



**INTERACCIONES PROTEÍNA - PROTEÍNA ENTRE ENZIMAS DEL GLICOSOMA  
DE *Leishmania mexicana mexicana*. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR**

**José Vielma<sup>1,3</sup>, Yanauri Bravo<sup>1</sup>, Juana Villarreal<sup>2</sup>, Jean Cerinza<sup>3</sup>, Armando Briceño<sup>4</sup>.**

- 1. Laboratorio de Neurobiología, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB), Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Hospital Universitario de Maracaibo, 9<sup>no</sup> piso, Maracaibo, Venezuela**
- 2. Escuela Técnica Agropecuaria Robinsoniana Nacional Mesa Cerrada, Timotes, Venezuela.**
- 3. Laboratorio de Análisis Químico (LAQUNESUR), Universidad Nacional Sur del Lago “Jesús María Semprum” (UNESUR), Santa Bárbara de Zulia, Venezuela.**
- 4. Laboratorio de Usos Múltiples, Universidad Nacional Experimental Sur del Lago “Jesús María Semprum” (UNESUR), Núcleo La Victoria, Santa Cruz de Mora, Venezuela.**

*Recibido: 13/2/2016*

*Aceptado: 3/4/2016*



**Correspondencia al autor:** José Ramón Vielma Guevara. Laboratorio de Neurobiología, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB), Facultad de Medicina, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Hospital Universitario de Maracaibo, 9<sup>no</sup> piso, Maracaibo, estado Zulia. Teléfono: 51-0261-3231795.

**Email:** joravig@yahoo.com.

## RESUMEN

*Leishmania mexicana mexicana* es uno de los agentes etiológicos más importantes de la leishmaniosis cutánea en el nuevo mundo, la cual afecta a millones de personas principalmente en países pobres o en vías de desarrollo, generando un problema de salud pública. Este parásito comparte características biológicas con *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, entre las más destacadas tenemos: presencia de glicosomas (microcuerpo similar a peroxisomas), cinetoplasto y edición del ARN. A través de cromatografía de filtración en gel (Sepharosa CL6B) se logró caracterizar preliminarmente las interacciones proteína - proteína entre enzimas del glicosoma de *L. mexicana mexicana* cepa AZV obteniéndose la interacción de subunidades de las enzimas hexocinasa (HK), isomerasa de fosfoglucoasa (PGI), cinasa del fosfoglicerato (PGK) y la deshidrogenasa del gliceraldehido - 3 - fosfato (GAPDH) con estados de oligomerización distintos a mamíferos y otros Kinetoplastidae; además de la posible interacción de la HK con otras dos proteínas no identificadas aún. Estos datos serán confirmados por técnicas como coimmunoprecipitación, entrecruzamiento o ensayo de dos híbridos; con el propósito de dilucidar el significado de éstas asociaciones y su posible rol en la regulación de la vía glicolítica en *L. mexicana mexicana*.

*Recibido:* 13/2/2016

*Aceptado:* 3/4/2016



**PALABRAS CLAVE:** Hexocinasa, cromatografía de filtración en gel, interacciones proteína - proteína, glicosoma, *Leishmania mexicana mexicana*.

**PROTEIN - PROTEIN INTERACTIONS BETWEEN ENZYMES OF *Leishmania mexicana mexicana* GLYCOSOMES. PRELIMINARY CHARACTERIZATION**

**ABSTRACT**

*Leishmania mexicana mexicana* is one of the most important etiologic agents of cutaneous leishmaniasis in the new world, which affects millions of people mostly in poor or developing countries, creating a public health problem. This parasite shares biological characteristics with *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, among the most prominent are: the presence of glycosomes (peroxisome - like microbody), kinetoplast and RNA editing. Through gel filtration chromatography (CL6B Sepharose), we were able to characterize protein - protein interactions between enzymes of *L. mexicana mexicana* glycosome, obtaining preliminary interaction of subunits of the enzymes hexokinase (HK), phosphoglucose isomerase (PGI), phosphoglycerate kinase (PGK) and glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase (GAPDH), with different oligomerization states to mammals and other Kinetoplastidae, plus the possible interaction of HK with two other yet unidentified protein. These data will be confirmed by techniques such as co - immunoprecipitation, cross - linking or

*Recibido: 13/2/2016*

*Aceptado: 3/4/2016*

two - hybrid assay, with the aim to determine the significance of these associations and their possible role in regulating the glycolytic pathway in *L. mexicana mexicana*.

**KEYWORDS:** Hexokinase, gel filtration chromatography, protein - protein interactions, glycosome, *Leishmania mexicana mexicana*.

