Mol Med 15: p. 391-404.
- Frey, P.A. (1996) *The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose*. Faseb J 10: p. 461-70.
- Fu, Y.; Ballicora, M.A.; Leykam, J.F. y Preiss, J. (1998) *Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase*. J Biol Chem 273: p. 25045-52.
- Fukasawa, T.; Jokura, K. y Kurahashi, K. (1962) *A new enzymic defect of galactose metabolism in Escherichia coli K-12 mutants*. Biochem Biophys Res Commun 7: p. 121-5.
- Fusari, C.; Demonte, A.M.; Figueroa, C.M.; Aleanzi, M. y Iglesias, A.A. (2006) *A colorimetric method for the assay of ADP-glucose pyrophosphorylase*. Anal Biochem 352: p. 145-7.
- Gardiol, A. y Preiss, J. (1990) *Escherichia coli E-39 ADPglucose synthetase has different activation kinetics from the wild-type allosteric enzyme*. Arch Biochem Biophys 280: p. 175-80.
- Geisler, M.; Wilczynska, M.; Karpinski, S. y Kleczkowski, L.A. (2004) *Toward a blueprint for UDP-glucose pyrophosphorylase structure/function properties: homology-modeling analyses*. Plant Mol Biol 56: p. 783-94.
- Genevaux, P.; Bauda, P.; DuBow, M.S. y Oudega, B. (1999) *Identification of Tn10 insertions in the rfaG, rfaP, and galU genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect Escherichia coli adhesion*. Arch Microbiol 172: p. 1-8.
- Gerstein, M.; Lesk, A.M. y Chothia, C. (1994) *Structural mechanisms for domain movements in proteins*. Biochemistry 33: p. 6739-49.
- Ghosh, H.P. y Preiss, J. (1966) *Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase. A regulatory enzyme in the biosynthesis of starch in spinach leaf chloroplasts*. J Biol Chem 241: p. 4491-504.
- Giaever, H.M.; Styrvold, O.B.; Kaasen, I. y Strom, A.R. (1988) *Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in Escherichia coli*. J Bacteriol 170: p. 2841-9.

- Gibbons, R.J.; Berman, K.S.; Knoettner, P. y Kapsimalis, B. (1966) *Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin*. Arch Oral Biol 11: p. 549-60.
- Gibeaut, D. (2000) *Nucleotide sugars and glycosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides*. Plant Physiol. Biochem. 38: p. 69-80.
- Giroux, M.J.; Shaw, J.; Barry, G.; Cobb, B.G.; Greene, T.; Okita, T. y Hannah, L.C. (1996) *A single mutation that increases maize seed weight*. Proc Natl Acad Sci U S A 93: p. 5824-9.
- Gomez, M.L.; Erijman, L.; Arauzo, S.; Torres, H.N. y Tellez-Inon, M.T. (1989) *Protein kinase C in Trypanosoma cruzi epimastigote forms: partial purification and characterization*. Mol Biochem Parasitol 36: p. 101-8.
- Guerrero, S.A.; Montemartini, M.; Spallek, R.; Hecht, H.J.; Steinert, P.; Flohe, L. y Singh, M. (2000) *Cloning and expression of tryparedoxin I from Crithidia fasciculata*. Biofactors 11: p. 67-9.
- Guha-Nijoyi, A.; Sullivan, D.R. y Turco, S.J. (2001) *Glycoconjugate structures of parasitic protozoas* Glycobiology 11: p. 45-59.
- Gupta, S.K.; Sowokinos, J.R. y Hahn, I.S. (2008) *Regulation of UDP-glucose pyrophosphorylase isozyme UGP5 associated with cold-sweetening resistance in potatoes*. J Plant Physiol 165: p. 679-90.
- Hall-Stoodley, L.; Costerton, J.W. y Stoodley, P. (2004) *Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases*. Nat Rev Microbiol 2: p. 95-108.
- Hamada, S.; Masuda, N.; Ooshima, T.; Sobue, S. y Kotani, S. (1976) *Epidemiological survey of Streptococcus mutans among Japanese children. Identification and serological typing of the isolated strains*. Jpn J Microbiol 20: p. 33-44.
- Hamada, S. y Slade, H.D. (1980) *Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 44: p. 331-84.
- Hamilton, I.R. y G.C.Y.Lo (1978) *Co-induction of b-galactosidase and lactose-P-enolpyruvate phosphotransferase system in S. salivarius and S. mutans*. J. Bacteriol 136: p. 900-908.
- Hausler, T.; Stierhof, Y.D.; Blattner, J. y Clayton, C. (1997) *Conservation of mitochondrial targeting sequence function in mitochondrial and hydrogenosomal proteins from the early-branching eukaryotes Crithidia, Trypanosoma and Trichomonas*. Eur J Cell Biol 73: p. 240-51.
