



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISIS ESTRUCTURAL *IN SILICO* DE MUTACIONES EN
AMINOÁCIDOS DE LA ENOLASA DE *Trypanosoma cruzi*
IMPORTANTES EN LA INTERACCIÓN TCENO-COLÁGENO

Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biotecnología

PRESENTA:

C. Francisco Tovar Olivares

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Alejandro Carabarán Lima

CODIRECTOR DE TESIS:

Dra. María Cristina González Vázquez

PUEBLA, PUEBLA. 05/22

Agradecimientos

Quisiera utilizar este espacio para agradecer a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo a lo largo de toda la carrera y que hicieron posible que llegara hasta aquí.

En primer lugar, quisiera agradecer al Dr. Alejandro Carabarán Lima, quien es un referente en cuanto a la investigación en *Trypanosoma cruzi* y que fue un excelente profesor y asesor de tesis, le agradezco todo el conocimiento que fue capaz de transmitirme a lo largo de estos años, y la gran labor que hizo al asesorarme con mi tesis, sin sus consejos y explicaciones no hubiera sido posible realizarla. De igual forma quiero agradecer a la Dra. María Cristina González Vázquez, quien junto al Dr. Carabarán me dio la bienvenida a su laboratorio y a este gran proyecto. Así mismo quiero mostrar mi agradecimiento a esta gran institución que es la BUAP, la cual me abrió las puertas y me dio la oportunidad de conocer a mucha gente increíble, tanto profesores como amigos.

Igualmente quiero aprovechar para agradecerle a mis padres Anahí Olivares Skewes y Arnulfo Tovar Fernández, los cuales me han brindado su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida, dándome su amor y sus consejos, ya que sin ellos hubiera sido imposible llegar hasta donde estoy, siempre estaré en deuda con ustedes, muchas gracias. Y a mi hermana Ela, por soportarme siempre a pesar de mi mal humor y mis malos chistes, gracias por todo.

Finalmente quiero darle las gracias a una persona muy especial e importante en mi vida, mi novia Paty, siempre estás ahí para mí, brindándome tu apoyo y cariño, dándome confianza cuando más la necesito. Me has enseñado tantas cosas que ni si quiera sabría por dónde empezar, muchas gracias por todo, te amo.

Es un hecho que no sería la persona que soy hoy sin toda la gente que he conocido y que me ha enseñado y ayudado tanto a lo largo de mi vida. Hay tanta gente que no he podido mencionar, pero siempre los tendré presentes, y siempre estaré agradecido con todos ustedes.

Índice

Índice de ilustraciones.....	ii
Índice de Tablas.....	vi
Índice de Abreviaturas.....	vi
Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1. Enfermedad de Chagas.....	2
1.2 Sintomatología.....	4
1.3 Epidemiología.....	6
1.4 <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
1.5 Patogénesis.....	8
1.6 Enolasa.....	13
1.7 Colágeno.....	16
2. Antecedentes.....	18
2.1 Antecedentes Generales.....	18
2.2 Antecedentes directos.....	22
3. Justificación.....	24
4. Hipótesis.....	25
5. Objetivo General.....	25
6. Objetivos Específicos.....	25
7. Materiales y Métodos.....	26
7.1 Selección de estructuras.....	26
7.2 Preparación de las estructuras.....	27
7.3 Docking de la enolasa Wild Type.....	27
7.4 Análisis del Docking de la enolasa Wild type.....	28
7.5 Elaboración de las mutaciones de la enolasa de <i>T. cruzi</i>	29
7.6 Docking de las mutaciones Puntuales.....	30
7.7 Análisis de las Mutaciones Puntuales.....	30
7.8 Elaboración de las mutantes múltiples.....	30
7.9 Docking de las mutantes múltiples.....	31
7.10 Análisis de las mutaciones múltiples.....	31
8. Resultados.....	31
8.1 Docking enolasa wild type-Colágeno cadena A.....	32

8.2 Docking enolasa wild type-Colágeno cadena B.....	33
8.3 Docking enolasa wild type-Colágeno cadena C	33
8.4 Análisis del Docking enolasa wild type-Colágeno cadena C	34
8.5 Docking de la Mutante 1 (D ₈₁ A)	38
8.6 Docking de la Mutante 2 (L ₈₃ A).....	40
8.7 Docking de la mutante 3 (S ₈₆ A)	43
8.8 Docking de la mutante 4 (T ₈₇ A)	46
8.9 Docking de la mutante 5 (K ₉₀ A)	48
8.10 Docking de la Mutante 6 (D ₉₄ A).....	51
8.11 Docking de la mutante 7 (K ₁₂₄ A).....	53
8.12 Docking de la mutante 8 (D ₉₄ A-K ₁₂₄ A).....	55
8.13 Docking de la mutante 9 (D ₈₁ A-D ₉₄ A-K ₁₂₄ A).....	61
8.14 Docking de la mutante 10 (L ₈₃ A-D ₉₄ A-K ₁₂₄ A).....	65
9. Discusión	71
10. Conclusiones.....	80
11. Perspectivas	80
12. Bibliografía	81

Índice de ilustraciones

No. De Ilustración	Título	No. De página
1	Fotografía de un insecto triatomino	2
2	Infografía medios de transmisión de la enfermedad de Chagas	3
3	Fotografía de Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas	3
4	Fotografía de un paciente que presenta signo de Romaña	4
5	Manifestaciones clínicas producidas por enfermedad de Chagas crónica en el corazón	5
6	Mapa de las zonas endémicas donde habitan los insectos triatominos	6
7	Mapa de la distribución mundial de la enfermedad de Chagas	7
8	Micrografía de <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
9	Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
10	Mecanismo de infección de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13