## INTRODUCCIÓN

Los protozoarios del género *Leishmania* son parásitos que originan la leishmaniosis, una enfermedad endémica en las regiones tropicales y subtropicales de África y las Américas, en el subcontinente Indio, en el Mediterráneo y en regiones del suroeste de Asia (1, 2). Los parásitos del género *Leishmania* presentan principalmente dos formas, denominadas promastigotes (extracelulares) y amastigotes (intracelulares). Los promastigotes se encuentran en el vector de la leishmaniosis, dípteros (flebotomos, simúlidos) hembras, y los amastigotes se encuentran en el

fagolisosoma de los macrófagos de mamíferos (1). Al igual que otros organismos pertenecientes al orden Kinetoplastidae familia Trypanosomatidae, *L. mexicana mexicana* presenta estructuras subcelulares como el cinetoplasto, el glicosoma y procesos como la transcripción discontinua o la corrección / edición del ARN, únicos en estos protozoarios. En el glicosoma se encuentran, entre otras, muchas de las enzimas de la vía glicolítica, que en *L. major* y *L. donovani* van desde la hexocinasa hasta la cinasa del fosfoglicerato (3). Los glicosomas altamente purificados se obtienen por una combinación de

Recibido: 13/2/2016

Aceptado: 3/4/2016

centrifugación diferencial y centrifugación en gradiente (4, 5). Muchas de las funciones biológicas de cualquier célula, involucran la formación de complejos proteína - proteína y en rutas metabólicas, la presencia de estos complejos multienzimáticos tienen distintos efectos cuantificables: En primer lugar, se pueden alterar propiedades cinéticas de las enzimas. De igual forma, permite la canalización del sustrato entre enzimas consecutivas de una reacción. Las interacciones proteína - proteína también pueden resultar en la formación de un nuevo sitio de unión y por último, estas interacciones pueden activar / inactivar alguna de las proteínas interactuantes (6, 7, 8). En este trabajo analizamos la existencia de interacciones proteína - proteína entre subunidades de varias enzimas del glicosoma de *L. mexicana mexicana* cepa AZV, por medio de la copurificación a

través de cromatografía de filtración en gel y los posibles papeles de dichas interacciones son mencionados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Organismos.** Promastigotes de *L. mexicana mexicana* cepa AZV, fueron cultivados en medio Schneider pH 6,8 suplementado con 20% de suero fetal bovino a baja agitación constante y a una temperatura de 28 °C (9, 10).

**Purificación de los glicosomas.**  $2 \times 10^8$  cel / mL de promastigotes fueron obtenidos a partir de medio Schneider por centrifugación a 1.000 x g por 10 min. y lavados dos veces en 10 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM Tris - HCl, 20 mM de KCl, 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM de sal disódica del ácido ethilendiaminotetracético ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), 1 mM de ditioneitol (DTT) y 0,225 M de sacarosa pH 7,2 (tampón A). Los parásitos

Recibido: 13/2/2016

Aceptado: 3/4/2016

fueron resuspendidos en tampón A y rotos con carburo de silicio en una proporción de 1:1 por peso con respecto al sedimento de las células lavadas. Un cóctel de inhibidores de proteasas (5  $\mu$ M de leupeptin, 500  $\mu$ M de fenilmetil sulfonilfluoruro (PMSF), 100  $\mu$ M de TLC (1-cloro-3-tosilamido-7-amino-L-2-heptanona), 3  $\mu$ M de E-64, 0,2  $\mu$ M de antipaína, 1  $\mu$ M de pestatina A) fue adicionado en conjunto al carburo de silicio. El grado de ruptura celular fue seguido por microscopia, hasta alcanzar aproximadamente un 90%. El macerado resultante ( $2 \times 10^{11}$  células) fue resuspendido en 60 mL de 25 mM Tris-HCl, 1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, 0,25 M de sacarosa pH 7,6 (tampón B), centrifugando dos veces a 1.000 g x 5 min. a fin de remover el carburo de silicio. El sobrenadante fue sometido a dos ciclos sucesivos de 1.000 y 5.000 g para obtener el sedimento nuclear y la fracción

granular gruesa, respectivamente. Una fracción rica en glicosomas fue obtenida a partir del sobrenadante centrifugando a 33.000 g por 20 min. a 5°C. El sedimento obtenido fue dividido en dos partes iguales y almacenados a -20°C para experimentos posteriores (4, 5). La latencia de las enzimas del glicosoma fue determinada por cuantificación de la actividad hexocinasa antes y después de la adición de 0, 1 % de Triton X - 100 y 150 mM de NaCl (5, 9, 10).

**Ensayos Enzimáticos.** La actividad PGI fue ensayada en dirección reversa por acoplamiento con un exceso de deshidrogenasa de glucosa - 6 - fosfato y cuantificando la velocidad de reducción del NADP<sup>+</sup> a 340 nm, en un espectrofotómetro de arreglo de diodos equipado con un termostato (30°C). La mezcla de ensayo contenía 1,5 mM de fructosa-6-fosfato, 6,8 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,39 mM de NADP<sup>+</sup>, 0,46 U

*Recibido: 13/2/2016*

*Aceptado: 3/4/2016*

/ mL de deshidrogenasa de glucosa - 6 - fosfato en 0,1 M de buffer TEA - HCl pH 8,0. El volumen final fue de 1 mL y la reacción fue iniciada por la adición de 10  $\mu$ L del extracto. La actividad PGI fue expresada como  $\mu$ mol de NADP<sup>+</sup> reducido por mg de proteína por minuto bajo las condiciones descritas. Las enzimas acoplantes y los sustratos fueron obtenidos de SIGMA-ALDRICH (5). Para la determinación de la actividad HK espectrofotométricamente se midió la aparición de NADPH a 340 nm. La solución de ensayo consistió de tampón 25 mM de Tris - HCl, pH 7,6, 5,5 mM de glucosa, 0,1 M de MgCl<sub>2</sub>, 0,7 mM de NADP<sup>+</sup>, 4,86 mM de ATP, 1 U / mL de la deshidrogenasa de glucosa - 6 - fosfato (G6PDH). En el caso de la malato deshidrogenasa (MDH), su actividad fue determinada espectrofotométricamente midiendo la desaparición de NADH a 340