- Haynes, P.A.; Ferguson, M.A. y Cross, G.A. (1996) *Structural characterization of novel oligosaccharides of cell-surface glycoproteins of Trypanosoma cruzi*. Glycobiology 6: p. 869-78.
- Helenius, A. y Aebi, M. (2004) *Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum*. Annu Rev Biochem 73: p. 1019-49.
- Hess, D.T.; Matsumoto, A.; Kim, S.O.; Marshall, H.E. y Stamler, J.S. (2005) *Protein S-nitrosylation: purview and parameters*. Nat Rev Mol Cell Biol 6: p. 150-66.
- Higuchi, R.; Krummel, B. y Saiki, R.K. (1988) *A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions*. Nucleic Acids Res 16: p. 7351-67.
- Higuita, J.C.; Alape-Giron, A.; Thelestam, M. y Katz, A. (2003) *A point mutation in the UDP-glucose pyrophosphorylase gene results in decreases of UDP-glucose and inactivation of glycogen synthase*. Biochem J 370: p. 995-1001.
- Hillebrand, H.; Schmidt, A. y Krauth-Siegel, R.L. (2003) *A second class of peroxidases linked to the trypanothione metabolism*. J Biol Chem 278: p. 6809-15.
- Hirschberg, C.B. y Snider, M.D. (1987) *Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus*. Annu Rev Biochem 56: p. 63-87.

- Hoare, C.A. (1972) *The Trypanosomes of Mammals*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Horton, R.H.; Moran, L.A.; Ochs, R.S.; Rawn, D.J. y Scrimgeour, K.G. (1995) *Bioquímica*. Prentice-Hall Hispanoamérica, Naucalpan de Juárez, México.
- Hossain, S.; Tanizawa, K.; Kazuta, Y. y Fukui, T. (1994) *Overproduction and characterization of recombinant UDP-glucose pyrophosphorylase from Escherichia coli K-12*. J Biochem 115: p. 965-972.
- Huber, G.; Van Houte, J. y Edelstein, S. (1977) *Relationship between the populations of Streptococcus mutans in the mouth and feces of conventional Sprague-Dawley rats*. J Dent Res 56: p. 1614-9.
- Huis in 't Veld, J.H. y Backer Dirks, O. (1978) *Intracellular polysaccharide metabolism in Streptococcus mutans*. Caries Res 12: p. 243-9.
- Humphrey, W.; Dalke, A. y Schulten, K. (1996) *VMD: visual molecular dynamics*. J Mol Graph 14: p. 33-8, 27-8.
- Iglesias, A.A.; Barry, G.F.; Meyer, C.; Bloksberg, L.; Nakata, P.A.; Greene, T.; Laughlin, M.J.; Okita, T.W.; Kishore, G.M. y Preiss, J. (1993) *Expression of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase in Escherichia coli*. J Biol Chem 268: p. 1081-6.
- Ivens, A.C.; Peacock, C.S.; Worthey, E.A.; Murphy, L.; Aggarwal, G.; Berriman, M.; Sisk, E.; Rajandream, M.A.; Adlem, E.; Aert, R.; Anupama, A.; Apostolou, Z.; Attipoe, P.; Bason, N.; Bauser, C.; Beck, A.; Beverley, S.M.; Bianchetti, G.; Borzym, K.; Bothe, G.; Bruschi, C.V.; Collins, M.; Cadag, E.; Ciarloni, L.; Clayton, C.; Coulson, R.M.; Cronin, A.; Cruz, A.K.; Davies, R.M.; De Gaudenzi, J.; Dobson, D.E.; Duesterhoeft, A.; Fazelina, G.; Fosker, N.; Frasch, A.C.; Fraser, A.; Fuchs, M.; Gabel, C.; Goble, A.; Goffeau, A.; Harris, D.; Hertz-Fowler, C.; Hilbert, H.; Horn, D.; Huang, Y.; Klages, S.; Knights, A.; Kube, M.; Larke, N.; Litvin, L.; Lord, A.; Louie, T.; Marra, M.; Masuy, D.; Matthews, K.; Michaeli, S.; Mottram, J.C.; Muller-Auer, S.; Munden, H.; Nelson, S.; Norbertczak, H.; Oliver, K.; O'Neil, S.; Pentony, M.; Pohl, T.M.; Price, C.; Purnelle, B.; Quail, M.A.; Rabbinowitsch, E.; Reinhardt, R.; Rieger, M.; Rinta, J.; Robben, J.; Robertson, L.; Ruiz, J.C.; Rutter, S.; Saunders, D.; Schafer, M.; Schein, J.; Schwartz, D.C.; Seeger, K.; Seyler, A.; Sharp, S.; Shin, H.; Sivam, D.; Squares, R.; Squares, S.; Tosato, V.; Vogt, C.; Volckaert, G.; Wambutt, R.; Warren, T.; Wedler, H.; Woodward, J.; Zhou, S.; Zimmermann, W.; Smith, D.F.; Blackwell, J.M.; Stuart, K.D.; Barrell, B. y Myler, P.J. (2005) *The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major*. Science 309: p. 436-42.