11	Estructura tridimensional de la enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
12	Mecanismo de invasión de patógenos y otras células haciendo uso de la colagenasa	16
13	Células PE089 y LLC/luc embebidas en matrigel	19
14	Gráficas que muestran la afinidad de las células CFPAC-1-shCTRL y CFPAC-1-shENO1 por diferentes proteínas de la matriz extracelular	20
15	Imagen 3D de la enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
16	Imagen 3D del colágeno tipo I de Humano.	28
17	Modelo 3D del Docking entre la enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> y la cadena C del colágeno humano	35
18	Modelo 3D de los aminoácidos de la enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> a 5Å o menos de la cadena C de colágeno humano	36
19	Modelo 3D que muestra las interacciones polares entre la cadena C de colágeno humano y residuos de la enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
20	Modelo 3D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno y los residuos aminoacídicos de la enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
21	Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y los residuos: D81, S86, T87 y L88 de la enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
22	Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo: K90 de la enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
23	Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo: D94 de la enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
24	Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo: K124 de la enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
25	Modelo 3D del Docking entre la mutante D81 y la cadena C de colágeno Humano	39
26	Imagen de los aminoácidos de la enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> a una distancia de 5Å o menos de la cadena C de colágeno	41
27	modelo 3D de las interacciones polares entre los residuos de la mutante D81 de la enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> y la cadena C de colágeno	41
28	Modelo 3D del Docking de la segunda mutante creada a partir de la enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	42
29	Modelo 3D del Docking de la mutante D83, donde se observan los aminoácidos de la mutante a menos de 5Å del colágeno	43
30	Modelo 3D de la mutante L83 que muestra los residuos que están llevando a cabo interacciones polares con la cadena de colágeno	44

31	Modelo 3D del Docking entre la mutante S86 y la cadena C de colágeno humano.	44
32	Imagen 3D de los aminoácidos de la mutante S86 a menos de 5Å de la cadena C de colágeno	46
33	Imagen 3D de los aminoácidos de la mutante S86 llevando a cabo interacciones polares con la cadena C de colágeno humano	46
34	Modelo 3D del Docking entra la mutante T87 y la cadena C de colágeno humano	47
35	Imagen 3D que muestra los aminoácidos de la mutante T87 dentro del rango de interacción con la cadena C de colágeno humano	48
36	Imagen 3D de los aminoácidos de la mutante T87 llevando a cabo interacciones polares con la cadena C de colágeno	49
37	Modelo 3D del Docking entre la mutante K90 y la cadena C de colágeno humano	49
38	Modelo 3D del Docking entre la enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> y la cadena C de colágeno	51
39	Imagen 3D de los residuos aminoácídicos de la mutante K90 llevando a cabo interacciones polares con la cadena C de colágeno humano	51
40	Modelo 3D del Docking entre la mutante D94 y la cadena C de colágeno Humano	52
41	Imagen 3D de los aminoácidos de la mutante D94 dentro del perímetro de interacción con la cadena C de colágeno humano	53
42	Imagen que muestra los aminoácidos de la mutante D94 llevando a cabo interacciones polares con la cadena C de colágeno humano	53
43	Modelo 3D del Docking entre la mutante K124 creada a partir de la enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> y la cadena C de colágeno humano	54
44	Imagen de los aminoácidos de la mutante K124 a 5Å o menos de la cadena C de colágeno Humano	55
45	Imagen de los aminoácidos de la mutante K124 llevando a cabo interacciones polares con la cadena C de colágeno humano	56
46	Modelo 3D del Docking entre la mutante D94K124 creada a partir de la enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> y la cadena C de colágeno humano	56
47	Imagen de los aminoácidos de la mutante D94K124 que se encuentran a una distancia de 5Å o menor de la cadena C de colágeno Humano	58
48	Imagen 3D de los aminoácidos de la mutante D94K124 llevando a cabo interacciones de tipo polar con la cadena C de colágeno humano	58
49	Imagen 3D de las interacciones de tipo no polar que se están llevando a cabo entre los residuos de la mutante D94K124 y la cadena C de colágeno humano	59

50	Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo Q ₈₄ de la mutante D ₉₄ K ₁₂₄ .	59
51	Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo T ₈₇ de la mutante D ₉₄ K ₁₂₄ .	60
52	Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo K ₉₀ de la mutante D ₉₄ K ₁₂₄ .	60
53	Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y los residuos E ₁₃₄ , K ₁₃₉ y E ₁₄₀ de la mutante D ₉₄ K ₁₂₄ .	61
54	Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo E ₃₅₅ de la mutante D ₉₄ K ₁₂₄ .	61
55	Modelo 3D del Docking entre la mutante D ₈₁ D ₉₄ K ₁₂₄ y la cadena C de colágeno humano	62
56	Imagen de los residuos aminoacídicos de la mutante D ₈₁ D ₉₄ K ₁₂₄ a una distancia de 5Å o menos de la cadena C de colágeno humano	63
57	Imagen de los aminoácidos de la mutante D ₈₁ D ₉₄ K ₁₂₄ llevando a cabo interacciones polares con la cadena C de colágeno humano	64
58	Imagen 3D de los residuos aminoacídicos de la mutante D ₈₁ D ₉₄ K ₁₂₄ llevando a cabo interacciones de tipo no polar con la cadena C de colágeno humano	64
59	Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y los residuos G ₇₉ , K ₈₀ , E ₈₂ , S ₈₆ y T ₈₇ de la mutante D ₈₁ D ₉₄ K ₁₂₄ .	65
60	Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo E ₁₃₄ de la mutante D ₈₁ D ₉₄ K ₁₂₄	65
61	Modelo 3D del Docking entre la mutante L ₈₃ D ₉₄ K ₁₂₄ creada a partir de la enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> y la cadena C de colágeno humano	66
62	Imagen de los aminoácidos de la mutante L ₈₃ D ₉₄ K ₁₂₄ que se encuentran a 5Å o menos de la cadena C de colágeno humano	67
63	Imagen que muestra los aminoácidos de la mutante L ₈₃ D ₉₄ K ₁₂₄ llevando a cabo interacciones no polares con la cadena C de colágeno humano	68
64	Imagen que muestra los aminoácidos de la mutante L ₈₃ D ₉₄ K ₁₂₄ llevando a cabo interacciones de tipo no polar con la cadena C de colágeno humano	68
65	Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo T ₈₇ de la mutante L ₈₃ D ₉₄ K ₁₂₄	69
66	Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo K ₉₀ de la mutante L ₈₃ D ₉₄ K ₁₂₄ .	69