nm. La solución de ensayo contenía tampón 0,3 M de Tris - HCl, pH 7,6, 20  $\mu$ L de una solución de 14 mg / mL de ácido oxaloacético, 0,41 mM de NADH. La actividad G6PDH fue seguida por la aparición de NADPH a 340 nm, la solución de ensayo en este caso estuvo constituida por tampón 0.1 M de Tris - HCl, pH 7,6, 1 mM de glucosa - 6 - fosfato, 0,8 mM de NADP<sup>+</sup> (10). La enzima málica fue determinada midiendo la aparición de NADPH espectrofotométricamente a 340 nm. Para acceder a la actividad se utilizó una solución de ensayo que contenía tampón 50 mM de MOPS, pH 8,0, 20 mM de malato, 0.3 mM de NADP<sup>+</sup>, 1 mM de MnCl<sub>2</sub>. Para la cuantificación de la actividad de la cinasa del fosfoglicerato (PGK) se utilizó tampón 0.1 M de Tris - HCl, pH 7,6, 20 mM de MgSO<sub>4</sub>, 1 mM de ATP, 8 mM de 3 - fosfoglicerato, 0.4 mM de NADH y se

*Recibido: 13/2/2016*

*Aceptado: 3/4/2016*

determinó la velocidad de desaparición del NADH a 340 nm. Para cuantificar la actividad de la GAPDH se midió la desaparición de NADH a 340 nm. La solución de ensayo consistió en tampón 25 mM de Tris - HCl, pH 7,6, 3 mg / mL de fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) y 12 mM de NADH (9, 10). La actividad carboxinasa del fosfoenol piruvato (PEPCK) fue determinada midiendo la desaparición de NADH a 340 nm. La solución de ensayo para esta enzima consistió en tampón 0.1 M de MOPS, pH 7,0, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de fosfoenolpiruvato, 8 mM de difosfato de adenosina, 0,1 M de bicarbonato de sodio, 0,41 mM de NADH y 2 U / mL de malato deshidrogenasa. La actividad dicinasa del fosfoenolpiruvato (PPDK) fue determinada midiendo la desaparición de NADH a 340 nm. La solución de ensayo consistió en

tampón 0, 25 M de Tris - HCl, pH 8,3, 7 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de fosfoenolpiruvato, 1 mM de monofosfato de adenosina, 5 mM de pirofosfato de sodio, 0,41 mM de NADH y 2 U / mL de deshidrogenasa del lactato (9, 10).

**Cromatografía de filtración en gel.** Una columna de Sepharosa CL6B con una altura de 75 cm, 2,5 cm de diámetro, 40 mL / h de flujo, con un rango de fraccionamiento para proteínas globulares de 10 - 4.000 kDa y rango de fraccionamiento para dextranos de 10 - 1.000 kDa fue utilizada para determinar las posibles interacciones proteínas - proteínas, mediante su copurificación. El azul dextrano (2.000 kDa) 1 mg / mL se utilizó para determinar el volumen muerto (V<sub>0</sub>) de la columna. Con los siguientes marcadores de peso molecular se realizó la curva de calibración: tiroglobulina 669 kDa (2,14 mg / mL), ferritina 440 kDa (1 mg /

*Recibido: 13/2/2016*

*Aceptado: 3/4/2016*

mL), catalasa 232 kDa (2,14 mg / mL) y aldolasa 158 kDa (2,14 mg / mL). Seguidamente, una de las fracciones ricas en glicosomas fue resuspendida en 4 mL de 20 mM Tris - HCl, 150 mM de NaCl, más 1 mL de tampón B con inhibidores de proteasas (SIGMA - ALDRICH). Posteriormente se solubilizó y homogenizó en 0.1 % de Tritón X - 100 con 150 mM de NaCl. Después de centrifugar a 33.000 g por 20 minutos a 4 °C, tanto al sobrenadante como al sedimento se les midió actividad hexocinasa con el fin de determinar la eficiencia del proceso de solubilización. La columna previamente equilibrada en 20 mM de tampón Tris - HCl

y 150 mM de NaCl a 4 °C fue cargada con los 5 mL del solubilizado anterior. Fracciones de 5 mL fueron colectadas y se determinó la actividad de las enzimas del glicosoma de *L. mexicana mexicana*. El mismo procedimiento se aplicó al sobrenadante restante equilibrando la columna con 20 mM de tampón Tris - HCl y 500mM de NaCl (9, 10).

**Cuantificación de proteínas.** La cuantificación de proteínas totales se realizó de acuerdo al método de Lowry (11). Como estándar se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1 mg / mL.

## RESULTADOS

**1).- Curva de calibración y perfil de elusión de proteínas.** En la figura 1 se muestra la curva de calibración obtenida

con los respectivos marcadores de peso molecular (1A) y el perfil de elusión de proteínas en los glicosomas obtenidos a

*Recibido: 13/2/2016*

*Aceptado: 3/4/2016*

partir de promastigotes de *L. mexicana mexicana* a las concentraciones de 150 mM y 500 mM de NaCl respectivamente (1B). El

volumen muerto de la columna fue de 160 mL.

