



La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) como blanco molecular contra *Trypanosoma cruzi*

Estudiantes:

Br. Cabillón, Lucía

Br. Correa, Yemina

Br. De Agostini, Valeria

Br. Dotti, Belén

Br. Lopez, Noelia

Br. Massa, Michel

Br. Silva, Agustina

Orientadoras:

Dra. Corvo, Ileana

Dra. Randall, Lía

Laboratorio de I+D de Moléculas Bioactivas, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional Litoral Norte, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay.

Ciclo de Metodología Científica II – 2023

Grupo 115

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	1
RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Generalidades sobre la enfermedad de Chagas.....	3
Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	4
Tratamiento actual y sus limitaciones.....	6
La vía glucolítica: G6PDH como blanco molecular.....	7
OBJETIVOS.....	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos.....	12
METODOLOGÍA.....	13
Expresión de la proteína <i>TcG6PDH</i>	13
Purificación de <i>TcG6PDH</i>	15
Medida de actividad enzimática de la <i>TcG6PDH</i>	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
Expresión de la proteína <i>TcG6PDH</i>	20
Purificación de <i>TcG6PDH</i>	21
Medida de actividad enzimática de la <i>TcG6PDH</i>	26
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es la manifestación de la infección sistémica y crónica causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, actualmente considerada endémica en América. El tratamiento actual se basa en dos fármacos: Nifurtimox y Benznidazol. Ambos presentan una elevada toxicidad produciendo efectos secundarios severos, siendo un tratamiento complicado y poco accesible, ya que requiere de tiempos prolongados y altos costos. Por otra parte, tampoco han demostrado buena eficacia en la fase crónica y se ha evidenciado la aparición de resistencia a ambos medicamentos. Por estos motivos es de gran importancia contribuir al desarrollo de nuevos fármacos para controlar esta “enfermedad desatendida”.

En este trabajo se plantea como objetivo estudiar a la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) como blanco molecular de *T. cruzi*, ya que ésta ha mostrado, en diversos estudios, ser un factor de virulencia para las formas infectivas. Esta proteína es responsable de catalizar la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato, generando NADPH, ribosa-5-fosfato e intermediarios de la glicólisis. Por tanto, las moléculas capaces de inhibir esta enzima crucial para el metabolismo del parásito constituyen potenciales fármacos a explorar para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enfermedad de Chagas, vía de las pentosas fosfato.

INTRODUCCIÓN

Generalidades sobre la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, al igual que otras parasitosis como la tripanosomiasis africana y la leishmaniasis, pertenecen a un grupo de enfermedades causadas por microorganismos del orden *Kinetoplastea* (Irigoín *et al.*, 2008), que comparten características biológicas y estructurales como lo es la presencia del kinetoplasto, una única mitocondria que se extiende a lo largo del cuerpo del parásito (Leong *et al.*, 2023). A su vez coinciden en la compartimentalización de la vía glucolítica dentro de organelos similares a los peroxisomas llamados glicosomas (Gualdrón-López *et al.*, 2012). Constituyen algunas de las denominadas “enfermedades desatendidas”, las cuales a pesar de afectar a más de 100 millones de personas en el mundo y generar grandes pérdidas económicas debido a la alta morbilidad y discapacidad que generan, no reciben atención ni los medios económicos para lograr ser erradicadas (Andrade *et al.*, 2014). Por las características mencionadas de la enfermedad los tratamientos disponibles actualmente no son los ideales, además de que existe poco interés de la industria farmacéutica en generar nuevos fármacos más efectivos y de menores efectos adversos, ya que no brinda beneficio económico (Ortiz., 2017).

La enfermedad de Chagas es la manifestación de la infección sistémica y crónica causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, actualmente considerada endémica en América. Existen diversas formas de transmisión (congénita, transfusional o por trasplante de órganos), siendo la principal la vectorial, a través de insectos hematófagos de la familia de los triatomíneos, conocidos como vinchucas. Los mismos se asientan en viviendas precarias de barro o paja de tipo “rancho”. En nuestro país se eliminó la transmisión vectorial desde el año 1997 (Barrios *et al.*, 2015; Rosa *et al.*, 2001), permaneciendo la transmisión vertical o congénita. La transmisión congénita puede darse a través de una madre infectada de *T. cruzi*, tanto en la etapa aguda como en la etapa crónica de la infección. Al momento del nacimiento, el niño podrá presentar un cuadro clínico que se caracteriza por prematuridad, hepatoesplenomegalia, ictericia, anemia y alteraciones del sistema nervioso central, pudiendo existir también el compromiso de otros órganos (Muñoz *et al.*, 1982; Salvatella *et al.*, 2016).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden ser muy heterogéneas y varían de acuerdo a factores propios del huésped, del parásito y de la interacción huésped-parásito.

Se divide en dos fases: aguda y crónica. La fase aguda se caracteriza por presentar una elevada parasitemia, puede durar de 4 a 8 semanas. Usualmente es asintomática aunque se puede manifestar por síntomas generales como fiebre, fatiga, erupción, taquicardia, cefalea, pérdida de apetito, náusea, vómitos o diarrea (Shigihara *et al.*, 2008). También se puede observar la aparición de una lesión conocida como Chagoma, la cual es un edema palpebral unilateral y se presenta cuando la conjuntiva es la puerta de entrada para el vector (vinchuca).

Durante la fase crónica, los síntomas son el resultado de la afección de nervios craneales y periféricos, con destrucción de las células nerviosas ganglionares y otras anomalías, lo que determina alteraciones en diferentes órganos, tales como ritmo cardíaco irregular, falla cardíaca, dificultad en la deglución, dolor abdominal, constipación, entre otros (Kourbeli *et al.*, 2021). En cuanto a las manifestaciones neurológicas puede haber cambios cognitivos, convulsiones, hemiparesia y afasia (Murillo-Godinez, 2018). Se pueden desarrollar visceromegalias, y disfunción de los órganos afectados, que además de perjudicar la calidad de vida puede llegar a ser mortal para el paciente (Ortiz, 2017).

Ciclo de vida de *T. cruzi*

Trypanosoma cruzi es un parásito flagelado perteneciente a la familia de los tripanosomatídeos, incluida en el orden de los kinetoplástidos. Característicamente se destaca la presencia de una única mitocondria, ramificada, que se extiende por el cuerpo del parásito y presenta una estructura denominada kinetoplasto que corresponde a ADN compactado (Chiribao, *et al.*, 2016). El kinetoplasto se localiza cerca de la región denominada cuerpo basal, del que emerge el flagelo y presenta dos tipos de ADN, los maxicírculos y los minicírculos. También poseen un organelo tipo peroxisoma que contiene la mayoría de las enzimas de la vía glicolítica denominado glicosoma, el cual es indispensable para la supervivencia del parásito (Jackson y Bartek, 2009).

Durante su ciclo de vida *T. cruzi* pasa por diferentes estadios: epimastigote, tripomastigote metacíclico, amastigote y tripomastigote, presentando cada uno de ellos características morfológicas, estructurales y metabólicas claramente definidas (Figura 1).

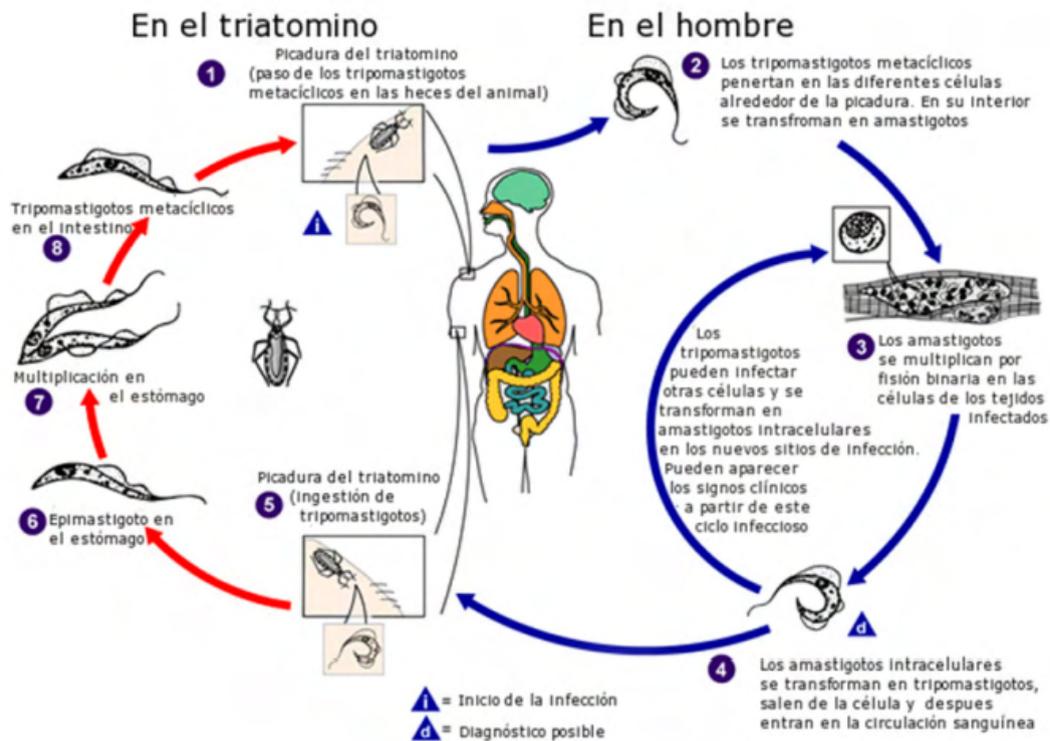


Figura 1: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* en el hombre y en la vinchuca (triatomino). Se pueden ver los diferentes estadios de *T. cruzi* y el proceso de infección en el humano. Figura tomada de (Imaz *et al.*, 2015).