67	Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo L ₁₃₅ de la mutante L ₈₃ D ₉₄ K ₁₂₄	70
68	Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo R ₉₃ de la mutante L ₈₃ D ₉₄ K ₁₂₄ .	70
69	Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo K ₃₅₈ de la mutante L ₈₃ D ₉₄ K ₁₂₄ .	71

Índice de Tablas

No. De Tabla	Título	Página
1	Puntajes obtenidos del Docking entre la enolasa Wild type de <i>T. cruzi</i> y la cadena A de colágeno Humano.	34
2	Puntajes obtenidos del Docking entre la enolasa Wild type de <i>T. cruzi</i> y la cadena B de colágeno Humano.	34
3	Puntajes obtenidos del Docking entre la enolasa Wild type de <i>T. cruzi</i> y la cadena C de colágeno Humano.	35
4	Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 1 creada a partir de la enolasa de <i>T. cruzi</i> y la cadena C de colágeno Humano.	40
5	Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 2 creada a partir de la enolasa de <i>T. cruzi</i> y la cadena C de colágeno Humano.	43
6	Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 3 creada a partir de la enolasa de <i>T. cruzi</i> y la cadena C de colágeno Humano	45
7	Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 4 creada a partir de la enolasa de <i>T. cruzi</i> y la cadena C de colágeno Humano.	48
8	Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 5 creada a partir de la enolasa de <i>T. cruzi</i> y la cadena C de colágeno Humano	50
9	Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 6 creada a partir de la enolasa de <i>T. cruzi</i> y la cadena C de colágeno Humano.	53
10	Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 7 creada a partir de la enolasa de <i>T. cruzi</i> y la cadena C de colágeno Humano	55
11	Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 8 creada a partir de la enolasa de <i>T. cruzi</i> y la cadena C de colágeno Humano	57
12	Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 9 creada a partir de la enolasa de <i>T. cruzi</i> y la cadena C de colágeno Humano	63
13	Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 9 creada a partir de la enolasa de <i>T. cruzi</i> y la cadena C de colágeno Humano.	67
14	Puntajes obtenidos de los múltiples Docking entre las mutantes de la enolasa de <i>T. cruzi</i> y la cadena C de colágeno Humano	71

Índice de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>

<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>B. bovis</i>	<i>Babesia bovis</i>
<i>B. alsatica</i>	<i>Bartonella alsatica</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
D/ Asp	Ácido Aspártico
L/ Leu	Leucina
R/ Arg	Arginina
K/ Lys	Lisina
S/ Ser	Serina
A/ Ala	Alanina
T/ Thr	Treonina
Q/ Gln	Glutamina
G/ Gly	Glicina
E/ Glu	Ácido glutámico
P/ Pro	Prolina
H/ His	Histidina
V/ Val	Valina
N/ Asn	Asparagina
M/ Met	Metionina
Kcal/Mol	Kilo calorías por Mol
Kd	Constante de Disociación
nM	Nano Molar
µg	Microgramos
mL	Mililitros
KDa	Kilo dáltones
nm	Nanómetro
Å	Armstrong
µL	Microlitros
3D	Tres dimensiones
2D	Dos dimensiones
ΔG	Energía libre de Gibbs
pH	Potencial de Hidrógeno
ATP	Adenosín Tri Fosfato
IP3	Inositol 3 fosfato
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
PGA	Fosfo-D-glicerato
PEP	Fosfoenol piruvato
PE	Ficoeritrina
DAPI	Diamidino-2-fenilindol
DQ-colágeno	Colágeno fluorogénico
PLC	Fosfolipasa C
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IgG	Inmuno globulina G
Ca	Calcio
Mg	Magnesio
ENO	enolasa
ENO 1	Alfa enolasa
ENO 2	Gama enolasa

ENO 3	Beta enolasa
ENOA1	enolasa de <i>L. plantarum</i>
rENOA1	enolasa recombinante de <i>L. plantarum</i>
mENO1-Ab	Anticuerpo específico contra enolasa marcada isotópicamente
shCTR	Células silenciadas mediante un shRNA revuelto
shENO	Células con el gen de la enolasa silenciado mediante shRNA
shRNA	Short hairpin RNA
TcENO	enolasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
rTcENO	enolasa recombinante de <i>Trypanosoma cruzi</i>
Anti-rTcENO	Anticuerpo anti-rTcENO
Anti-His	Anticuerpo anti-histidina
aa	aminoácidos
gp	Glicoproteínas
TS	Trans-sialidasas
ECM	Matriz extracelular
TLR	Toll-Like Receptors
COL1	Colágeno tipo 1
COL3	Colágeno tipo 3
PDA	Líneas Celulares de cáncer de páncreas
CEPAC-1	Línea celular de cáncer de páncreas
GST	Glutación serin transferasa
TcPV	Vacuola acídica parasitófora de <i>T. cruzi</i>
HIF-1	Factor inducible de hipoxia 1
PE089	Línea celular humana de cáncer de pulmón
LLC/luc	Células de carcinoma de pulmón de Lewis transfectadas con el gen de la luciferasa
A549/luc	Células de carcinoma de pulmón transfectadas con el gen de la luciferasa
BSA	Albúmina de suero bovino
CDC	Centers for disease control and prevention
RMSD	Root mean square deviation
MALDI-TOF	Desorción laser asistida por matriz- tiempo de vuelo
PDB	Protein Data Bank
HADDOCK	High Ambiguity Driven Protein-Protein Docking
RCSB-PDB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Resumen