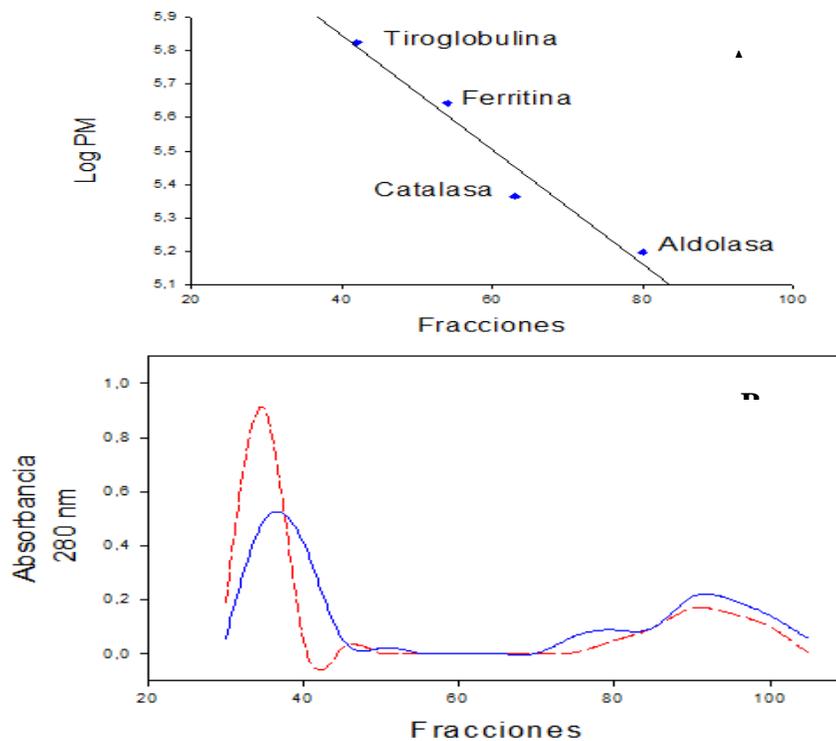


Figura 1. Curva de Calibración (A) y perfil de elusión de proteínas (B). Marcadores de peso molecular: Tiroglobulina 669 kDa, ferritina 440 kDa, catalasa 232 kDa y aldolasa 158 kDa. La línea roja discontinua representa el perfil de elusión de proteínas obtenido a una fuerza iónica de 500 mM de NaCl, la línea continua azul representa el perfil de elusión de proteínas a una fuerza iónica de 150mM de NaCl.

Recibido: 13/2/2016

Aceptado: 3/4/2016

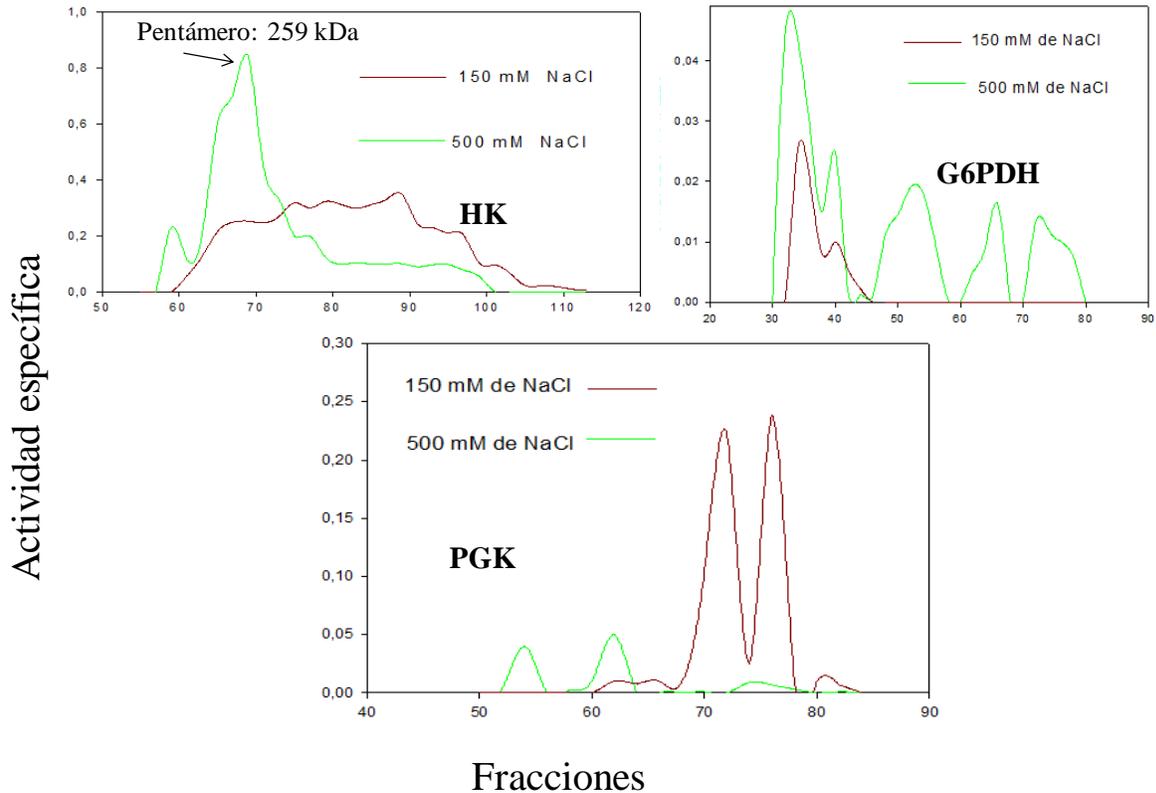


**2).- Perfil de actividades enzimáticas.** Bajo las condiciones estandarizadas solo HK, G6PDH, PGK (figura 2), PGI y y PPDK no mostraron actividades cuantificables.