El epimastigote se ubica en el tubo digestivo del insecto vector, donde prolifera para luego diferenciarse a tripomastigote metacíclico a nivel de la región posterior del intestino. Esta diferenciación implica cambios estructurales y metabólicos necesarios para permitir la invasión del hospedero, siendo este un estadio altamente infeccioso pero sin capacidad de replicarse. Luego de que el vector realiza la picadura, defeca sobre la piel del hospedero, y por acción del rascado el tripomastigote metacíclico entra a la circulación sanguínea y es capaz de invadir una gran variedad de células nucleadas. Los macrófagos juegan un rol fundamental en el transporte del parásito a otros sitios del organismo. En su interior, se diferencia al estadio amastigote, el cual es intracelular, carece de flagelo, es infeccioso y proliferativo, dividiéndose por fisión binaria. Luego de 5 días de replicación se diferencia al estadio tripomastigote el cual es flagelado, replicativo, extracelular e infeccioso (Zavala, 2014, Murillo-Godínez, 2018). Los tripomastigotes circulantes en sangre pueden ser ingeridos

cuando la vinchuca se alimenta del hospedero mamífero, cerrando así el ciclo replicativo del parásito.

Tratamiento actual y sus limitaciones

El tratamiento para la enfermedad de Chagas se basa en dos pilares: el control de la transmisión (vectorial, congénita y transfusional), y el uso de fármacos anti-tripanosomales que deriven en tratamientos costo-efectivos contra ella (Lannes-Vieira *et al.*, 2010).

A pesar de varios intentos en el desarrollo de vacunas anti-tripanosomales, hoy en día no existe una vacuna efectiva ya que estos parásitos tienen la capacidad de evadir la respuesta inmune del huésped. Por lo que el tratamiento quimioterapéutico es, actualmente, la opción disponible para enfrentar esta enfermedad (Ramponi *et al.*, 2022). Desde hace más de 60 años los fármacos que se utilizan como tratamiento son nitroheterocíclicos: Nifurtimox y Benznidazol. Estos fármacos disponibles para el manejo y control de la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis presentan baja efectividad, alta toxicidad, resistencia y múltiples efectos secundarios (Rivera *et al.*, 2022).

El Nifurtimox tiene efecto tripanosomicida sobre las formas amastigote y tripomastigote de *T. cruzi*. Su acción se relaciona con la generación de productos de reducción del oxígeno, ya que el tripanosoma posee mecanismos deficientes de detoxificación, siendo muy susceptible al estrés oxidativo. Sus efectos secundarios tienen una prevalencia en el 30% de los casos, entre ellos se encuentran: anorexia, pérdida de peso, manifestaciones gastrointestinales como dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea, además puede causar dermatitis y compromiso del SNC dado por alucinaciones, parestesias, insomnio y psicosis (Werner *et al.*, 2008).

El Benznidazol también es tripanosomicida. Como mecanismo de acción, inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas del parásito. Posee gran cantidad de efectos adversos. Dentro de los dermatológicos aparece erupción cutánea, edema generalizado, adenopatías, artralgia y mialgia; dentro de los hematológicos puede haber trombocitopenia, púrpura y hasta agranulocitosis dado por depresión de la médula ósea. Puede haber además compromiso neurológico con polineuropatía, parestesia y polineuritis periférica (Fuentes *et al.*, 2011).

Ambos medicamentos están contraindicados en el embarazo y en pacientes con insuficiencia hepática y renal. En pacientes inmunocompetentes están indicados en Chagas agudo, donde han demostrado su mayor eficacia en Chagas congénito, pediátrico y accidental. En inmunocomprometidos se debe iniciar el tratamiento de forma inmediata, sin importar en qué fase se encuentre, para detener la multiplicación parasitaria y su diseminación hacia los tejidos. Otro gran problema en el tratamiento actual de esta enfermedad es su larga duración, debiendo mantenerse por al menos 60 días, lo que influye negativamente en la adherencia al tratamiento y acarrea mayores efectos adversos (Werner *et al.*, 2008).

La vía glucolítica: G6PDH como blanco molecular

Diversos estudios indican el rol fundamental del metabolismo basado en la glucosa en *T. cruzi*, el cual constituye un blanco molecular interesante que puede ser manipulado de forma selectiva para inhibir el crecimiento del parásito. El metabolismo de la glucosa está basado en la vía glucolítica y la vía de las pentosas fosfato (Figura 2), siendo el primer paso de esta última la conversión de glucosa-6-fosfato (G6P) en 6-fosfogluconato, con la reducción de NADP⁺ a NADPH a cargo de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Núñez-Mujica, 2009).

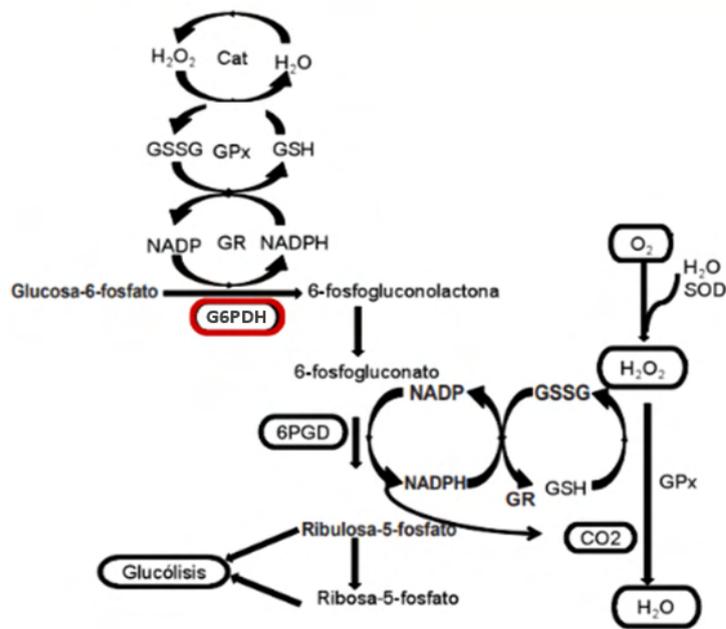


Figura 2: Vía de las pentosas fosfato. En rojo se resalta la G6PDH, enzima objeto de estudio de este trabajo. Figura modificada de (Sául, 2014).

La G6PDH está altamente regulada tanto a nivel transcripcional, traduccional como post traduccional. Comprende el nexo de muchas vías metabólicas y vías de señalización esenciales, lo cual tiene implicancias en procesos celulares tanto en condiciones de salud como de enfermedad (Stanton, 2012), (Igoillo-Esteve M, 2009).

En cuanto a su estructura (Figura 3), se trata de una proteína homodimérica que se encuentra en un equilibrio monómero-dímero-tetrámero, altamente dinámico que depende de las condiciones de pH, fuerza iónica del medio, sustratos y productos. A pH básico y fuerza iónica elevada se encuentra en forma de dímero mientras que a pH más ácido y fuerza iónica baja el equilibrio se desplaza hacia el tetrámero. El monómero es inactivo y presenta un peso molecular de 59 kDa (Au *et al.*, 2000).

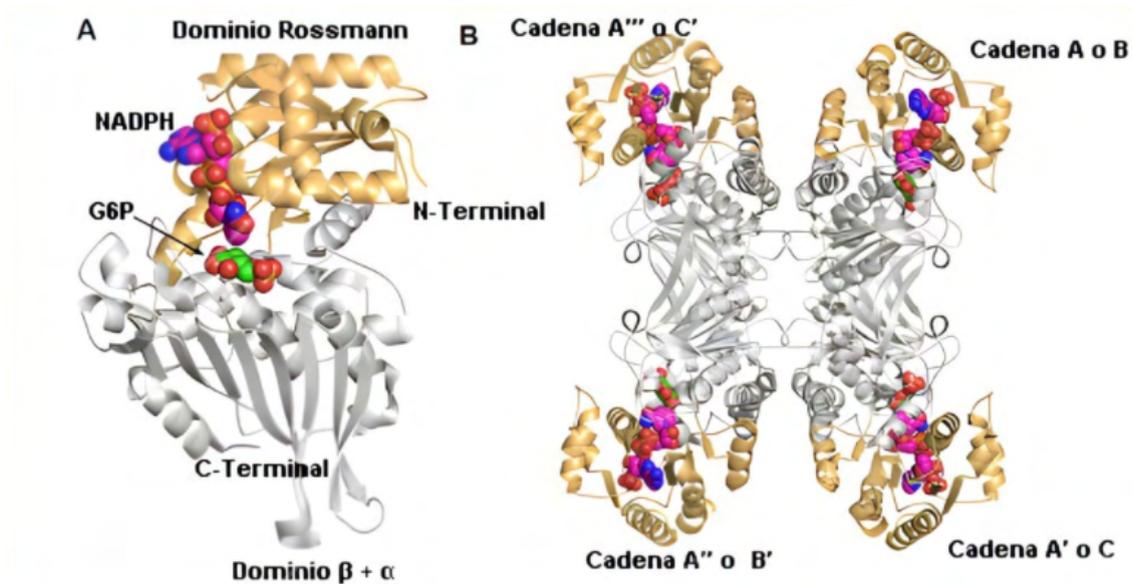


Figura 3: Enzima G6PDH de *Trypanosoma cruzi* (*TcG6PDH*). Imagen extraída de *Mercaldi et al., 2016*. En **A** se muestra la estructura del monómero y los sitios de unión a G6P y NADPH. En **B** se muestra la estructura del tetrámero.

La primera estructura cristalina de la G6PDH se obtuvo a partir del microorganismo *L. mesenteroides*, la cual inicialmente sirvió de base para el modelado de la estructura tridimensional de las enzimas de otros organismos, contribuyendo a su mejor estudio (Naylor *et al.*, 2001). Se halla descrita y cristalizada la G6PDH humana, tanto en complejo con la G6P como con el NADP⁺ (Au *et al.* 2000). En cuanto a la G6PDH de *T. cruzi*, se ha encontrado que existen diferencias estructurales entre la enzima humana y la del parásito, sugiriendo que sería posible diseñar inhibidores específicos que interfieran con la actividad de la enzima de *T. cruzi* pero no la humana. Una diferencia crucial se encuentra en el sitio catalítico, donde el NADP⁺ se une al dominio de tipo Rossmann formando enlaces de hidrógeno que modifican la estructura cuaternaria de la enzima. La G6PDH de *T. cruzi* presenta una modificación estructural en el dominio F191 que lleva a la formación de una cavidad conteniendo principalmente átomos apolares. Esta cavidad no está presente en ninguna proteína humana que posea interacción del NADP⁺ con el sitio de tipo Rossmann, por lo que esta variación estructural en la enzima de *T. cruzi* puede facilitar el descubrimiento de inhibidores específicos para *TcG6PDH* (Mercaldi *et al.*, 2016).