La enfermedad de Chagas es una enfermedad tropical desatendida, endémica de Sudamérica que ocasiona miles de muertes por año y para la cual aún no existe una cura en su fase crónica. Esta enfermedad es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido a los humanos mediante insectos vectores llamados “chinches besuconas”. Este microorganismo cuenta con un amplio repertorio de mecanismos de infección e invasión que permiten la entrada del parásito a las células humanas haciéndolo altamente evasivo y peligroso. La enolasa es una proteína de alta importancia para este patógeno, debido a que juega un rol de vital importancia dentro del metabolismo de este parásito y además presenta diversas funciones dentro de su mecanismo de infección. Se ha propuesto que al igual que en otros microorganismos patógenos, una de las funciones de esta enzima es la unión a colágeno; es por ello, que es de suma importancia conocer el sitio de unión de la enolasa de *Trypanosoma cruzi* al colágeno humano y los aminoácidos que desempeñan un papel primordial en esta interacción. Para ello en este trabajo se realizaron mutaciones puntuales y múltiples en la secuencia aminoacídica de la enolasa de *T. cruzi*, donde se cambiaron residuos aminoacídicos en el sitio de interacción de la enolasa con colágeno por alaninas, y de esta forma se crearon 10 mutantes diferentes con las cuales se llevaron a cabo múltiples Docking proteína-proteína con la cadena C de colágeno humano, con la finalidad de medir el impacto que tuvo la mutación de dichos residuos en la afinidad de la enolasa por el colágeno. Al llevar a cabo el análisis de estos Docking, se concluyó que los residuos aminoacídicos que tuvieron un mayor impacto en la afinidad de la enolasa de *T. cruzi* por la cadena C de colágeno humano fueron: D₈₁, L₈₃, D₉₄ y K₁₂₄. Siendo la triple mutante 10 (D₈₁A-D₉₄A-K₁₂₄A) la que mayor vio afectada su afinidad por el colágeno humano, llegando inclusive a presentar colisiones estéricas con esta.

1. Introducción

1.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis Americana es una enfermedad zoonótica potencialmente mortal, la cual afecta en su fase crónica mayormente a la población de entre 30-50 años, es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido a humanos mediante insectos vectores hematófagos conocidos como Triatominos o “chinchas besuconas”, los cuales habitan típicamente en las paredes o en grietas en el techo de las casas, así como en gallineros, corrales e invernaderos en zonas rurales o suburbanas. [1, 2, 3, 4]



Ilustración 1: Fotografía de un insecto Triatomino o “chinche besucona”. Principal vector de la enfermedad de Chagas.

Las chinchas besuconas portadoras del tripanosomátido, transmiten el parásito a través de sus heces fecales, las cuales pueden tener contacto con el hospedero a través de las membranas mucosas o lesiones en la piel; provocadas por la probóscide del triatomino, en el momento en que las personas se rascan o frotan de forma accidental las heces conteniendo los parásitos contra sus ojos, nariz, o bien la herida de la picadura del insecto en la piel. De igual forma han reemergido diferentes rutas de transmisión del parásito entre la población, la cual puede llegar a infectarse mediante transmisión vertical o congénita entre el feto y la madre, transfusiones sanguíneas con sangre contaminada, trasplantes de órganos, consumo de comida sin cocinar que esté contaminada con las heces fecales u orina

de las chinches infectadas (causando brotes de transmisión alimentaria, llegando a infectar grupos de personas simultáneamente, y donde se presenta una morbilidad más severa y una mortalidad más alta, causando un mayor número de muertes) y de forma menos común mediante la exposición en un laboratorio. [1, 2, 3,4].

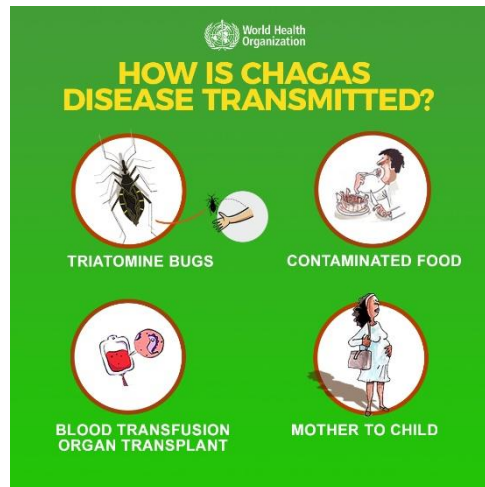


Ilustración 2: Infografía de la WHO sobre los medios de transmisión de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas fue nombrada así en honor a Carlos Ribeiro Justino das Chagas, un fisiólogo brasileño e investigador que descubrió la enfermedad en 1909, tiempo después la 72 asamblea mundial de la salud, en mayo de 2019, tomó la decisión de celebrar el Día de la enfermedad de Chagas el 14 de abril de cada año (la fecha del año en que Carlos Chagas diagnosticó el primer caso humano de la enfermedad en una niña de 2 años llamada Berenice. (4)



Ilustración 3: Fotografía de Carlos Ribeiro Justino Chagas, descubridor de la enfermedad de Chagas

1.2 Sintomatología

La severidad y el curso de una infección individual puede variar basado en un amplio número de factores, como: la edad en la que la persona se vio infectada la forma en que la persona adquirió la infección y la cepa específica del parásito *T. cruzi*. (2)

La enfermedad de Chagas puede presentarse en 2 fases diferentes:

- Fase aguda
- Fase Crónica

Donde ambas fases pueden ser tanto inocuas como muy graves, dependiendo de los factores que ya se mencionaron anteriormente. (2)

Fase aguda: Puede durar de 8 a 12 semanas debido a la circulación de los tripomastigotes (1). En esta fase, los parásitos se encuentran circulando en el torrente sanguíneo, sin embargo, los pacientes pueden no presentar ningún síntoma o tener síntomas inocuos mayormente, como: fiebre, fatiga, dolores de cuerpo, dolor de cabeza, salpullido, pérdida del apetito, diarrea, vómito, glándulas linfáticas inflamadas, palidez, hinchazón, e incluso afectación del hígado. [1, 2, 4]. En menos del 50% de la población pueden observarse signos patognomónicos de la enfermedad, las cuales se van a presentar como una lesión ulcerativa en la piel conocida como chagoma de inoculación o un edema palpebral en el parpado de uno de los ojos conocido como signo de Romaña. (2)



Ilustración 4: Fotografía de un paciente que presenta signo de Romaña, un marcador de la enfermedad de Chagas en su fase aguda

La infección aguda en un huésped inmunocompetente ocasiona una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada en el sitio de entrada de los tripomastigotes de *T. cruzi* en la piel, pero en pacientes inmunosuprimidos es normalmente imperceptible ya que el paciente podría nunca quejarse de los síntomas ya que no los llega a sentir, ocasionando que el parásito pase desapercibido y no pueda ser tratado de forma oportuna, cuando aún se encuentra en la fase aguda que es la más inocua (5).