- Kang, J.G.; Paget, M.S.; Seok, Y.J.; Hahn, M.Y.; Bae, J.B.; Hahn, J.S.; Kleanthous, C.; Buttner, M.J. y Roe, J.H. (1999) *RsrA, an anti-sigma factor regulated by redox change*. Embo J 18: p. 4292-8.
- Katz, U.; Ankri, S.; Stolarsky, T.; Nuchamowitz, Y. y Mirelman, D. (2002) *Entamoeba histolytica expressing a dominant negative N-truncated light subunit of its galactin are less virulent*. Mol Biol Cell 13: p. 4256-65.
- Kiska, D.L. y Macrina, F.L. (1994) *Genetic regulation of fructosyltransferase in Streptococcus mutans*. Infect Immun 62: p. 1241-51.
- Kleczkowski, L. (1994) *Glucose activation and metabolism through UDP-glucose pyrophosphorylase in plants*. Phytochemistry 37: p. 1507-1515.
- Kleczkowski, L.A.; Geisler, M.; Ciereszko, I. y Johansson, H. (2004) *UDP-glucose pyrophosphorylase. An old protein with new tricks*. Plant Physiol 134: p. 912-8.

- Koch, K.E. (1996) *Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: p. 509-540.
- Krauth-Siegel, R.L. y Comini, M.A. (2008) *Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism*. Biochim Biophys Acta 1780: p. 1236-48.
- Kreier, J.P. y Baker, J.R. (1987) *Parasitic protozoa*. Allen and Unwin, Boston, Massachusetts.
- Krieg, N.; Holt, J.; Sneath, P.; Staley, J. y Williams, S. (1984) *Bergey's manual of systematic Bacteriology.*, Baltimore.
- Kucik, C.J.; Martin, G.L. y Sortor, B.V. (2004) *Common intestinal parasites*. Am Fam Physician 69: p. 1161-8.
- Kuramitsu, H.K. (1993) *Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics*. Crit Rev Oral Biol Med 4: p. 159-76.
- Laemmli, U.K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227: p. 680-5.
- Lamerz, A.C.; Haselhorst, T.; Bergfeld, A.K.; von Itzstein, M. y Gerardy-Schahn, R. (2006) *Molecular cloning of the Leishmania major UDP-glucose pyrophosphorylase, functional characterization, and ligand binding analyses using NMR spectroscopy*. J Biol Chem 281: p. 16314-22.
- Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S. y Thornton, J.M. (1993) *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures*. J Appl Crystallogr 26: p. 283-291.
- Lee, S.F.; Progulsk-Fox, A.; Erdos, G.W.; Piacentini, D.A.; Ayakawa, G.Y.; Crowley, P.J. y Bleiweis, A.S. (1989) *Construction and characterization of isogenic mutants of Streptococcus mutans deficient in major surface protein antigen PI (I/II)*. Infect Immun 57: p. 3306-13.
- Lehninger, A.; Nelson, D. y Cox, M. (2006) *Principios de Bioquímica*. Omega.
- Leloir, L.F. (1951) *The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative*. Arch Biochem 33: p. 186-90.
- Leloir, L.F. (1971) *Two decades of research on the biosynthesis of saccharides*. Science 172: p. 1299-303.
- Lennox, H.A.; Karcz, D.A.; Tales, H. y El Masri, M. (2007) *Chagas disease: clinical overview and implications for nursing*. Medsurg Nurs 16: p. 229-35; quiz 236.
- Li, Y. y Burne, R.A. (2001) *Regulation of the *gtfBC* and *ftf* genes of Streptococcus mutans in biofilms in response to pH and carbohydrate*. Microbiology 147: p. 2841-8.
- Lobelle-Rich, P. y Reeves, R.E. (1982) *Galactose-1-phosphate uridylyltransferase from Entamoeba histolytica*. Methods Enzymol 90 Pt E: p. 552-5.
- Lobelle-Rich, P.A. y Reeves, R.E. (1983) *Separation and characterization of two UTP-utilizing hexose phosphate uridylyltransferases from Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 7: p. 173-82.
- Loesche, W.J. (1986) *Role of Streptococcus mutans in human dental decay*. Microbiol Rev 50: p. 353-80.
- Loesche, W.J. (1996) *Microbiology of Dental Decay and Periodontal Disease*. En: *Baron's Medical Microbiology*. Univ of Texas Medical Branch.