GAPDH (figuras 3) evidenciaron actividad catalítica. Las enzimas PEPCK, MDH, enzima málica.

*Recibido: 13/2/2016*

*Aceptado: 3/4/2016*

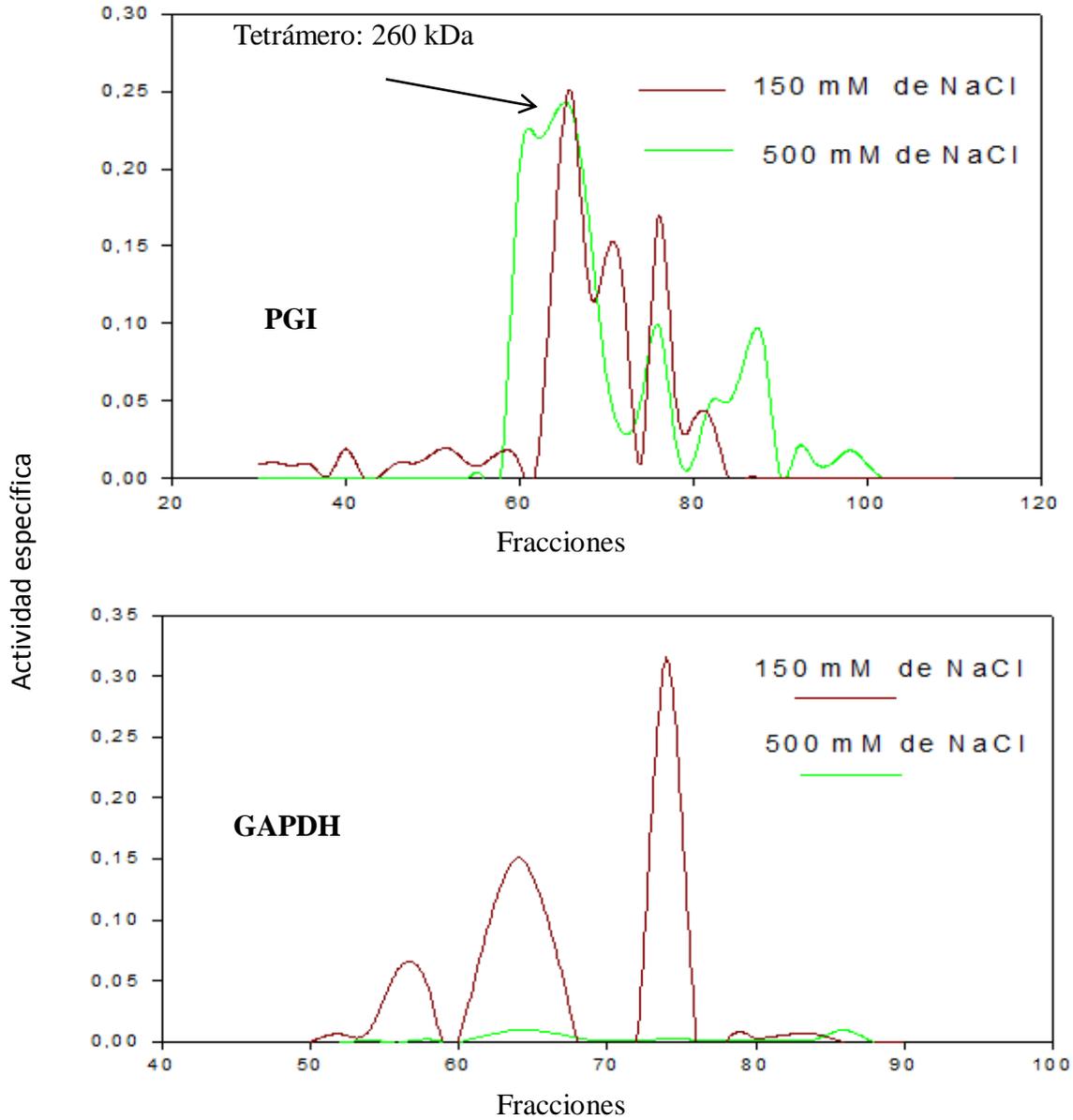


Figur

a 2. Perfil de Elusión de la hexocinasa (HK), deshidrogenasa de glucosa - 6 - fosfato (G6PDH) y cinasa del fosfoglicerato (PGK) de *L. mexicana mexicana* a dos concentraciones distintas de NaCl. La línea rojo oscuro corresponde al perfil de elusión a 150 mM de NaCl y la línea verde corresponde al perfil de elusión a 500mM de NaCl. En el subgráfico correspondiente a la HK se destaca la presencia de un posible pentámero con una masa molecular aparente de 259 kDa.