Fase crónica: Usualmente inicia como una forma indeterminada que puede durar de 10 a 30 años, en la que los pacientes presentarán serología positiva, pero serán asintomáticos, no presentarán anomalías electrocardiográficas, tendrán un corazón de tamaño normal y un esófago y colon sin alteraciones. Después de este periodo solo del 20 al 30% de los pacientes desarrollarán síntomas cardíacos y un 10% sufrirá desórdenes digestivos como engrosamiento del esófago o colon (1, 2, 4). Durante esta etapa los parásitos se encuentran albergados principalmente en músculos cardíacos y digestivos, donde después de años de infección los puede llevar a muerte súbita, debido a la generación de arritmias o daño cardíaco progresivo, causado por la destrucción del tejido cardíaco y el sistema nervioso (4). Dentro de este grupo de pacientes el 38.5% sufrirá una muerte súbita, 56% sucumbirán ante una falla cardíaca y 5.5% desarrollarán síndromes digestivos como: megaesófago o megacolon (5). Otras manifestaciones clínicas que pueden originarse a partir de la fase crónica de la enfermedad de Chagas son alteraciones en el sistema nervioso periférico y central y malfuncionamiento del sistema endócrino (5).

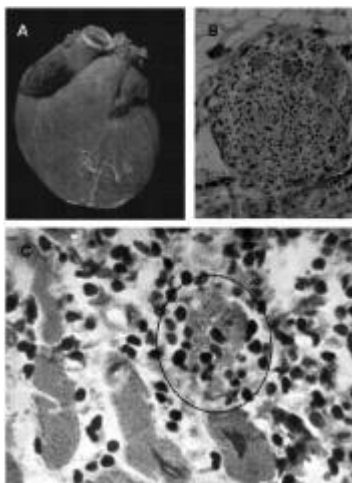


Ilustración 5: Manifestaciones clínicas producidas por enfermedad de Chagas crónica en el corazón

1.3 Epidemiología

La enfermedad de Chagas es una enfermedad endémica de América latina, desde el sur de los Estados Unidos, hasta el norte de Argentina y Chile, pero es menos común fuera de zonas rurales, que es donde las chinches vector son encontradas en las casas rústicas (7).

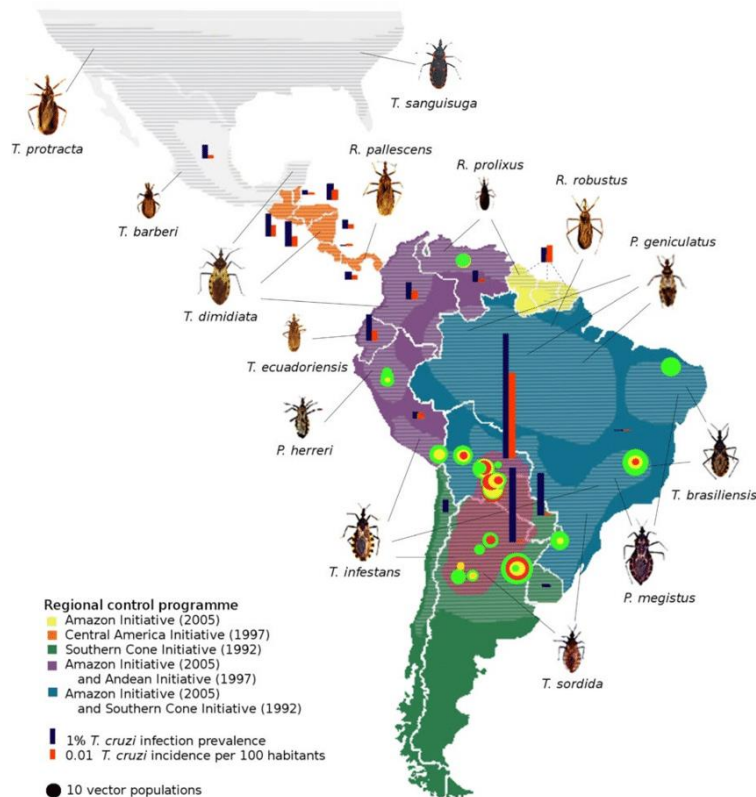


Ilustración 6: Mapa de las zonas endémicas donde habitan los insectos triatominos, vectores de la enfermedad de Chagas.

Es importante mencionar que, aunque en algún momento esta enfermedad estuvo confinada dentro de estas áreas, actualmente se encuentra presente en todo el mundo, y la mayoría de la gente infectada se encuentra en asentamientos urbanos, por lo que han empezado a aumentar las contabilizaciones de esta enfermedad en Estados Unidos, Canadá, algunos países europeos y africanos, países del este del mediterráneo y países del oeste del pacífico. Hay que recalcar que la transmisión por medio de los insectos vector se da exclusivamente en América que es donde habita el insecto. (1, 2, 4)



Ilustración 7: Mapa de la distribución mundial de la enfermedad de Chagas

La razón por la cual el Chagas ha logrado diseminarse a lo largo del mundo, es como en muchos otros casos debido a la globalización. Viajeros e inmigrantes han sido considerados potenciales fuentes de diseminación de la enfermedad de Chagas desde hace muchos años (7).