Se ha utilizado a la G6PDH como blanco molecular para la búsqueda de inhibidores que constituyen potenciales fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (Ortiz *et al.*, 2021). En estudios previos se ha reportado afinidad alostérica de la G6PDH por moléculas esteroideas (Gupta *et al.*, 2010). Entre ellas, la epiandrosterona (EA), una molécula conocida anteriormente por su afinidad a la G6PDH humana, demostró tener afinidad también por la enzima de *T. cruzi* (Cordeiro *et al.*, 2009). Tanto la EA como la dihidroepiandrosterona (DHEA) se unen a un bolsillo molecular próximo al sitio activo de la enzima, interfiriendo con la unión de NADP⁺ y G6P a dicho sitio, impidiendo así la formación de NADPH y 6-fosfogluconato. Se comprobó que haciendo modificaciones en algunas posiciones moleculares en EA y DHEA se afecta la selectividad y la afinidad de las moléculas por la enzima parasitaria, resultando en derivados de estos esteroides tales como 16 α -BrEA y 16 α -BrDHEA con mayor actividad inhibitoria contra la enzima del parásito, y mayor selectividad hacia dicha enzima en relación con la enzima humana (Ortiz *et al.*, 2021). En la misma línea de investigación Naciuk y colaboradores (Naciuk *et al.*, 2020) demostraron, utilizando 26 derivados de la EA, que 17 de estos compuestos presentan selectividad mayor por la TcG6PDH que por la enzima humana. Tres de estos compuestos fueron efectivos contra las formas intracelulares del parásito, siendo indicios alentadores de que estas moléculas podrían matar al parásito en la etapa crónica de la enfermedad.

En un trabajo previo realizado en el Laboratorio de Moléculas Bioactivas, se sintetizaron compuestos simples con potencial antiparasitario a partir de estructuras que derivan de esteroides naturales (Aguilera *et al.*, 2019). En ese trabajo se estudió una serie de diecinueve arilidenocetonas esteroidales y tiazolidenohidracinas, evaluando su actividad biológica contra *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis* y *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*. Se reportaron 6 moléculas activas contra los parásitos. El derivado más activo, el compuesto 1260 (Figura 4), mostró IC₅₀ de 1,2 y 0,2 μ M en el ensayo *in vitro* con *T. cruzi* y *L. infantum* en cultivo, respectivamente. Asimismo, mostró actividad similar al Benznidazole y la Miltefosina en modelos *in vivo* en ratones de la enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis cutánea, observándose un 60 % de reducción de la infección al ser administrado a una dosis de 50 mg/kg. Este compuesto mostró también una baja toxicidad, buen índice de selectividad y ausencia de efectos genotóxicos, por lo que resulta un compuesto prometedor para el desarrollo de fármacos antitripanosomatídeos (Aguilera *et al.*, 2019).

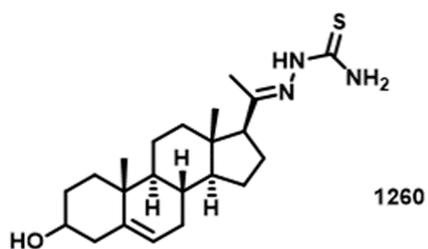


Figura 4: Estructura del compuesto 1260. Compuesto sintetizado a partir de estructuras que derivan de esteroides naturales.

En base a los antecedentes descritos anteriormente donde se detecta actividad inhibitoria de compuestos derivados de esteroides sobre la enzima G6PDH de *T. cruzi* (Ortiz *et al.*, 2021), en este trabajo se plantea expresar y purificar la enzima recombinante para evaluar si el compuesto 1260 y otros derivados activos de la familia de los esteroides sintetizados en el Laboratorio de Moléculas Bioactivas, son capaces de inhibir esta enzima, buscando contribuir a la elucidación del mecanismo de acción antiparasitario de estos compuestos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Optimizar el ensayo de actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) para ser utilizada como blanco molecular para el descubrimiento de fármacos contra *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos específicos

- Poner a punto en el laboratorio la expresión de la enzima *TcG6PDH* recombinante en *E. coli*.
- Purificar la enzima *TcG6PDH* mediante técnicas cromatográficas.
- Corroborar la actividad enzimática de la *TcG6PDH in vitro*.
- Evaluar la actividad de la *TcG6PDH* en presencia de compuestos derivados de esteroides que mostraron actividad *in vitro* contra epimastigotes de *T. cruzi*.

METODOLOGÍA

Amortiguadores utilizados

- Medio Terrific Broth (TB): para 1 L se utilizan 47,6 g de TB y 8 ml de glicerol (10 g).
- Amortiguador A: 50 mM de Tris 500 mM de NaCl 5 mM de MgCl₂ pH 8,0.
- Amortiguador B: Tris 50 mM pH 8,06 con 5 mM MgCl₂ y 500 mM Imidazol.
- Amortiguador de lisis: amortiguador A + 1 mg/ml de Lisozima + cóctel inhibidor de proteasas (Pierce, Thermo).
- Medio sin lactosa: Triptona 1 %, extracto de levadura 0,5 %, NaHPO₄ 500 mM, KH₂PO₄ 500 mM, NH₄Cl 1 M, Na₂SO₄ 1 M, glicerol 10 %, glucosa 1 %, MgSO₄ 40 mM.
- Medio de autoinducción: Triptona 1 %, extracto de Levadura 0,5 %, NaHPO₄ 500 mM, KH₂PO₄ 500 mM, NH₄Cl 1 M, Na₂SO₄ 1M, glicerol 10 %, Glucosa 1 %, Lactosa 4 %, MgSO₄ 40 mM.
- Amortiguador de corrida SDS-PAGE: 30 mM Tris HCl pH 6,6, SDS 1 % (w/v) y 5 % (v/v) glicerol
- Amortiguador de carga: 25 mM Tris, 250 mM glicina, pH 8,3, 0,1 % SDS
- Amortiguador para medir la actividad: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 M NaCl y 5 mM MgCl₂
- Amortiguador de transferencia 10x: 30 mM Tris HCl pH 6,6, SDS 1 % (w/v) y 5 % (v/v) glicerol, etanol 10%.
- TBS 10x: Tris 0,5 M, NaCl 1,5 M, pH 7,4.
- TBS tween: TBS 1x con Tween 0,1 %
- Solución de bloqueo: 5% de leche descremada en TBS-Tween al 0,1 %

Expresión de la proteína TcG6PDH

La enzima G6PDH de *T. cruzi* (TcG6PDH) se expresó en un sistema recombinante utilizando bacterias *E. coli* Tuner (DE3) transformadas con el plásmido conteniendo la secuencia codificante para la proteína de interés, gentilmente cedido por el grupo del Dr. Comini del Institut Pasteur de Montevideo. En la Figura 4A se esquematiza un proceso genérico de clonado de un fragmento de ADN de interés, en este caso el gen de la TcG6PDH, en un vector apropiado para la transformación bacteriana. En esta instancia se utilizó el plásmido pET28a (+) conteniendo el gen de la TcG6PDH en marco de lectura con una secuencia

codificante para la incorporación de una cola de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína (Figura 4B).

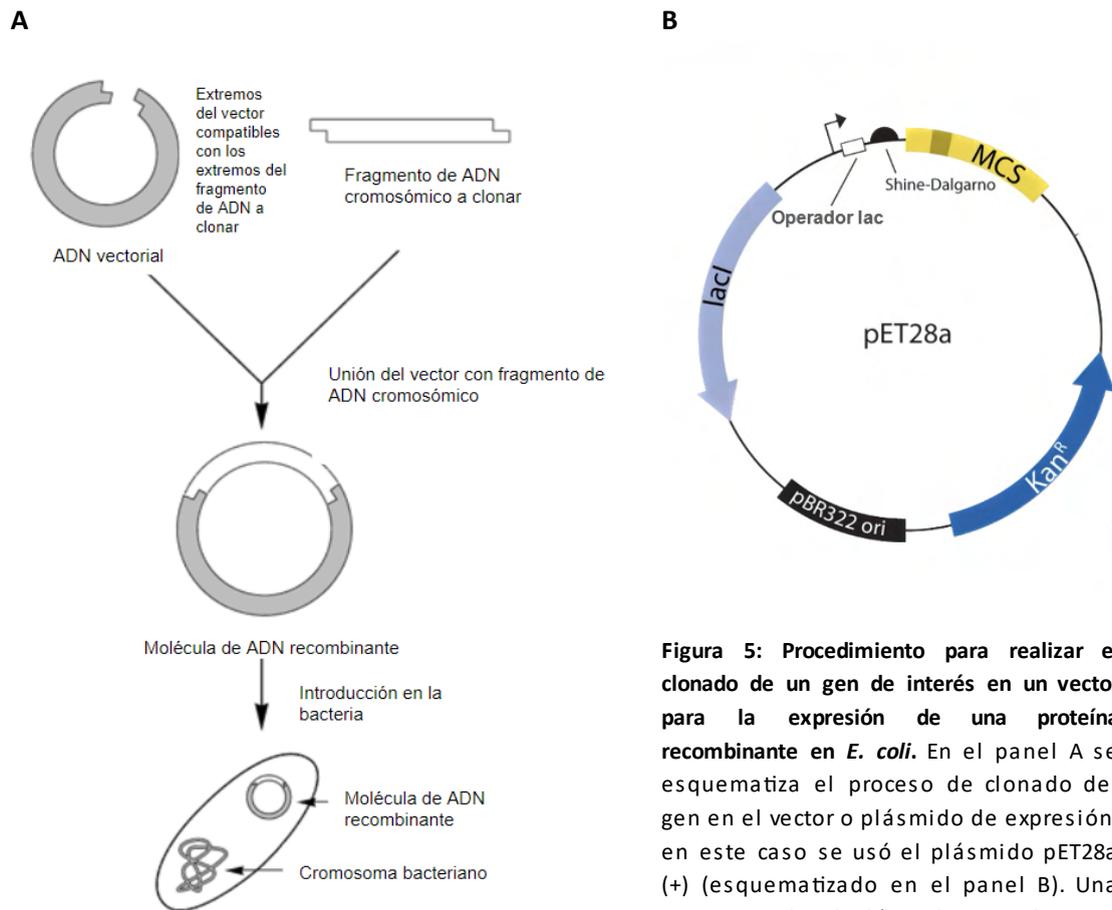


Figura 5: Procedimiento para realizar el clonado de un gen de interés en un vector para la expresión de una proteína recombinante en *E. coli*. En el panel A se esquematiza el proceso de clonado del gen en el vector o plásmido de expresión, en este caso se usó el plásmido pET28a (+) (esquemático en el panel B). Una vez generado el plásmido recombinante se introduce en una cepa de expresión de *E. coli* mediante transformación.