- Loferer, H.; Wunderlich, M.; Hennecke, H. y Glockshuber, R. (1995) *A bacterial thioredoxin-like protein that is exposed to the periplasm has redox properties comparable with those of cytoplasmic thioredoxins*. J Biol Chem 270: p. 26178-83.

- Long, L.W. y Edwards, J.R. (1972) *Detailed structure of a dextran from a cariogenic bacterium*. Carbohydr Res 24: p. 216-7.
- Lowther, W.T.; Brot, N.; Weissbach, H.; Honek, J.F. y Matthews, B.W. (2000) *Thiol-disulfide exchange is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase*. Proc Natl Acad Sci U S A 97: p. 6463-8.
- Lucke, S.; Klockner, T.; Palfi, Z.; Boshart, M. y Bindereif, A. (1997) *Trans mRNA splicing in trypanosomes: cloning and analysis of a PRP8-homologous gene from Trypanosoma brucei provides evidence for a U5-analogous RNP*. Embo J 16: p. 4433-40.
- Luthy, R.; Bowie, J.U. y Eisenberg, D. (1992) *Assessment of protein models with three-dimensional profiles*. Nature 356: p. 83-5.
- MacRae, J.I.; Obado, S.O.; Turnock, D.C.; Roper, J.R.; Kierans, M.; Kelly, J.M. y Ferguson, M.A. (2006) *The suppression of galactose metabolism in Trypanosoma cruzi epimastigotes causes changes in cell surface molecular architecture and cell morphology*. Mol Biochem Parasitol 147: p. 126-36.
- Marshall, A.J. y Williams, W.D. (1985) *Zoología Invertebrados*. Editorial Reverté
- Martz, F.; Wilczynska, M. y Kleczkowski, L.A. (2002) *Oligomerization status, with the monomer as active species, defines catalytic efficiency of UDP-glucose pyrophosphorylase*. Biochem J 367: p. 295-300.
- Matthews, K.R. (2005) *The developmental cell biology of Trypanosoma brucei*. J Cell Sci 118: p. 283-90.
- Mazzucco, A.; Benchimol, M. y De Souza, W. (1997) *Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in Entamoeba*. Micron 28: p. 241-7.
- McCoy, J.G.; Bitto, E.; Bingman, C.A.; Wesenberg, G.E.; Bannen, R.M.; Kondrashov, D.A. y Phillips, G.N., Jr. (2007) *Structure and dynamics of UDP-glucose pyrophosphorylase from Arabidopsis thaliana with bound UDP-glucose and UTP*. J Mol Biol 366: p. 830-41.
- McCoy, J.J.; Mann, B.J.; Vedvick, T.S.; Pak, Y.; Heimark, D.B. y Petri, W.A., Jr. (1993a) *Structural analysis of the light subunit of the Entamoeba histolytica galactose-specific adherence lectin*. J Biol Chem 268: p. 24223-31.
- McCoy, J.J.; Mann, B.J.; Vedvick, T.S. y Petri, W.A., Jr. (1993b) *Sequence analysis of genes encoding the light subunit of the Entamoeba histolytica galactose-specific adhesin*. Mol Biochem Parasitol 61: p. 325-8.
- McLaughlin, J. y Aley, S. (1985) *The biochemistry and functional morphology of the Entamoeba*. J Protozool 32: p. 221-40.
- Mendonca-Previato, L.; Todeschini, A.R.; Heise, N. y Previato, J.O. (2005) *Protozoan parasite-specific carbohydrate structures*. Curr Opin Struct Biol 15: p. 499-505.
- Mertens, E. (1993) *ATP versus pyrophosphate: glycolysis revisited in parasitic protists*. Parasitol Today 9: p. 122-6.
- Meyer, Y.; Buchanan, B.B.; Vignols, F. y Reichheld, J.P. (2009) *Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology*. Annu Rev Genet 43: p. 335-67.
- Michels, P.A.; Bringaud, F.; Herman, M. y Hannaert, V. (2006) *Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids*. Biochim Biophys Acta 1763: p. 1463-77.
- Mizanur, R. y Pohl, N. (2008) *A thermostable promiscuous glucose-1-phosphate uridylyltransferase from Helicobacter pylori for the synthesis of nucleotide sugars*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 50: p. 13-19.

- Mizanur, R.M.; Jaipuri, F.A. y Pohl, N.L. (2005) *One-step synthesis of labeled sugar nucleotides for protein O-GlcNAc modification studies by chemical function analysis of an archaeal protein*. J Am Chem Soc 127: p. 836-7.
- Mollerach, M. y Garcia, E. (2000) *The galU gene of Streptococcus pneumoniae that codes for a UDP-glucose pyrophosphorylase is highly polymorphic and suitable for molecular typing and phylogenetic studies*. Gene 260: p. 77-86.