Muchos inmigrantes que buscan dejar su país atrás debido a la pobreza y represión política migran desde estas comunidades rurales endémicas de la enfermedad, en busca de nuevas oportunidades a países desarrollados (Australia, Canadá y algunos países europeos como Italia, Francia y España entre otros) llevando consigo la enfermedad y contagiando a otras personas a través de transfusión sanguínea, trasplantes de órganos y otros medios de transmisión directa persona-persona. (7)

1.4 *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un protozoo flagelado hemo tisular perteneciente a la familia de los trypanosomatidae, es un parásito intracelular obligado que presenta dos fases diferenciadas dentro de su ciclo biológico, una de ellas en los vertebrados y otra en los insectos vector (5, 8).

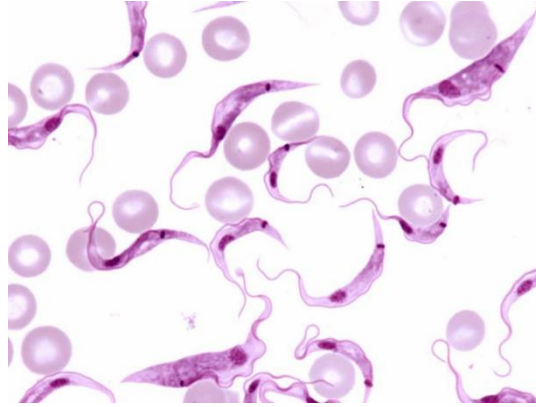


Ilustración 8: Micrografía de *Trypanosoma cruzi*, patógeno causante de la enfermedad de Chagas

1.5 Patogénesis

La forma parasitaria de *T. cruzi*, el tripomastigote entra al nuevo hospedero a través de las heridas ocasionadas por la chinche besucona o a través de membranas mucosas. Una vez dentro, los tripomastigotes invaden las células aledañas donde se diferenciarán a su forma replicativa de amastigotes, los cuales llevarán a cabo su ciclo replicativo dentro del citosol de las células del hospedero mediante fisión binaria. Una vez terminado su ciclo replicativo, estos son liberados al torrente sanguíneo del hospedero en forma de tripomastigotes, donde serán encapsulados en vacuolas de origen lisosomal como parte de la respuesta inmune del hospedero. En las cuales viajarán a otras partes del cuerpo para infectar nuevas células nerviosas y musculares, principalmente del miocardio, células reticuloendoteliales del bazo, hígado, ganglios linfáticos y células del plexo mesentérico del tracto gastrointestinal. El bajo pH de las vacuolas desencadena una cascada de señalización que ocasiona que de nueva forma se conviertan en amastigotes y continúen con su ciclo replicativo dentro de dichas células (1,2,8).

Cuando una chinche besucona se alimenta de la sangre de un hospedero, los tripomastigotes viajan a través de su intestino medio y se transforman en epimastigotes que se replicarán y seguirán viajando hasta el intestino grueso donde se transformarán en tripomastigotes metacíclicos, para así completar el ciclo biológico de *T. cruzi* (1).

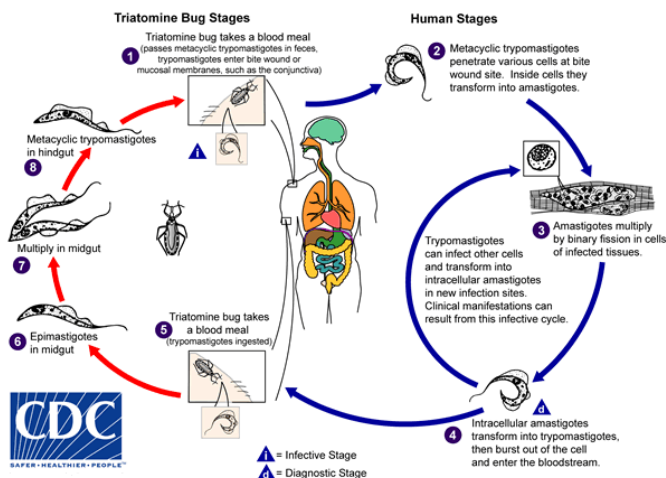


Ilustración 9: Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.

Para poder llevar a cabo el proceso de infección en el hospedero, los parásitos deben sobrevivir en el medio extracelular dentro del mismo, obtener acceso a la superficie de la célula y finalmente formar anclajes estables a las células del hospedero que les permitan activar los mecanismos de invasión necesarios para ingresar a la célula.

La membrana plasmática de *T. cruzi* desempeña un papel crucial dentro de este proceso, ya que esta es la encargada de interactuar con el medio extracelular, incluyendo: la sangre, el espacio intercelular y el lumen de los intestinos del parásito.

La membrana plasmática contiene un conjunto de glicoproteínas ancladas a Glicosilfosfatidilinositol (GPI) que le confiere propiedades esenciales al parásito para su supervivencia, estas proteínas son sintetizadas y ancladas a GPI en el retículo endoplasmático, posteriormente en el aparato de Golgi sufren una serie de modificaciones en los carbohidratos de las cadenas laterales, para finalmente asociarse a la membrana plasmática y terminar como proteínas extracelulares que darán cara al lumen (9). Este tipo de proteínas ancladas a GPI normalmente se encuentran asociadas con micro dominios (balsas) ricas en esfingolípidos y colesterol, las cuales regulan los eventos de señalización a través de la reorganización espacial de las proteínas, mediante la recolección de colesterol que afecta la fluidez de la membrana ocasionando la reorganización de las proteínas (9).

Este conjunto de glicoproteínas de superficie resistentes a proteasas, pueden desempeñar una gran variedad de funciones, entre ellos: la adhesión y entrada a las células del hospedero, ya que estas moléculas de superficie le permiten anclarse a componentes de la matriz celular, unirse a receptores de superficie celular e incluso pueden poseer actividad proteolítica contra los componentes de la matriz celular permitiéndole al parásito degradar las uniones intercelulares y de esta forma otorgar acceso al interior de la célula. Entre las principales glicoproteínas que se encuentran en la membrana de *T. cruzi*, podemos encontrar las mucinas, transalidasas, moléculas afines a TS y proteínas integrales de la membrana (9).