Para la puesta a punto de las condiciones de expresión se utilizaron diferentes medios de cultivo con distintos tiempos y temperatura de inducción. Para la expresión en medio Terrific Broth (TB) se crecen las bacterias en un precultivo de 3 mL toda la noche a 37°C con agitación orbital a 220 rpm, en medio de cultivo líquido en presencia de 50 µg/mL de kanamicina, antibiótico para el cual el plásmido de expresión les confiere resistencia a las bacterias transformadas. Luego se escala el cultivo a matraces conteniendo 50 mL del mismo medio en presencia del antibiótico. Se monitorea la densidad óptica (DO) a 600 nm hasta obtener una DO de 0,6, momento en el cual se añadió el inductor isopropiltiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM. Se dejó el cultivo en agitación orbital a 220 rpm

durante 4 horas a 37°C (matraz 1) o toda la noche a 20°C (matraz 2). Pasado ese tiempo, las bacterias se cosechan por centrifugación a 5.000 x g a 4°C durante 10 minutos, y se guarda el *pellet* bacteriano a -20°C hasta su lisis para la purificación de la enzima.

Por otro lado, se ensayó la expresión de la TcG6PDH en medio de autoinducción. Se realiza un precultivo en un volumen de 3 mL toda la noche a 37°C con agitación orbital a 220 rpm, en medio de autoinducción sin lactosa, con kanamicina 50 µg/mL. Se inoculan 100 µL del precultivo en 400 mL de medio de autoinducción con lactosa y kanamicina 50 µg/mL, y se deja en agitación orbital a 220 rpm y 25°C por 48 horas.

En cada paso de la expresión se toman alícuotas de 100 µL para su posterior análisis por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE). Se centrifuga a 3.000 x g por 3 minutos, se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* bacteriano en 45 µL de amortiguador de muestra. Se almacenan a -20°C hasta su uso.

Purificación de TcG6PDH

El protocolo empleado se basa en el artículo de Ortiz *et al.* 2016. Para la lisis de las bacterias, el *pellet* previamente obtenido se resuspende en amortiguador A en presencia de inhibidores de proteasas y 1 mg/mL de lisozima. Se incuba durante 45 minutos a 4 °C en agitación orbital, se sonica el lisado celular mediante 5 ciclos de 30 segundos alternados *on/off* con potencia máxima y se clarifica por centrifugación a 27.000 x g, por 45 min a 4°C. Se recupera la fracción soluble y se filtra utilizando un filtro de nitrocelulosa con poro de 0,45 µm (Millipore, Billerica, MA, USA).

Se procede a realizar una cromatografía de afinidad por níquel en un cromatógrafo automatizado AktaPure (GE-HealthCare). La fracción clarificada se siembra en una columna HisTrap (GE-HealthCare) pre-equilibrada con amortiguador A. Se lava la columna con 5 volúmenes de columna de amortiguador A con 5 mM imidazol para remover las proteínas no adheridas a la misma o que lo hacen con baja afinidad. Luego de que se estabiliza la absorbancia, se eluyen las proteínas unidas a la resina con amortiguador A conteniendo 500 mM Imidazol, y se concentra esta fracción utilizando unidades de filtración para centrifugación Amicon™ Ultra-15 con punto de corte para 10 kDa.

Se realiza una segunda purificación cromatográfica de la fracción obtenida en el paso anterior en una columna de gel filtración Superdex 200 10/300 GL (GE-HealthCare)

pre-equilibrada con amortiguador A. La muestra concentrada se clarifica utilizando un filtro de nitrocelulosa con poro de 0,45 μm (Millipore, Billerica, MA, USA) previo a sembrar en la columna utilizando un loop de 500 μL . Se monitorea la separación y se colectan las fracciones de elución que se almacenan a 4°C.

En todo momento durante la lisis y purificación se toman fracciones de 100 μL para su análisis posterior mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), de la misma forma que se describió anteriormente.

Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) y Western blot

Los resultados de la expresión y purificación se analizaron mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) en geles de acrilamida al 12%. Se prepararon geles de 10 pocillos compuestos por un gel de corrida y uno de *stacking*.

El gel de corrida está compuesto por agua mili Q, acrilamida:bisacrilamida 29:1, Tris pH 8,8 1,5 M, SDS 0,4%, persulfato de amonio 10% y TEMED. Estos 2 agentes polimerizantes se colocan por último. Se llena $\frac{3}{4}$ del cassette de electroforesis y se cubre con 100 μL de butanol para homogeneizar la superficie del mismo, se espera 10-20 minutos hasta que la acrilamida solidifique y luego se enjuaga el butanol con agua destilada para posteriormente colocar el siguiente gel. El gel de *stacking* se prepara al 6 %, está compuesto por acrilamida:bisacrilamida 29:1, 0,5 M Tris pH 6,8, SDS 0,4 %, persulfato de amonio 10 % y TEMED. El mismo se coloca por encima del gel de corrida, inmediatamente se introduce el peine de 10 pocillos para luego esperar durante 10-20 minutos a que gelifique (Figura 5).

Se siembran alícuotas de muestra de 10 a 15 μL por pocillo, y el marcador de peso molecular (MPM) Low Molecular Weight Native marker kit (GE) o un marcador de peso pre-teñido (Rainbow RPN800E, Amersham) para referenciar.

Se conectan los electrodos al *cassette* y se coloca dentro de la cuba de electroforesis para posteriormente verter el amortiguador de corrida. Luego de conectar la cuba a la fuente de poder, se mantiene un voltaje constante de 15 mA mientras las muestras atraviesan el gel de apilamiento, y cuando penetran el gel separador se eleva el voltaje a 20 mA. Se deja que migren hasta que el frente de corrida llegue al sector inferior del gel, cuando finaliza su corrida se procede a la tinción o transferencia del gel. Para la tinción se incuba el gel en azul

de Coomassie coloidal por 16 horas y luego se destiñe mediante lavados sucesivos con agua destilada.



Figura 6. Esquema de la preparación del gel de poliacrilamida para la SDS-PAGE. 1. Llenado del *cassette* con la solución para preparar el gel de corrida hasta $\frac{3}{4}$ de su altura. 2. Agregado del gel de *stacking* e inserción del peine de 10 pocillos. 3. Soporte donde se arma el gel para luego colocar dentro de la cuba de electroforesis. 4. Ubicación del *cassette* dentro de la cuba de electroforesis y colocación del amortiguador de corrida.

Se realizó un *Western Blot* para corroborar la expresión de la proteína y su presencia en las fracciones obtenidas luego de realizar la purificación por cromatografía, antes de medir la actividad enzimática. Para el *Western blot* primero se realiza una corrida electroforética y luego se transfieren las proteínas a una membrana de PVDF, para lo cual se prepara un sandwich de transferencia como se esquematiza en la Figura 6. La transferencia se realiza a 400 mA y 100 V, durante 2 horas. Luego se incuba la membrana en solución de bloqueo toda la noche, para al día siguiente agregar el anticuerpo primario contra la cola de histidinas en una dilución 1/2000 en TBS-Tween al 0,1 % y se incuba durante 1 hora. Luego se realizan 3 lavados en agitación con TBS-Tween al 0,1 % y se incuba la membrana por 1 hora con el anticuerpo secundario contra IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano a una dilución final de 1/5000. Finalmente, se realizan 3 lavados con TBS Tween al 0,1 % en agitación y se revela la reacción colocando 1,5 ml de luminol y 1,5 ml de peróxido de hidrógeno según instrucciones del kit ECL (Amersham GE).

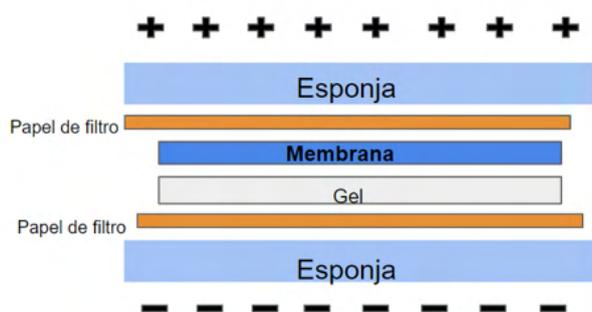


Figura 7: Sandwich de transferencia Western Blot. El gel se coloca del lado del electrodo negativo y la membrana del lado positivo para la transferencia de las proteínas.