Recibido: 13/2/2016

Aceptado: 3/4/2016



Recibido: 13/2/2016

Aceptado: 3/4/2016

**Figura 3. Perfil de Elusión de la PGI y GAPDH de *L. mexicana mexicana* bajo dos fuerzas iónicas diferentes. La línea rojo oscuro corresponde al perfil de elusión a 150mM de NaCl, la línea verde corresponde al perfil de elusión a 500mM de NaCl. En el subgráfico correspondiente a la PGI se destaca la presencia de un posible tetrámero con una masa molecular aparente de 260 kDa.**

## DISCUSIÓN

Los estudios bioquímicos clásicos basan sus conclusiones en las propiedades cinéticas de enzimas purificadas bajo condiciones naturales o mediante técnicas de ingeniería genética (enzimas recombinantes), este no es el ambiente celular real, donde las proteínas están en estrecha relación unas con otras y la posibilidad de interacciones de alta o baja afinidad es bastante probable, entre subunidades de las mismas enzimas o con otras proteínas de rutas metabólicas comunes o disímiles. Este hecho ha abierto un amplio campo de estudio en los sistemas metabólicos celulares (6, 7, 8). En Trypanosomatidae el glicosoma puede ser visto como un cristaloides, denso, con un conjunto de enzimas de la ruta glicolítica

formando un gran complejo, no regulado por las concentraciones de glucosa - 6 - fosfato, ATP / ADP, fructosa - 2, 6 - bifosfato, en las denominadas enzimas limitantes de tasa: hexocinasa y fosfofructocinasa. Esto plantea algunas interrogantes, sobre los posibles mecanismos celulares para el control del flujo glicolítico, debido al alto consumo de glucosa observado en *T. brucei brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania* spp. (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Otra característica notoria ocurre en promastigotes (*Leishmania* spp.) y epimastigotes (*T. cruzi*) mantenidos en medios de cultivo en presencia de oxígeno, donde la glucosa consumida por estos protozoos es parcialmente oxidada hasta CO<sub>2</sub> y el resto de átomos de carbono son excretados como ácidos mono, di o

Recibido: 13/2/2016

Aceptado: 3/4/2016

tricarboxílicos principalmente acetato, piruvato y succinato (lo cual varía entre géneros, especies y formas evolutivas de los Trypanosomatidae), en un proceso denominado fermentación aeróbica (12, 19). Este hecho es controversial, porque se han caracterizado todas las enzimas de la ruta glicolítica, *Leishmania* spp. posee un ciclo de Krebs funcional y una cadena de transporte de electrones acoplada a la fosforilación oxidativa, entonces: ¿por qué se pierden electrones y carbonos útiles de la glucosa, excretando acetato y piruvato al medio? (20, 21, 22). El succinato excretado al medio por protozoarios de la familia Trypanosomatidae implica una vía oxidativa, no involucra la reducción del fumarato que se ha reportado en parásitos pluricelulares (helminos) (20). Otra de las particularidades del metabolismo glicolítico en Trypanosomatidae, como *Leishmania*

spp. es el punto de bifurcación en el fosfoenolpiruvato (PEP). La vía principal implica el reingreso de PEP del citosol hasta el glicosoma, para lo cual debe existir un transportador en membrana de los glicosomas. El PEP es convertido hasta oxaloacetato vía PEPCK con la consecuente formación de ATP. El oxaloacetato vía la deshidrogenasa del malato rinde malato y  $\text{NAD}^+$ . Este malato alcanza citosol y vía enzima málica forma piruvato y poder redox (oxidoreducción) bajo la forma de NADPH (útil en las reacciones de biosíntesis). Parte del piruvato es excretado al medio, parte ingresa al ciclo de Krebs y otra parte es transformada hasta acetato. La vía metabólica accesoria o secundaria implica la conversión de PEP hasta piruvato, en una reacción catalizada por la cinasa del piruvato (PK). Aquí existe una notoria diferencia entre las células de vertebrados y

Recibido: 13/2/2016

Aceptado: 3/4/2016

Trypanosomatidae, que utilizan esta última vía como la principal en el metabolismo de la glucosa (20, 21, 22). Según datos publicados por Pabón *et al.*, (10) la masa molecular nativa aparente del tetrámero de la hexocinasa en *L. mexicana mexicana* es de 198 kDa. Nosotros encontramos en el perfil de elusión de la hexocinasa a 500 mM de NaCl (figura 2) la existencia de un posible pentámero con una masa molecular aparente de 259 kDa. Sin embargo, a menor fuerza iónica (150 mM de NaCl) parecen existir interacciones iónicas entre la HK y otras proteínas desconocidas que posiblemente estén retardando la migración de esta enzima, lo cual podría explicar el amplio rango de fracciones en las cuales se encuentra la actividad enzimática (figura 2) a diferencia de lo observado a 500 mM de NaCl, donde se favorecen las interacciones hidrofóbicas entre subunidades de la misma

enzima. En *T. cruzi* (9) y *L. mexicana mexicana* (10) la hexocinasa eluye junto con dos proteínas con masas moleculares aparentes entre 40 y 60 kDa. Estas interacciones pueden ser las responsables de la aparición de un posible complejo. Por otra parte, estos resultados también pueden sugerir la existencia de diferentes estados de oligomerización de la enzima, lo cual podría indicar que desde el punto de vista fisiológico la vía glicolítica en *L. mexicana mexicana* y *T. cruzi*, estaría regulada de una forma distinta a la encontrada en las hexocinasas clásicas, posiblemente mediante mecanismos de histéresis (23). La PGI posee una ubicación subcelular dual en *L. mexicana mexicana* y *T. cruzi* en citosol y en el glicosoma, a diferencia de la enzima de *T. brucei brucei* que es exclusiva del glicosoma. La PGI es una enzima soluble, con diferencias en punto isoelectrico, rango