Lo primero que debe hacer el parásito para iniciar su proceso de infección es unirse a las células de su hospedero, lo cual realiza mediante las glicoproteínas de membrana gp83 y gp85, las cuales pueden unirse a las glicoproteínas de matriz como laminina y fibronectina. Una vez que el parásito ha llevado a cabo este proceso, este utiliza sus proteasas de superficie como Cruzipaina para empezar a degradar la ECM que está compuesta de fibras de proteínas como: colágeno, fibras elásticas y sustancia fundamental (complejo viscoso altamente hidrofílico compuesto de glicoaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas multi adherentes) que le entregan fuerza y rigidez a la matriz [9, 10].

Estos componentes forman las láminas basales que se encuentran entre el epitelio y los tejidos conectivos. El parásito debe cruzar estas láminas basales e inmovilizarse en los tejidos para poder iniciar su proceso de internalización a la célula, es aquí donde el parásito utiliza sus proteasas de superficie como la penetrina y cruzipaina para degradar componentes de la ECM como colágeno tipo 1 y 5 y fibronectina, para poder dejar epítomos antes escondidos al descubierto (9).

T. cruzi cuenta con 3 mecanismos principales para poder entrar a las células del hospedero e infectarlas. El primero de ellos es un mecanismo dependiente de actina y lo llevan a cabo los amastigotes de *T. cruzi*, que puede inducir la fagocitosis en células fagocíticas profesionales como los macrófagos, pero de igual forma tienen una increíble capacidad de inducir la fagocitosis en células fagocíticas no profesionales lo cual logra mediante el secuestro de las vías de señalización TLR2

y TLR9. Una vez dentro de las células los amastigotes muestran la misma capacidad que los tripomastigotes de romper la membrana parasitófora, gracias a sus proteínas porinas que se activan en pH ácido, como el que se genera dentro de la membrana parasitófora, lo que les permite escapar al citoplasma y continuar con su proceso replicativo (5).

Los otros dos mecanismos con los que cuenta *T. cruzi* solo pueden llevarlos a cabo los tripomastigotes, y se llevan a cabo en células no fagocíticas, son independientes del citoesqueleto de actina y altamente dependientes de la exocitosis lisosomal.

En el primero, una vez que los tripomastigotes han logrado anclarse a la superficie de las células, estos disparan un proceso de señalización celular dependiente de calcio (Ca^{2+}), haciendo uso de 2 peptidasas, una serina endopeptidasa (oligopeptidasa B) y una cisteína proteasa lisosomal secretada (cruzipaina), además de la activación de fosfolipasa C (PLC) que es una de las señales de transducción más importantes, porque genera inositol 3 fosfato (IP3) que lleva a la liberación de calcio de los depósitos intracelulares. Esto resulta en un aumento del nivel de calcio intracelular que promueve el reclutamiento rápido de lisosomas al sitio de unión del parásito mediante microtúbulos y kinesinas. Los lisosomas son reclutados mediante el aumento de la concentración de Ca^{2+} , debido a que estos presentan de forma ubicua en su membrana, una familia de proteínas denominadas: sinaptotagminas, que son una familia de proteínas receptoras de calcio. Después del reclutamiento, se lleva a cabo la fusión de las membranas donadas por los lisosomas, dando lugar a la formación de las vacuolas ácidas parasitóforas (TcPV), las cuales se acoplan al extremo posterior de los tripomastigotes, permitiéndoles entrar a las células en el momento que estas se fusionan con la membrana plasmática de la célula del hospedero [5, 10].

El segundo, los tripomastigotes se aprovechan del mecanismo celular mediante el cual se lleva a cabo la reparación de la membrana plasmática, este es mediado directamente por la invaginación de la membrana plasmática, dicho proceso es altamente complejo e involucra varios mecanismos. En primer lugar, los tripomastigotes causan daño a la membrana plasmática, mediante el uso de

porinas, las cuales aunque no se encuentren en un ambiente ácido como las de la membrana parasitófora, cuentan con suficiente actividad residual como para causar fisuras en la membrana plasmática; sumado a esto los tripomastigotes pueden causar daño a la membrana plasmática, cuando estos se alejan de la membrana plasmática, aun estando adheridos a esta por su extremo posterior. Juntos estos mecanismos tienen la potencia suficiente como para desencadenar el mecanismo de reparación de la membrana plasmática, lo cual da lugar a un incremento en los niveles de calcio extracelular. El flujo de Ca^{2+} a través de las interrupciones en la membrana, desencadena la exocitosis lisosomal, esto sumado a los altos niveles de Ca^{2+} y de lisosomas reclutados mediante el primer mecanismo de infección, hacen que haya una alta concentración de lisosomas en el lugar de la herida, estos lisosomas liberan una enzima llamada esfingomielinasa, la cual digiere la esfingomielina convirtiéndola en ceramida, la cual tiene una gran capacidad de unirse y formar enlaces internos lo que le da una alta capacidad de promover la internalización de heridas gracias a la formación de micro dominios de ceramida y la invaginación de la membrana plasmática, esto promueve la internalización de parásitos dentro de membranas parasitóforas enriquecidas en ceramida, las cuales se unirán gradualmente a lisosomas que les permitirán anclarse al interior de la célula [5, 11].

Se ha demostrado que este mecanismo por sí solo no es capaz de mantener una infección viable, ya que, sin los lisosomas, estos no son capaces de asociarse a los microtúbulos de las células, lo que ocasiona que estos continúen vagando dentro del citoplasma de la célula hasta que eventualmente son expulsados y se revierte la infección, por lo que las membranas lisosomales y los lisosomas reclutados con el primer mecanismo de invasión son de vital importancia para que *T. cruzi* pueda llevar a cabo una infección exitosa (11).