Medida de actividad enzimática de la TcG6PDH

La concentración de TcG6PDH en la fracción obtenida en la purificación se estimó realizando un espectro de absorbancia de 250 a 350 nm, utilizando el valor de Abs280nm para despejar la concentración de enzima según la ecuación de Lambert Beer ($A = C \cdot l \cdot \epsilon$), donde $\epsilon_{TcG6PDH}$ ($54945 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) fue calculado teóricamente con el programa Swiss Expasy. Las medidas de actividad de TcG6PDH se realizaron a 25°C monitoreando la formación de NADPH a 340 nm en amortiguador Tris 50 mM, pH 7,5, MgCl_2 5 mM en un volumen de reacción final de 150 μL en placas de 96 pocillos. La reacción se desencadenó con la adición de glucosa-6-fosfato (G6P) y se siguió por espectrofotometría en un lector de placas con modo cinético (Varioskan®). Según se describe en (Ortiz *et al.*, 2016), se ensayaron diferentes concentraciones de enzima (36 nM, 121 nM, 243,7 nM) y de sustratos G6P y NADP^+ (60 mM y 5 mM respectivamente). La velocidad inicial de la reacción se obtuvo por ajuste de la pendiente del tramo lineal inicial de la corrida utilizando el programa OriginPro 6.1.

Evaluación del compuesto 1260 y derivados como inhibidores de la TcG6PDH

Se ensayaron compuestos de la quimioteca del laboratorio con estructuras tipo esteroides similares a los reportados previamente como inhibidores (Marks *et al.* 1960, Cordeiro *et al.* 2009), incluyendo el compuesto 1260 y otros compuestos de la familia que se muestran en la siguiente tabla. Se pesaron cada uno de los compuestos y se calculó el volumen a adicionar de DMSO para que la concentración de la solución de partida sea en todos los casos de 10 mM.

La concentración de compuesto ensayado fue de 50 μM , colocando 0,75 μL del stock en cada pocillo con una concentración final de DMSO de 0,75 %. Cada condición se evaluó por

triplicado. Se incluyeron dos controles positivos: enzima sin compuesto y enzima con 0,75 % DMSO, y un control negativo sin enzima. La concentración de enzima a emplear se seleccionó de acuerdo al resultado del objetivo específico previo. En caso de identificar moléculas que afecten la actividad enzimática significativamente, serán seleccionadas para futuros ensayos dosis-respuesta a ser desarrollados por el grupo de investigación en el laboratorio.

Tabla 1. Compuestos evaluados. Se lista el número de identificación de cada compuesto en la quimioteca del laboratorio, su peso molecular, la masa y el volumen de DMSO necesario para preparar los *stock* a una concentración de 10mM.

ID de compuesto	Peso molecular (g/mol)	Masa (g)	Volumen (μL)
1256	439	0,00388	883,8
1257	484	0,00249	514,5
1258	457	0,00152	332,6
1260	389,6	0,00294	754,6
1261	682	0,00081	118,7
1262	450,7	0,00165	366,1
1263	583	0,00130	223
1289	420	0,00149	354,8
1317	642	0,00620	965,7
1319	462	0,00182	394
1053	358	0,00052	155,3
1054	316	0,00274	867,1

El ensayo de inhibición de la TcG6PDH se realizó agregando los reactivos a los pocillos de la placa en el siguiente orden:

- 1) Se añadieron 0,75 μL de cada uno de los compuestos
- 2) Se añadieron 112,25 μL de amortiguador
- 3) Se añadieron 6,14 μL de TcG6PDH en cada pocillo excepto en el control negativo
- 4) Se añadieron 15 μL de NADP⁺ 50 mM en cada pocillo
- 5) Se incubó durante 10' a TA
- 6) Se añadieron 15 μL de G6P 600 mM (desencadenante de la reacción)
- 7) Se inició la lectura de la placa en el espectrofotómetro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Expresión de la proteína TcG6PDH

Se llevó a cabo la expresión de TcG6PDH a partir del plásmido pET28a (+) utilizando la bacteria *E. coli* Tuner (DE3) como se describió en la sección anterior, empleando diferentes medios y condiciones de cultivo buscando optimizar la cantidad de proteína obtenida en forma soluble. Para evaluar la expresión de la proteína de interés, luego de cosechar los cultivos, se procede a lisar las bacterias para obtener la fracción soluble y la fracción insoluble.

Para poner en evidencia la presencia o ausencia de nuestra proteína objetivo en las muestras se realiza una electroforesis en gel obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 8.

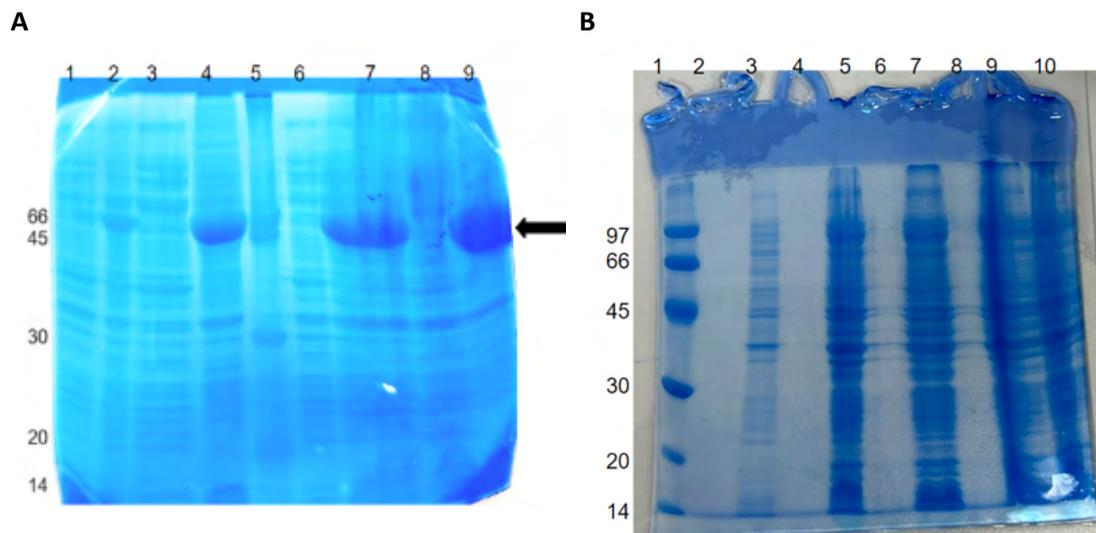


Figura 8: Análisis por SDS-PAGE de la expresión de TcG6PDH recombinante en distintas condiciones. Las fracciones colectadas durante la expresión de la proteína se corrieron en un gel de poliacrilamida al 6% (A) y al 12 % (B). En cada pocillo se sembraron 15 μ L de las siguientes fracciones de *E. coli* Tuner(DE3). **A:** Carril 1: pre inducción. Carril 2: post inducción con IPTG 1 mM durante 4 horas a 37°C Carril 3 y 4: fracción soluble e insoluble de la muestra del carril 2, respectivamente. Carril 5: MP. Carril 6: pre inducción. Carril 7: post inducción con IPTG 1 mM toda la noche a 20 °C. Carril 8 y 9: Fracción soluble e insoluble de la muestra del carril 7, respectivamente. **B:** Carril 1: MP Carril 2: libre Carril 3: pre inducción Carril 4: libre. Carril 5: post inducción. Carril 6: libre. Carril 7: fracción soluble. Carril 8: libre. Carril 9: fracción insoluble. Carril 10: fracción insoluble.

En el gel de la **Figura 8 A** aparece una banda prominente entre 45 y 66 kDa en el carril correspondiente a las fracciones post-inducción con IPTG, que no está presente en las fracciones pre-inducción y cuyo tamaño es el esperado para la TcG6PDH cuyo peso molecular es de 59 kDa en su forma monomérica. Se puede observar que se expresa mayormente en la fracción insoluble. La electroforesis evidencia que ninguna de las condiciones de temperatura y tiempo de expresión en el medio TB evaluadas permitieron expresar suficiente proteína en la fracción soluble como para pasar a la fase de purificación.

Como las condiciones de expresión ensayadas en los cultivos inducidos con IPTG no permitieron obtener la proteína en forma soluble en cantidades significativas (Figura 8A), se optó por implementar un nuevo medio de cultivo, en el cuál la expresión de la proteína de interés se realiza en un medio de autoinducción, en presencia de lactosa que permite la activación del operón lac una vez se consume toda la glucosa del cultivo. Luego de la expresión de la TcG6PDH en este medio se obtuvieron los siguientes resultados en el análisis de las fracciones por SDS-PAGE (Figura 8B).

Como se observa en la Figura 8 B, la cantidad de proteína recombinante obtenida mediante la expresión en el sistema de autoinducción es menor que al utilizar el inductor IPTG, ya que no se observa una banda predominante como en el caso anterior. Sin embargo, la disminución en la tasa de producción de la proteína recombinante evitaría la formación de agregados y precipitados proteicos insolubles. A su vez, permitiría que el proceso de plegamiento para la obtención de la estructura tridimensional correcta sea más eficiente, favoreciendo la producción de proteína en estado soluble. Se procedió a la purificación utilizando la fracción soluble obtenida en este medio de inducción (carril 7, figura 8B).

Purificación de TcG6PDH

El primer paso para la purificación de la proteína fue la lisis bacteriana combinando ruptura enzimática con lisozima y ruptura mecánica mediante sonicado. Las bacterias lisadas se centrifugaron para separar la fracción soluble conteniendo la proteína de interés de la fracción insoluble conteniendo restos de pared y membrana celular de la bacteria.

El siguiente paso en la purificación es la IMAC, de la fracción soluble clarificada mediante pasaje por filtro de nitrocelulosa de 0,45 μm . Se utiliza una columna HisTrap de 1ml que se conecta a un sistema de cromatografía automatizado. Se siembra la muestra luego de equilibrar la columna con amortiguador A. Se monitorea el proceso midiendo absorbancia a 280 nm. Se colecta la fracción no unida a la columna, y luego de realizar un lavado con baja concentración de imidazol se eluye la proteína de interés. Se colecta un pico que sale a los 57,5 mL, de aproximadamente 3 mL totales, donde esperamos encontrar a la TcG6PDH (Figura 9).