Recibido: 13/2/2016

Aceptado: 3/4/2016

de pH óptimo y propiedades cromatográficas (24, 25). En *T. cruzi* la PGI es un trímero con una masa molecular aparente de 186 kDa (24) a diferencia de otros modelos de estudio, como el caso de mamíferos donde ésta enzima es predominantemente un dímero (26, 27). Como puede observarse en la figura 3, la PGI de *L. mexicana mexicana* muestra el mismo comportamiento de elusión en ambas concentraciones de NaCl en un estado de oligomerización de tetrámero (260 kDa) en contraste con lo reportado para *T. cruzi* (24). Un experimento con una fuerza iónica menor a 150 mM NaCl es necesario a fin de corroborar este posible tetrámero. Para la G6PDH (figura 2) se encontró poca actividad enzimática y diversos estados de agregación atípicos que van desde 103.2 hasta 223 kDa. Para la PGK y GAPDH (figuras 2 y 3 respectivamente) se encontró

una pérdida total de actividad a 500 mM de NaCl. A una concentración de 150 mM de NaCl, encontramos el predominio de un tetrámero para la PGK (según peso del monómero 50 kDa en *L. mexicana mexicana*), mientras que para la GAPDH predominan las formas de pentámero (194 kDa) y hexámero (248 kDa). La importancia de los trabajos destinados a buscar diferencias entre las enzimas de protozoarios patógenos con respecto a su contraparte en seres humanos, abre un camino importante para el diseño racional de nuevas drogas preventivas o curativas en leishmaniosis y otras enfermedades parasitarias. Hannaert *et al.*, (28) en promastigotes de *Leishmania mexicana* evidenciaron que la GAPDH se ubicó en dos compartimientos subcelulares del parásito. Estas actividades podrían atribuirse a dos isoenzimas diferentes, una residente en el glicosoma y la otra en el

Recibido: 13/2/2016

Aceptado: 3/4/2016

citósol. Los autores procedieron al clonado y secuenciado de los genes para ambas isoenzimas. La enzima glicosomal está codificada por dos genes unidos en tandem con una secuencia idéntica y contienen características que se encuentran con frecuencia en las enzimas del glicosoma: la presencia de inserciones de péptidos, una pequeña extensión carboxilo-terminal con una secuencia señal de importación (-SKM) y un exceso de residuos con cargas positivas. Solo un marco de lectura abierto fue detectado para la enzima citosólica. Las secuencias de aminoácidos de las dos proteínas poseen solo un 55% de similitud. El conocimiento detallado de la estructura de la GAPDH permitió el diseño de un inhibidor selectivo, designado como 2' - desoxi - 2' - (3 - metoxibenzamido) adenosina, tomando en cuenta la estructura en hendidura de la enzima de

Trypanosomatidae. Este compuesto inhibió la GAPDH de humanos solo marginalmente, mientras que las enzimas de *T. brucei* y *L. mexicana* fueron inhibidas hasta un 50% a concentraciones de 2,2 y 0,3 mM, respectivamente. Por otra parte, la inhibición de la enzima de los parásitos fue de 45 veces para *T. brucei* o 170 veces en el caso de *L. mexicana*, lo cual indicó una mayor inhibición con este análogo sustituido que la producida con la adenosina solamente (29).

## CONCLUSIÓN

Según el procedimiento de filtración en gel estandarizado, la mayoría de las enzimas estudiadas interactúan con subunidades de sí mismas, solo en el caso de HK podemos inferir asociación con otras dos proteínas distintas. Nuestros resultados necesitan ser corroborados por técnicas de coimmunoprecipitación, ensayo de dos

Recibido: 13/2/2016

Aceptado: 3/4/2016

híbridos, entrecruzamiento, entre otros, a fin de corroborar de forma inequívoca la existencia de interacciones proteína - proteína entre las enzimas del glicosoma de *L. mexicana mexicana*.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación FONACIT, en el marco de La Misión Ciencia. De igual forma damos las gracias a los integrantes del laboratorio de Enzimología de Parásitos de la Universidad de Los Andes, Mérida, estado Mérida por su valiosa colaboración en la realización de los experimentos.

Recibido: 13/2/2016

Aceptado: 3/4/2016

### REFERENCIAS

1. Bates PA. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* 1994, 79 (2): 215-218.
2. Handman E. Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol* 1999, 44: 1-39.
3. Blum JJ. Intermediary metabolism of *Leishmania*. *Parasitol Today* 1993, 9 (4): 118-122.
4. Opperdoes FR, Baudhuin P, Coppens I, De Roe C, Edwards SW, Weijers PJ, Misset O. Purification, morphometric analysis and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate. *J Cell Biol* 1984, 98 (4): 1178-1184.
5. Concepción JL, Adje CA, Quiñónez W, Chevalier N, Dubourdieu M, Michels PA. The expression and intracellular distribution

of phosphoglycerate kinase isoenzymes in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 2001, 118 (1): 111-121.