- Mollerach, M.; López, R. y E, G. (1998) *Characterization of the galU gene of Streptococcus pneumoniae encoding a uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase: a gene essential for capsular polysaccharide biosynthesis*. J Exp Med 188: p. 2047-2056.
- Moody-Haupt, S.; Patterson, J.H.; Mirelman, D. y McConville, M.J. (2000) *The major surface antigens of Entamoeba histolytica trophozoites are GPI-anchored proteophosphoglycans*. J Mol Biol 297: p. 409-20.
- Moody, S.; Becker, S.; Nuchamowitz, Y. y Mirelman, D. (1997) *Virulent and avirulent Entamoeba histolytica and E. dispar differ in their cell surface phosphorylated glycolipids*. Parasitology 114 (Pt 2): p. 95-104.
- Nagamune, K.; Acosta-Serrano, A.; Uemura, H.; Brun, R.; Kunz-Renggli, C.; Maeda, Y.; Ferguson, M.A. y Kinoshita, T. (2004) *Surface sialic acids taken from the host allow trypanosome survival in tsetse fly vectors*. J Exp Med 199: p. 1445-50.
- Nakae, T. y Nikaido, H. (1971) *Multiple molecular forms of uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase from Salmonella typhimurium. I. Catalytic properties of various forms*. J Biol Chem 246: p. 4386-96.
- Naula, C. y Burchmore, R. (2003) *A plethora of targets, a paucity of drugs: progress towards the development of novel chemotherapies for human African trypanosomiasis*. Expert Rev Anti Infect Ther 1: p. 157-65.
- Nelson, D. y Cox, M. (2000) *Lehninger. Principles of Biochemistry*. Worth Publisher, Inc, New York.
- Noble, E.R. y Noble, G.A. (1976) *Parasitology: the biology of animal parasites*. Lea &Febiger, Inc, Philadelphia.
- Nogoceke, E.; Gommel, D.U.; Kiess, M.; Kalisz, H.M. y Flohe, L. (1997) *A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in Crithidia fasciculata*. Biol Chem 378: p. 827-36.
- Nolan, D.P.; Geuskens, M. y Pays, E. (1999) *N-linked glycans containing linear poly-N-acetyllactosamine as sorting signals in endocytosis in Trypanosoma brucei*. Curr Biol 9: p. 1169-72.
- Obenauer, J.C.; Cantley, L.C. y Yaffe, M.B. (2003) *Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs*. Nucleic Acids Res 31: p. 3635-41.
- Ondarza, R.N.; Tamayo, E.M.; Hurtado, G.; Hernandez, E. y Iturbe, A. (1997) *Isolation and purification of glutathionyl-spermidine and trypanothione from Entamoeba histolytica*. Arch Med Res 28 Spec No: p. 73-5.
- Opperdoes, F.R. (1987) *Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes*. Annu Rev Microbiol 41: p. 127-51.
- Overath, P.; Chaudhri, M.; Steverding, D. y Ziegelbauer, K. (1994) *Invariant surface proteins in bloodstream forms of Trypanosoma brucei*. Parasitol Today 10: p. 53-8.
- Pannbacker, R.G. (1967) *Uridine diphosphoglucose biosynthesis during differentiation in the cellular slime mold. II. In vitro measurements*. Biochemistry 6: p. 1287-93.

- Parker, C.G.; Fessler, L.I.; Nelson, R.E. y Fessler, J.H. (1995) *Drosophila* UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase: sequence and characterization of an enzyme that distinguishes between denatured and native proteins. *Embo J* 14: p. 1294-303.
- Parson, M. (2004) *Glycosomes: parasites and the divergence peroxisomal purpose*. *Mol Microbiol* 53: p. 717-724.
- Pays, E. (2005) *Regulation of antigen gene expression in Trypanosoma brucei*. *Trends Parasitol* 21: p. 517-20.
- Petri, W.A., Jr. y Singh, U. (1999) *Diagnosis and management of amebiasis*. *Clin Infect Dis* 29: p. 1117-25.
- Piattoni, C.V.; Blancato, V.S.; Miglietta, H.; Iglesias, A.A. y Guerrero, S.A. (2006) *On the occurrence of thioredoxin in Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 97: p. 151-60.
- Previato, J.O.; Gorin, P.A.; Mazurek, M.; Xavier, M.T.; Fournet, B.; Wieruszkesk, J.M. y Mendonca-Previato, L. (1990) *Primary structure of the oligosaccharide chain of lipopeptidophosphoglycan of epimastigote forms of Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 265: p. 2518-26.
- Previato, J.O.; Jones, C.; Xavier, M.T.; Wait, R.; Travassos, L.R.; Parodi, A.J. y Mendonca-Previato, L. (1995) *Structural characterization of the major glycosylphosphatidylinositol membrane-anchored glycoprotein from epimastigote forms of Trypanosoma cruzi Y-strain*. *J Biol Chem* 270: p. 7241-50.