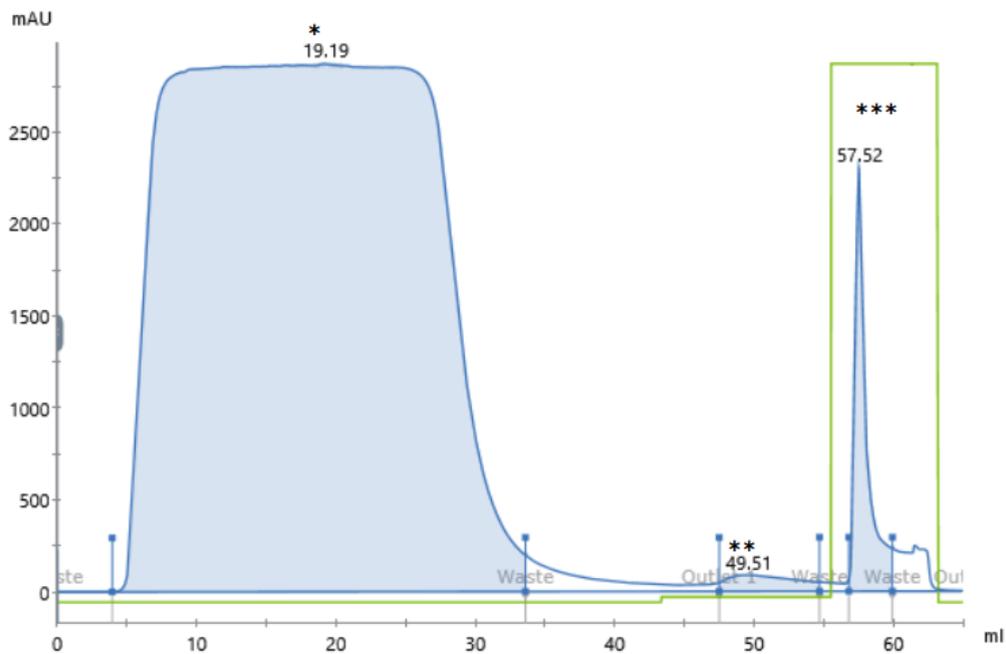


Figura 9: Cromatograma obtenido durante la purificación de la TcG6PDH mediante cromatografía de afinidad (IMAC). Se grafica la Abs a 280 nm en función del volumen de elución, se aprecia un gran pico correspondiente a la fracción no unida entre los 5 y 35 ml (*), el pico pequeño del lavado a los 49,5 ml (**) y el pico de elución a los 57,5 ml (***). El trazo azul corresponde a la medida de absorbancia a 280 nm para cada fracción y el trazo verde a la concentración de amortiguador de elución utilizado.

Para continuar con la purificación se realizó una segunda cromatografía utilizando la SEC. Se concentró el pico de elución empleando un dispositivo de ultrafiltración con membrana con punto de corte de 10 kDa hasta obtener un volumen de aproximadamente 1,5 mL y se realizaron 3 corridas independientes en la SEC. Los diferentes picos de elución se

colectaron en tubos separados. En la figura 10 se observa el resultado de la cromatografía de gel filtración.

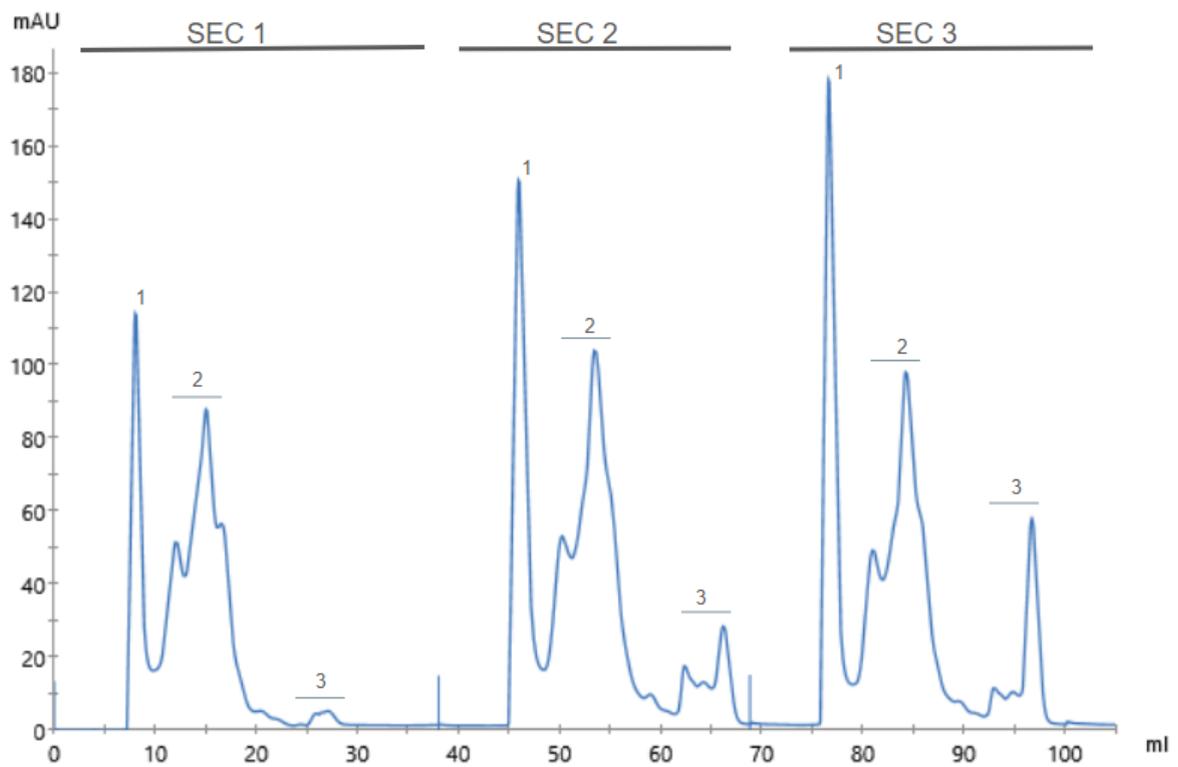


Figura 10: Cromatograma obtenido durante la purificación de la TcG6PDH mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC). Se grafica la Abs a 280 nm en función del volumen de elución para las 3 inyecciones consecutivas (SEC 1, 2 y 3). En todos los casos se aprecia un pico inicial mayoritario (1), luego un segundo pico donde parece eluir más de una proteína (2) y luego uno o más picos minoritarios (3).

Las fracciones colectadas en la cromatografía se analizaron mediante SDS-PAGE, obteniéndose resultados muy similares en las 3 inyecciones de la SEC. En la Figura 11 se muestra a modo de ejemplo la corrida de las fracciones colectadas durante la IMAC y la primera corrida de la SEC.

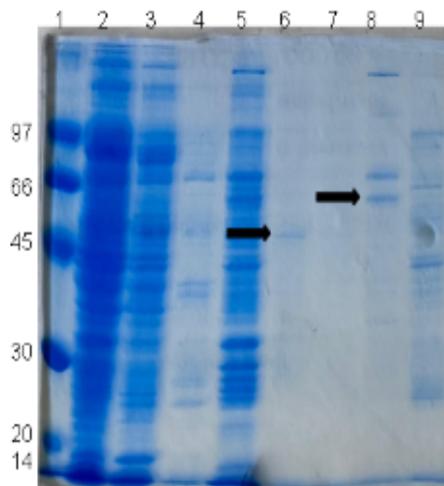


Figura 11: Análisis por SDS-PAGE de las fracciones colectadas en la IMAC y SEC.

Carril 1: MP. Carril 2: sembrado en la columna (IMAC). Carril 3: Fracción no unida (IMAC). Carril 4: lavado (IMAC). Carril 5: pico de elución (IMAC). Carril 6: pico 1. Carril 7: meseta (SEC inyección 1). Carril 8: pico 2 (SEC inyección 1). Carril 9: pico 3 (SEC inyección 1).

Llama la atención que luego de la purificación mediante IMAC se obtuvo una mezcla de varias proteínas, no logrando visualizar un incremento de la proteína de interés en la fracción purificada. Esto pudo deberse a la realización de un único paso de lavado, con una concentración baja de imidazol, que no permitió eliminar proteínas de menor afinidad de unión a la columna. Se plantea como perspectiva realizar un gradiente de elución con imidazol o incluir más pasos de lavado para mejorar este paso inicial de purificación. Por otro lado, la cromatografía de exclusión molecular permitió separar la mezcla de proteínas obtenidas luego del primer paso de purificación, recolectando varios picos de elución que posteriormente fueron analizados mediante SDS-PAGE. Dado que la forma monomérica de la TcG6PDH tiene un tamaño esperado de 59 kDa, las bandas obtenidas en los picos 1 y 2 de elución, comprendidas entre 45 y 66 kDa podrían corresponder a la proteína de interés. Más específicamente, en el pico 1 (Figura 11, carril 6) se aprecia una banda única que migra inmediatamente por encima de 45 kDa, mientras en el pico 2 (Figura 11, carril 8) se observan dos bandas en ese rango, teniendo la superior un tamaño estimado en 66 kDa y la inferior de alrededor de 60 kDa. Estos resultados sugieren que esta última, dado su peso molecular, corresponde a la TcG6PDH. Por otro lado, como se esperaba de acuerdo al cromatograma de la SEC, la electroforesis muestra que el tercer pico corresponde a una mezcla de proteínas.

A raíz de estos resultados, se realizó un WB para corroborar la identidad de la proteína antes de medir actividad enzimática. Se utilizó un anticuerpo primario contra cola de histidina producido en conejo y el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a HRP. En la Figura 12 se muestra el resultado del WB, donde no puede concluirse la presencia o

ausencia de la *TcG6PDH* dado que no se observó señal tampoco para el control positivo. Se observan algunas bandas pero parecen ser inespecíficas. Dado que el control positivo tampoco se vio, esto puede deberse a que los anticuerpos utilizados no hayan reconocido el epítipo de interés por disminución de la sensibilidad y/o la especificidad (Sule *et al.*, 2023), por lo que sería conveniente repetir el experimento utilizando otro anticuerpo para verificar esta hipótesis.



Figura 12: Western Blot para la detección de proteínas con cola de histidinas.