6. Torres NV, Mateo F, Meléndez-Hevia E, Kacser H. Kinetics of metabolic pathways. A system in vitro to study the control of flux. Biochem J 1986. 234 (1): 169-174.

7. Phizicky EM, Fields S. Protein - protein interactions: Methods for detection and analysis. Microbiol Rev 1995, 59 (1): 94-123.

8. Poolman MG, Fell DA, Thomas S. Modeling photosynthesis and its control. J Exp Bot 2000, 51(Spec No): 319-328.

9. Cáceres AJ, Quiñónez W, Gualdrón M, Cordeiro A, Avilán L, Michels PA, Concepción JL. Molecular and biochemical characterization of novel glucokinases from *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp.

Mol Biochem Parasitol 2007, 156 (2): 235-245.

10. Pabón MA, Cáceres AJ, Gualdrón M, Quiñónez W, Avilán L, Concepción JL. Purification and characterization of hexokinase from *Leishmania mexicana*. Parasitol Res 2007, 100 (4): 803-810.

11. Lowry OH, Rosebrongn NJ, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951, 193 (1): 265-275.

12. Cazzulo JJ, Franke de Cazzulo BM, Engel JC, Cannata JJ. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol 1985, 16 (3): 329-343.

13. Langford CK, Burchmore RJ, Hart DT, Wagner W, Landfear SM. Biochemistry and molecular genetics of *Leishmania* glucose

Recibido: 13/2/2016

Aceptado: 3/4/2016

transporters. *Parasitol* 1994, 108 (Suppl): S73-83.

14. Bakker BM, Michels PA, Opperdoes FR, Westerhoff HV. What controls glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*? *J Biol Chem* 1999, 274 (21): 14551-14559.

15. ter Kuile BH. Regulation and adaptation of glucose metabolism of the parasitic protist *Leishmania donovani* at the enzyme and mRNA levels. *J Bacteriol* 1999, 181 (16): 4863-4872.

16. Bringaud F, Riviere L, Coustou V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol* 2006, 149 (1): 1-9.

17. Rodríguez - Contreras D, Feng X, Keeney KM, Bouwer HG, Landfear SM. Phenotypic characterization of a glucose transporter null mutant in *Leishmania*

*mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 2007, 153 (1): 9-18.

18. Van Hellemond JJ, Hoek A, Wichgers Schreur P, Chupin V, Özdirekcan S, Geysen D, Van Grinsven KW, Koets AP, Van den Bossche P, Geerts S, Tielens AG. Energy metabolism of bloodstream form *Trypanosoma theileri*. *Eukaryot Cell* 2007, 6 (9): 1693-1696.

19. Cazzulo JJ. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FASEB J* 1992, 6 (13): 3153-3161.

20. Tielens AG, Van Hellemond JJ. Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. *Parasitol Today* 1998, 14 (7): 265-272.

21. Michels PA, Hannaert V, Bringaud F. Metabolic aspects of glicosomes in trypanosomatidae -new data and views. *Parasitol Today* 2000, 16 (11): 482-489.

*Recibido: 13/2/2016*

*Aceptado: 3/4/2016*

22. Urbina JA. Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Today 1994, 10 (3): 107-110.
23. Acosta H, Cáceres A, González-Marcano E, Quiñones W, Avilán L, Dubourdiou M, Concepción JL. Hysteresis and positive cooperativity as possible regulatory mechanisms of *Trypanosoma cruzi* hexokinase activity. Mol Biochem Parasitol 2014, 198(2): 82-91.
24. Concepcion JL, Chataing B, Dubourdiou M. Purification and properties of phosphoglucose isomerases of *Trypanosoma cruzi*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 1999, 122 (2): 211 - 222.
25. Nyame K, Do-Thi CD, Opperdoes FR, Michels PA. Subcellular distribution and characterization of glucosephosphate isomerase in *Leishmania mexicana mexicana*. Mol Biochem Parasitol 1994, 67 (2): 269 - 279.
26. Claes V, Kettmann R, Burny A. Structure of the gene encoding pig phosphoglucose isomerase. Gene 1994, 150 (2): 235 - 241.
27. Cordeiro AT, Godoi PH, Delboni LF, Oliva G, Thiemann OH. Human phosphoglucose isomerase: expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2001, 57 (Pt4): 592-595.
28. Hannaert V, Blaauw M, Kohl L, Allert S, Opperdoes FR, Michels PA. Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana mexicana*. Mol Biochem Parasitol 1992, 55 (1-2): 115-126.
29. Callens M, Hannaert V. The rational design of trypanocidal drugs: selective

Recibido: 13/2/2016

Aceptado: 3/4/2016



inhibition of the glyceraldehydes - 3 -  
phosphate dehydrogenase in

Trypanosomatidae. Ann Trop Med Parasitol  
1995, 89 (Suppl 1): 23-30.

*Recibido: 13/2/2016*

*Aceptado: 3/4/2016*