- Priebe, G.P.; Dean, C.R.; Zaidi, T.; Meluleni, G.J.; Coleman, F.T.; Coutinho, Y.S.; Noto, M.J.; Urban, T.A.; Pier, G.B. y Goldberg, J.B. (2004) *The galU Gene of Pseudomonas aeruginosa is required for corneal infection and efficient systemic spread following pneumonia but not for infection confined to the lung*. *Infect Immun* 72: p. 4224-32.
- Ravdin, J.I. (1986) *Pathogenesis of disease caused by Entamoeba histolytica: studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytolysis*. *Rev Infect Dis* 8: p. 247-60.
- Reckenfelderbaumer, N.; Ludemann, H.; Schmidt, H.; Steverding, D. y Krauth-Siegel, R.L. (2000) *Identification and functional characterization of thioredoxin from Trypanosoma brucei brucei*. *J Biol Chem* 275: p. 7547-52.
- Reeves, R.E. (1984) *Metabolism of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903*. *Adv Parasitol* 23: p. 105-42.
- Rhee, S.G. (2006) *Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling*. *Science* 312: p. 1882-3.
- Rhee, S.G.; Kang, S.W.; Jeong, W.; Chang, T.S.; Yang, K.S. y Woo, H.A. (2005) *Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins*. *Curr Opin Cell Biol* 17: p. 183-9.
- Roeben, A.; Plitzko, J.M.; Korner, R.; Bottcher, U.M.; Siegers, K.; Hayer-Hartl, M. y Bracher, A. (2006) *Structural basis for subunit assembly in UDP-glucose pyrophosphorylase from Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 364: p. 551-60.
- Roper, J.R. y Ferguson, M.A. (2003) *Cloning and characterisation of the UDP-glucose 4'-epimerase of Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 132: p. 47-53.
- Roper, J.R.; Guther, M.L.; Macrae, J.I.; Prescott, A.R.; Hallyburton, I.; Acosta-Serrano, A. y Ferguson, M.A. (2005) *The suppression of galactose metabolism in procyclic form Trypanosoma brucei causes cessation of cell growth and alters procyclin glycoprotein structure and copy number*. *J Biol Chem* 280: p. 19728-36.

- Roper, J.R.; Guther, M.L.; Milne, K.G. y Ferguson, M.A. (2002) *Galactose metabolism is essential for the African sleeping sickness parasite Trypanosoma brucei*. Proc Natl Acad Sci U S A 99: p. 5884-9.
- Russell, R.B. y Barton, G.J. (1992) *Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels*. Proteins 14: p. 309-23.
- Rutter, J.; Probst, B.L. y McKnight, S.L. (2002) *Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase*. Cell 111: p. 17-28.
- Ryan, K.J. y Ray, C.G. (2004) *Sherris Medical Microbiology*. McGraw-Hill Medical.
- Sa-Correia, I.; Fialho, A.M.; Videira, P.; Moreira, L.M.; Marques, A.R. y Albano, H. (2002) *Gellan gum biosynthesis in Sphingomonas paucimobilis ATCC 31461: genes, enzymes and exopolysaccharide production engineering*. J Ind Microbiol Biotechnol 29: p. 170-6.
- Saffer, L.D. y Petri, W.A., Jr. (1991) *Role of the galactose lectin of Entamoeba histolytica in adherence-dependent killing of mammalian cells*. Infect Immun 59: p. 4681-3.
- Sahoo, N.; Bhattacharya, S. y Bhattacharya, A. (2003) *Blocking the expression of a calcium binding protein of the protozoan parasite Entamoeba histolytica by tetracycline regulatable antisense-RNA*. Mol Biochem Parasitol 126: p. 281-4.
- Salamone, P.R.; Kavakli, I.H.; Slattery, C.J. y Okita, T.W. (2002) *Directed molecular evolution of ADP-glucose pyrophosphorylase*. Proc Natl Acad Sci U S A 99: p. 1070-5.
- Salgado, M.; Villagomez-Castro, J.C.; Rocha-Rodriguez, R.; Sabanero-Lopez, M.; Ramos, M.A.; Alagon, A.; Lopez-Romero, E. y Sanchez-Lopez, R. (2005) *Entamoeba histolytica: biochemical and molecular insights into the activities within microsomal fractions*. Exp Parasitol 110: p. 363-73.
- Sali, A. y Blundell, T.L. (1993) *Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints*. J Mol Biol 234: p. 779-815.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T.F. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schleifer, K.H. y Kandler, O. (1972) *Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications*. Bacteriol Rev 36: p. 407-77.
- Silva, E.; Marques, A.R.; Fialho, A.M.; Granja, A.T. y Sa-Correia, I. (2005) *Proteins encoded by Sphingomonas elodea ATCC 31461 rmlA and ugpG genes, involved in gellan gum biosynthesis, exhibit both dTDP- and UDP-glucose pyrophosphorylase activities*. Appl Environ Microbiol 71: p. 4703-12.