Carril 1: MPM. Carril 2: pre-inducción en medio de autoinducción. Carril 3: post-inducción en medio de autoinducción. Carril 4: sin inducir con IPTG. Carril 5: post-inducción con IPTG a 37°C. Carril 6: post-inducción con IPTG a 20°C. Carril 7: Pico 1 de la SEC. Carril 8: Pico 2 de la SEC. Carril 9: Pico 3 de la SEC (ver figura 11). Carril 10: control positivo de cola de histidina, tripanotión reductasa de *T. cruzi*.

Al no obtener resultados concluyentes en el *Western Blot*, se decidió realizar el análisis comparativo por SDS-PAGE de la expresión de *TcG6PDH* recombinante en distintas condiciones en un único gel, para facilitar la visualización (Figura 13).

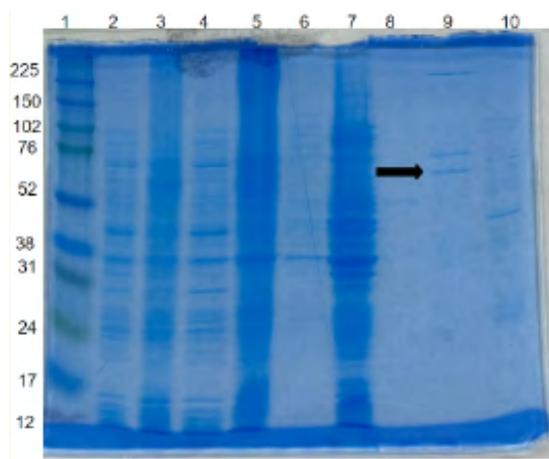


Figura 13: Análisis por SDS-PAGE de la expresión de TcG6PDH recombinante en distintas condiciones. Carril 1: MPM. Carril 2: pre inducción a 37°C sin IPTG. Carril 3: post inducción a 37°C con IPTG. Carril 4: pre inducción a 20°C sin IPTG. Carril 5: post inducción a 20°C con IPTG. Carril 6: pre inducción en medio de autoinducción. Carril 7: post inducción en medio de autoinducción. Carril 8: pico 1 SEC. Carril 9: pico 2 SEC. Carril 10: pico 3 SEC (ver figura 11).

Como ya fue mencionado, la forma monomérica de la TcG6PDH tiene un tamaño esperado de 59 kDa, por lo tanto, las bandas obtenidas en el pico 2 de la SEC, comprendidas entre 52 y 76 kDa podrían corresponder a nuestra proteína de interés. Estos resultados sugieren que la proteína de la banda que se encuentra más cerca a los 52 kDa, podría corresponder a la TcG6PDH. A raíz de estos resultados, se procedió a realizar la medida de actividad enzimática con dicha fracción.

Medida de actividad enzimática de la TcG6PDH

Como se discutió previamente, se optó por seleccionar la fracción correspondiente al pico 2 de la SEC para evaluar la presencia de actividad enzimática, ya que contiene la banda con el peso molecular estimado para la TcG6PDH. Se estimó la concentración de proteína mediante la medida de absorbancia 280 nm según la ecuación de Lambert-Beer utilizando el coeficiente de absorptividad molar calculado teóricamente. Dada la presencia de otras bandas en esa fracción, nos planteamos que se podría estar sobreestimando la concentración de TcG6PDH por este método, en cuyo caso la concentración efectiva de enzima sería menor. Por consiguiente, se evaluó la actividad y se estimó la velocidad inicial de la reacción para 3 concentraciones de enzima diferentes (36, 121 y 244 nM).

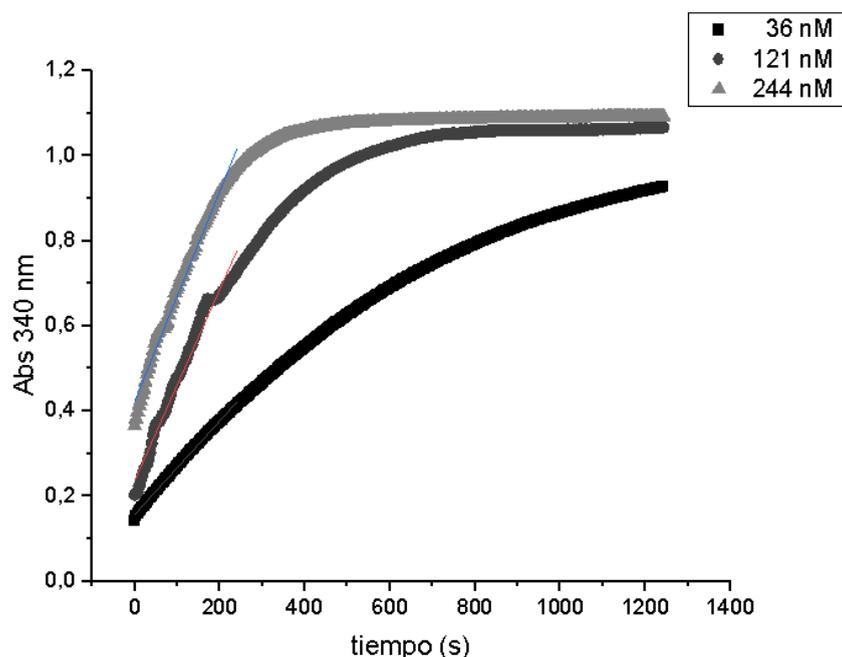


Figura 14: Medida de actividad enzimática con distintas concentraciones de enzima. Los ensayos de medida de actividad se realizaron en amortiguador Tris 50 mM pH 7,5 MgCl₂ 5 mM en un volumen de reacción final de 150 μ l, utilizando distintas concentraciones de enzima (36 nM, 121 nM ó 244 nM), 60 mM G6P y 5 mM de NADP⁺. La reacción se desencadenó con la adición de G6P y la formación de producto se siguió midiendo la absorbancia a 340 nm en un lector de placas con modo cinético, a TA.

En la Figura 14 se muestran corridas representativas de las medidas de actividad realizadas a distintas concentraciones de la muestra conteniendo la enzima *TcG6PDH*, en las que ésta se incubaba con G6P y NADP⁺ y se mide la absorbancia a 340 nm en el tiempo, buscando detectar la formación de NADPH, producto de la reacción catalizada por esta enzima. Estos resultados permiten confirmar la presencia de la proteína de interés en dicha muestra y que la misma está activa. A su vez, se verificó que a medida que aumenta la concentración de enzima la actividad enzimática se incrementa, lo que se desprende de la estimación de la pendiente a partir del ajuste de la porción lineal de la gráfica. Las pendientes y desvíos estándar obtenidos para cada concentración fueron de $0,0011 \pm 9,8 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ para 36 nM enzima, de $0,0034 \pm 5,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ para 121 nM enzima, y de $0,0043 \pm 1,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para 244 nM enzima. Dado que la cantidad de enzima no es una limitante, se seleccionó la concentración de *TcG6PDH* de 244 nM para realizar los ensayos de inhibición con los compuestos derivados de esteroides, dado que presenta una pendiente mayor.

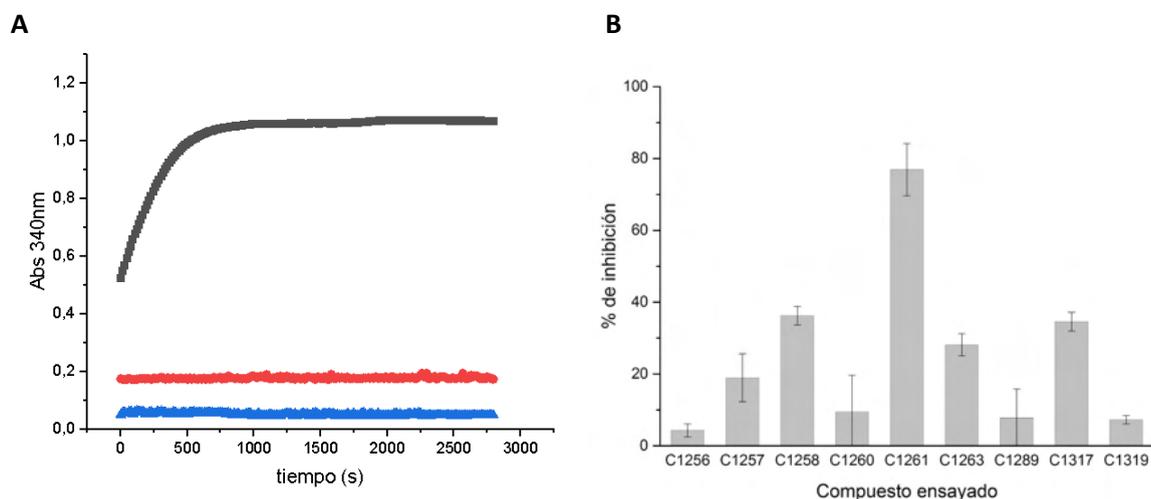


Figura 15. Ensayo de inhibición de la actividad de TcG6PDH. **A.** Gráfica representativa de las medidas de actividad enzimática, con una concentración de enzima de 244 nM. Todas las corridas se realizaron en amortiguador Tris 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 5 mM en un volumen de reacción final de 150 μl a TA y siguiendo la absorbancia a 340 nm en un lector de placas con modo cinético. En gris se observa la corrida del control positivo de enzima en presencia de 0,75 % DMSO, en rojo se observa la corrida en presencia del compuesto 1261 a una concentración de 50 μM, y en azul el control negativo sin enzima. **B.** Evaluación del efecto inhibitor de los distintos compuestos ensayados en relación al control de enzima con DMSO. Se muestra el porcentaje de inhibición para aquellos compuestos que presentaron un efecto sobre la actividad enzimática. Todos los compuestos fueron evaluados en las mismas condiciones de ensayo descritas para el control, a una concentración de 50 μM en presencia de 0,5 % DMSO.

En la Figura 15A se muestran corridas representativas de las medidas de actividad de la TcG6PDH durante el ensayo de inhibición de la enzima. Se incuban los compuestos con la TcG6PDH durante 15 min a TA y NAPD⁺. Se incluye un control positivo de la enzima y otro control positivo de la enzima con 0.5% DMSO para verificar que este no afecta la actividad enzimática, así como un control negativo sin enzima. Luego se adiciona G6P para desencadenar la reacción y se mide la absorbancia a 340 nm en el tiempo, buscando detectar la formación de NADPH.