- Simonite, T. (2005) *Protists push animals aside in rule revamp*. Nature 438: p. 8-9.
- Simpson, L.; Neckelmann, N.; de la Cruz, V.F.; Simpson, A.M.; Feagin, J.E.; Jasmer, D.P. y Stuart, J.E. (1987) *Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of Leishmania tarentolae and Trypanosoma brucei at the level of nucleotide sequence*. J Biol Chem 262: p. 6182-96.
- Sivak, M. y Preiss, J. (1998) *Starch: basic science to biotechnology*. En: *Advances in food and nutrition research*. (Eds: S.L.Taylor). Academic Press, San Diego, California, p. 1-199.
- Souza, W. (2003) *Novel Cell Biology of Trypanosoma cruzi*. En: *American Trypanosomiasis World Class Parasites*. Springer, Boston, p. 13-24.
- Souza, W. (2008) *Electron microscopy of trypanosomes--a historical view*. Mem Inst Oswaldo Cruz 103: p. 313-25.

- Sowokinos, J.R. (1981) *Pyrophosphorylases in Solanum tuberosum: II. Catalytic Properties and Regulation of ADP-Glucose and UDP-Glucose Pyrophosphorylase Activities in Potatoes* Plant Physiol 68: p. 924-929.
- Spatafora, G.; Rohrer, K.; Barnard, D. y Michalek, S. (1995) *A Streptococcus mutans mutant that synthesizes elevated levels of intracellular polysaccharide is hypercariogenic in vivo*. Infect Immun 63: p. 2556-63.
- Srivastava, G.; Anand, M.T.; Bhattacharya, S. y Bhattacharya, A. (1995) *Lipophosphoglycan is present in distinctly different form in different Entamoeba histolytica strains and absent in Entamoeba moshkovskii and Entamoeba invadens*. J Eukaryot Microbiol 42: p. 617-22.
- Stanley, S.L., Jr.; Huizenga, H. y Li, E. (1992) *Isolation and partial characterization of a surface glycoconjugate of Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 50: p. 127-38.
- Stanley, S.L., Jr.; Zhang, T.; Rubin, D. y Li, E. (1995) *Role of the Entamoeba histolytica cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice*. Infect Immun 63: p. 1587-90.
- Steiner, T.; Lamerz, A.C.; Hess, P.; Breithaupt, C.; Krapp, S.; Bourenkov, G.; Huber, R.; Gerardy-Schahn, R. y Jacob, U. (2007) *Open and closed structures of the UDP-glucose pyrophosphorylase from Leishmania major*. J Biol Chem 282: p. 13003-10.
- Sturm, N.R. y Campbell, D.A. (1999) *The role of intron structures in trans-splicing and cap 4 formation for the Leishmania spliced leader RNA*. J Biol Chem 274: p. 19361-7.
- Sundararajan, T.A.; Rapin, A.M. y Kalckar, H.M. (1962) *Biochemical observations on E. coli mutants defective in uridine diphosphoglucose*. Proc Natl Acad Sci U S A 48: p. 2187-93.
- Takeuchi, T.; Weinbach, E.C. y Diamond, L.S. (1977) *Entamoeba histolytica: localization and characterization of phosphoglucomutase, uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase, and glycogen synthase*. Exp Parasitol 43: p. 115-21.
- Teixeira, S.M. (1998) *Control of gene expression in Trypanosomatidae*. Braz J Med Biol Res 31: p. 1503-16.
- Teixeira, S.M. y daRocha, W.D. (2003) *Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae*. Genet Mol Res 2: p. 148-58.
- Tekwani, B.L. y Mehlotra, R.K. (1999) *Molecular basis of defence against oxidative stress in Entamoeba histolytica and Giardia lamblia*. Microbes Infect 1: p. 385-94.
- Tetaud, E.; Barrett, M.P.; Bringaud, F. y Baltz, T. (1997) *Kinetoplastid glucose transporters*. Biochem J 325 (Pt 3): p. 569-80.
- Thoden, J.B. y Holden, H.M. (2007a) *Active site geometry of glucose-1-phosphate uridylyltransferase*. Protein Sci 16: p. 1379-88.
- Thoden, J.B. y Holden, H.M. (2007b) *The molecular architecture of glucose-1-phosphate uridylyltransferase*. Protein Sci 16: p. 432-40.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994) *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Res 22: p. 4673-80.
- Todeschini, A.R.; Dias, W.B.; Girard, M.F.; Wieruszkeski, J.M.; Mendonca-Previato, L. y Previato, J.O. (2004) *Enzymatically inactive trans-sialidase from Trypanosoma cruzi binds sialyl and beta-galactopyranosyl residues in a sequential ordered mechanism*. J Biol Chem 279: p. 5323-8.