En este caso se visualiza la actividad de la enzima sin inhibidor, y se observa una franca disminución de la velocidad de formación de NADPH, y por lo tanto de la actividad enzimática, en la curva correspondiente a la actividad del compuesto 1261, el cual mostró una inhibición mayor al 70%. En la Figura 15B se observan los porcentajes de inhibición de los distintos compuestos ensayados sobre la actividad de la TcG6PDH. Estos resultados permiten identificar varios inhibidores, y en particular concluir que el compuesto 1261 presenta una inhibición de más del 70 % a la concentración ensayada. Por otro lado, a pesar de haber mostrado inhibición del crecimiento de *T. cruzi in vitro*, el compuesto 1260 no

presentó inhibición de la *TcG6PDH* en las condiciones ensayadas, por lo que se hace necesario seguir caracterizando el efecto de este compuesto en el crecimiento parasitario así como su mecanismo de acción. En cuanto a los inhibidores identificados en este ensayo preliminar, es importante realizar los ensayos dosis-respuesta para determinar su IC_{50} y proseguir con su caracterización a futuro.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La G6PDH es una enzima que tiene como función convertir la G6P en 6-fosfogluconolactona y generar poder reductor en forma de NADPH, siendo esta la primera reacción de la fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato. Su importancia radica en el rol esencial que cumple en el metabolismo de *T. cruzi* influyendo en su supervivencia. En base a esto, en este trabajo se utiliza esta enzima como blanco molecular en búsqueda de inhibidores de la misma que puedan ser potenciales fármacos contra esta infección.

Para ello, se pusieron a punto las condiciones para la expresión y purificación de la TcG6PDH en el laboratorio. Asimismo, se evaluó su actividad enzimática en placa de 96 pocillos y se realizó un primer ensayo de inhibición utilizando compuestos de la familia del compuesto 1260 de la quimioteca del grupo, el cual ha mostrado en trabajos previos actividad tripanosomicida *in vitro*, pero se desconoce su mecanismo de acción. En base a la similitud estructural de este compuesto con los esteroides, algunos de los cuales han sido reportados como inhibidores de la G6PDH, nos planteamos evaluar si los compuestos de esta familia poseen actividad inhibidora de la enzima de *T. cruzi*.

A pesar de que el compuesto 1260 no mostró inhibir a la enzima, 4 de los 12 compuestos que se probaron mostraron inhibir la actividad enzimática en más del 25 % en relación al control, y en particular el compuesto 1261 presentó una inhibición mayor al 70 %.

Estos resultados permitieron identificar moléculas con las que sería pertinente repetir este ensayo así como realizar los ensayos dosis-respuesta correspondientes. Asimismo, se plantea que sería de interés analizar las propiedades estructurales y fisicoquímicas de estas moléculas para luego evaluarlas en los otros modelos *in vitro* e *in vivo* de *T. cruzi* de los que dispone el grupo, así como su toxicidad en células de mamífero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera E, Perdomo C, Espindola A, Corvo I, Faral-Tello P, Robello C, Serna E, Benítez F, Riveros R, Torres S, Vera de Bilbao NI, Yaluff G, Alvarez G. A Nature-Inspired Design Yields a New Class of Steroids Against Trypanosomatids Molecules. 2019; 24(20):3800.
- Amorin B, Pérez L. Chagas congénito de segunda generación en Uruguay. Primer caso sintomático descrito en el país. Archivos de Pediatría del Uruguay, 2016; 87 (3):245–52.
- Andrade DV, Gollob KJ, Dutra WO. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. PLoS Negl Trop Dis., 2014; 8(7): 3010.
- Apt B W, Heitmann I, Jercic I, Jofré L, Muñoz P, Noemí I, et al . Guías clínicas de la enfermedad de Chagas 2006: Parte VI. Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas. Rev. chil. infectol., 2008; 25(5): 384-389.
- Au SW, Gover S, Lam SVM, Adams MJ. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. Struct Fold Des., 2000; 293-303.
- Ayene IS, Sttamato TD, Mauldin SK, Biaglow JE, Tuttle SW, Jenkins SF, et al. Mutation in the glucose 6 phosphate dehydrogenase gene leads to inactivation of Ku DNA end binding during oxidative Stress. J Biol Chem. 2002; 277: 9929-9935.
- Barrios P, Más M, Giachetto G, Basjmadjián Y, Rodríguez M, Viera AL, et al. Enfermedad de Chagas: transmisión vertical. Descripción de casos clínicos. Rev Médica Urug., 2013; 31, 209-213.
- Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, et al. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. Scand J Med Sci Sports, 2017; 27(1):4–25.
- Chiribao ML, Libisch G, Parodi-Talice A, Robello C. Early *Trypanosoma cruzi* infection reprograms human epithelial cells. Biomed Res Int., 2014; 439-501.

- Cordeiro AT, Thiemann OH, Michels PAM. Inhibition of *Trypanosoma brucei* glucose-6-phosphate dehydrogenase by human steroids and their effects on the viability of cultured parasites. *Bioorg. Med. Chem.*, 2009; 17, 2483–2489.
- Fuentes R, Maturana M, laCruz M D, editores. Eficacia de nifurtimox para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. *Rev. Chil. Infectol.*, 2012; 29 (1): 82-86.
- Gualdrón-López M, Brennan A, Hannaert V, Quiñones W, Cáceres A, Bringaud F, Concepción JL, Michels PAM. When, how and why glycolysis became compartmentalized in the Kinetoplastea. A new look at an ancient organelle. *International Journal for Parasitology*, 2012; (42)1: 1-20.
- Gupta S, Cordeiro AT, Michels PA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase is the target for the trypanocidal action of human steroids. *Mol Biochem Parasitol.*, 2011; 176(2):112-5.
- Igoillo-Esteve M, Cazzulo JJ. The glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Its role in the defense of the parasite against oxidative stress. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2006; 149, 170–181.
- Imaz I, García L, Blasco T, Martín B, González-Enríquez J, Ayala LE, García L, Sarría A. «Evaluación económica de distintas estrategias de cribado de la enfermedad de Chagas en España». IPE 2015/72. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (AETS) - Instituto de Salud Carlos III, Madrid, 2015.
- Irigoín F, Cibils L, Comini MA, Wilkinson SR, Flohé L, Radi R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radic Biol Med*, 2008; 45(6):733–42.
- Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 2009; 461(7267):1071–1078.
- Marks PA, Banks J. Inhibition of mammalian glucose-6-phosphate dehydrogenase by steroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1960; 46, 447–452.

- Mercaldi GF, Dawson A, Hunter WN, Cordeiro AT. The structure of a *Trypanosoma cruzi* glucose-6-phosphate dehydrogenase reveals differences from the mammalian enzyme. *FEBS Lett*, 2016; 590: 2776-2786.
- Muñoz CV, Lorca HM, Thiermann E, Astorga LB, Arias MA, Pino S. Transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi*: Investigación en la maternidad del Hospital San Juan de Dios, de Santiago. *Rev. chil. pediatra*. 1982; 53(1-6): 22-27.
- Murillo-Godinez G, Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). *Med. interna Méx.* 2018 ; 34 (6): 959-970.
- Naciuk FF, Faria JN, Eufrásio AG, Cordeiro AT, Bruder M. Development of Selective Steroid Inhibitors for the Glucose-6-phosphate Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *ACS Med. Chem. Lett* 2020, 11, 1250-1256.
- Naylor CE, Gover S, Basak AK, Cosgrove MS, Levy HR, Adams MJ. NADP+ and NAD+ binding to the dual coenzyme specific enzyme *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase: different interdomain hinge angles are seen in different binary and ternary complexes. *Acta Cryst* 2001; 57:635-648.
- Núñez-Mujica G. Control y regulación de la glicólisis de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*: Un enfoque teórico. [Bogotá, Colombia.]: Universidad de Los Andes; 2009.
- Ortíz C, Moraca F, Laverriere M, Jordan A, Hamilton N, Comini MA. Glucose 6-phosphate dehydrogenase from trypanosomes: Selectivity for steroids and chemical validation in bloodstream *Trypanosoma brucei*. *Molecules*. 2021; 26(2):358.
- Ortíz C. Validación de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Trypanosoma cruzi*, como blanco para el diseño racional de fármacos antichagasicos. [Montevideo, Uruguay.]: Universidad de la República; 2017.
- Ortíz C, Moraca F Medeiros A, Botta M, Hamilton N, Comini M. Modo de unión y selectividad de los esteroides hacia la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa del patógeno *Trypanosoma cruzi*. [Montevideo, Uruguay.]: Instituto Pasteur de Montevideo; 2016.

- Ramponi F, Aerts C, Sartor P, Pinazo M, Freilij H, Guzman C, Malchiodi E, Sicuri E. Development of vaccines for Chagas disease (CRUZIVAX): stakeholders' preferences and potential impacts on healthcare. Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. 2022.
- Rivera JLH. Síntesis, caracterización y evaluación de nuevos compuestos con actividad biológica frente a enfermedades infecciosas desatendidas. [México]: Universidad autónoma de Chihuahua; 2022.
- Salvatella R. Chagas en Uruguay, 1937-2016. Información básica para su prevención, control y atención. Arch Pediatr Urug, 2016; 87(1):49–52.
- Shigihara T, Hashimoto M, Shindo N, Aoki T. Transcriptome profile of *Trypanosoma cruzi*-infected cells: simultaneous up- and down-regulation of proliferation inhibitors and promoters, Parasitology Research, 2008 102(4), pp. 715-722.
- Stanton RC. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. IUBMB Life. 2012; 64(5):362-9.
- Sule R, Rivera G, Gomes A. Western blotting (immunoblotting): history, theory, uses, protocol and problems. Biotechniques. 2023; 75(3):99-114.
- Zavala CJE. Enfermedad de Chagas y otras tripanosomiasis, en: Becerril MA. Parasitología médica. McGraw-Hill/Interamericana Editores, México, 2014: 95-109.