- Todeschini, A.R.; Nunes, M.P.; Pires, R.S.; Lopes, M.F.; Previato, J.O.; Mendonca-Previato, L. y DosReis, G.A. (2002) *Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal trans-sialidase: involvement of CD43 signaling*. J Immunol 168: p. 5192-8.
- Treumann, A.; Zitzmann, N.; Hulsmeier, A.; Prescott, A.R.; Almond, A.; Sheehan, J. y Ferguson, M.A. (1997) *Structural characterisation of two forms of procyclic acidic repetitive protein expressed by procyclic forms of Trypanosoma brucei*. J Mol Biol 269: p. 529-47.
- Trissl, D. (1982) *Immunology of Entamoeba histolytica in human and animal hosts*. Rev Infect Dis 4: p. 1154-84.
- Trombetta, E.S. y Parodi, A.J. (2003) *Quality control and protein folding in the secretory pathway*. Annu Rev Cell Dev Biol 19: p. 649-76.
- Tsukioka, Y.; Yamashita, Y.; Nakano, Y.; Oho, T. y Koga, T. (1997a) *Identification of a fourth gene involved in dTDP-rhamnose synthesis in Streptococcus mutans*. J Bacteriol 179: p. 4411-4.
- Tsukioka, Y.; Yamashita, Y.; Oho, T.; Nakano, Y. y Koga, T. (1997b) *Biological function of the dTDP-rhamnose synthesis pathway in Streptococcus mutans*. J Bacteriol 179: p. 1126-34.
- Turnock, D.C. y Ferguson, M.A. (2007) *Sugar nucleotide pools of Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, and Leishmania major*. Eukaryot Cell 6: p. 1450-63.
- Vaitukaitis, J.; Robbins, J.B.; Nieschlag, E. y Ross, G.T. (1971) *A method for producing specific antisera with small doses of immunogen*. J. Clin.Endocrinol. Metab. 33: p. 988-991.
- Van Houte, J.; de Moor, C.E. y Jansen, H.M. (1970) *Synthesis of iodophilic polysaccharide by human oral streptococci*. Arch Oral Biol 15: p. 263-6.
- Van Houte, J. y Jansen, H.M. (1968) *The iodophilic polysaccharide synthesized by Streptococcus salivarius*. Caries Res 2: p. 47-56.
- van Leeuwen, F.; Kieft, R.; Cross, M. y Borst, P. (1998) *Biosynthesis and function of the modified DNA base beta-D-glucosyl-hydroxymethyluracil in Trypanosoma brucei*. Mol Cell Biol 18: p. 5643-51.
- Vassella, E.; Butikofer, P.; Engstler, M.; Jelk, J. y Roditi, I. (2003) *Procyclin null mutants of Trypanosoma brucei express free glycosylphosphatidylinositols on their surface*. Mol Biol Cell 14: p. 1308-18.
- Villar-Palasi, C. y Lerner, J. (1960) *Uridinediphosphate glucose pyrophosphorylase from skeletal muscle*. Arch Biochem Biophys 86: p. 61-6.
- Voet, D. y Voet, J. (2006) *Bioquímica*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Walsh, J.A. (1986) *Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality*. Rev Infect Dis 8: p. 228-38.
- Wassmann, C.; Hellberg, A.; Tannich, E. y Bruchhaus, I. (1999) *Metronidazole resistance in the protozoan parasite Entamoeba histolytica is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase*. J Biol Chem 274: p. 26051-6.
- Wells, L.; Whelan, S.A. y Hart, G.W. (2003) *O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification*. Biochem Biophys Res Commun 302: p. 435-41.
- Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E. y Rassi, A. (1992) *Chagas disease (American trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine*. ISBT Brazil, Sao Paulo.

- Wicken, A.J. y Knox, K.W. (1970) *Studies on the group F antigen of lactobacilli: isolation of a teichoic acid-lipid complex from Lactobacillus fermenti NCTC 6991*. J Gen Microbiol 60: p. 293-301.
- Wilkinson, S.R.; Horn, D.; Prathalingam, S.R. y Kelly, J.M. (2003) *RNA interference identifies two hydroperoxide metabolizing enzymes that are essential to the bloodstream form of the african trypanosome*. J Biol Chem 278: p. 31640-6.
- Wilkinson, S.R.; Meyer, D.J. y Kelly, J.M. (2000) *Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity*. Biochem J 352 Pt 3: p. 755-61.
- Yamashita, Y.; Tsukioka, Y.; Nakano, Y.; Tomihisa, K.; Oho, T. y Koga, T. (1998) *Biological functions of UDP-glucose synthesis in Streptococcus mutans*. Microbiology 144 (Pt 5): p. 1235-45.