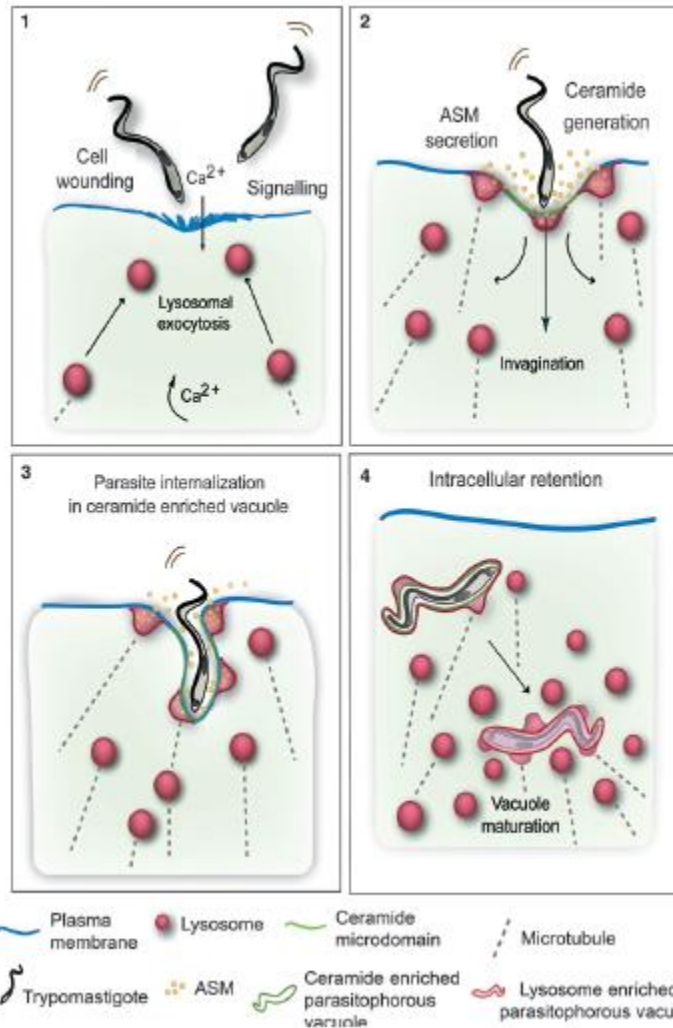


Ilustración 10: Mecanismo de infección de *T. cruzi* mediante la invaginación de la membrana plasmática

1.6 Enolasa

Las enolasas constituyen una familia de metaloenzimas glicolíticas citoplasmáticas, y están compuestas de 3 subunidades isoenzimáticas (Alpha, Beta y Gama) las cuales pueden formar homo y heterodímeros [13, 14].

Las Alpha enolasas (ENO1), se expresan de forma ubicua durante la etapa temprana del desarrollo embrionario, las Beta enolasas (ENO 3) se expresan en tejido esquelético, cardíaco y muscular de los adultos y las Gama enolasas (ENO2) se expresan específicamente en tejidos neuronales y neuroendócrinos [14, 15].

Cabe mencionar que las 3 comparten una alta similitud en su secuencia y en sus propiedades cinéticas (15).

La Alpha enolasa enzimáticamente activa, está compuesta de 2 subunidades de 433 aminoácidos con un peso de 47KDa cada una aproximadamente, las cuales se encuentran de frente en forma antiparalela. Es una enzima altamente conservada entre especies, con un rango de similitud de entre 40 y 90% (14). Esta cataliza la deshidratación del 2-Fosfo-D-Glicerato (PGA) a fosfoenolpiruvato (PEP) durante la ruta de la glucólisis y de igual forma cataliza la hidratación del PGA durante la ruta de la gluconeogénesis para generar PEP [12,13], ambas rutas metabólicas son de suma importancia para la supervivencia de las células al ser una de las principales fuentes de obtención de energía.

La enolasa tiene una absoluta necesidad de iones metálicos divalentes para poder funcionar, el magnesio es su cofactor natural, y es con este ion con el que presenta su mayor actividad. Debido a la necesidad de iones para funcionar a la enolasa se le denomina como una metaloenzima activada por metales (13). Para su funcionamiento la enolasa requiere de la unión de 2 iones de forma consecutiva en dos sitios de unión a metales diferentes, los cuales se encuentran cerca del sitio activo, el primero de ellos es denominado sitio conformacional e induce cambios conformacionales en el sitio activo que permiten estabilizar el dímero y además la unión del sustrato, y el segundo sitio sirve como un componente requerido para el funcionamiento del aparato catalítico (13).



Ilustración 11: Estructura tridimensional de la enolasa de Trypanosoma Cruzi, con uno de sus iones de Mg en color verde

La enolasa se localiza principalmente en el citosol de las células, y es una de las proteínas más expresadas dentro de este, aunque el gen que la expresa no es un gen constitutivo, si no que su expresión varía de acuerdo con las condiciones fisiopatológicas, de desarrollo o metabólicas de las células (13).

Recientemente se ha encontrado que la enolasa es una enzima multipropósito y que puede ser encontrada en diversos sitios dentro de la célula. En el citosol además de llevar a cabo su actividad en el ciclo de la glucólisis y gluconeogénesis, también está involucrada en la regulación de la morfología celular y el tráfico de materiales al interactuar con el citoesqueleto de actina. De igual forma se ha encontrado en el núcleo celular de algunas células de mamíferos, donde participa en la regulación transcripcional de genes involucrados en la transformación morfológica y proliferación celular (3). Además, se ha encontrado que en situaciones de estrés extremo como hipoxia actúa como una proteína de estrés donde es sobre regulada mediante la activación del factor inducible de hipoxia 1 (HIF-1) brindando protección a las células incrementando el metabolismo anaeróbico (12).

Recientemente se ha encontrado que la enolasa se expresa también en la superficie celular de muchos organismos eucariotas; en las células hematopoyéticas estimuladas (neutrófilos, monocitos y linfocitos), células epiteliales, endoteliales y neuronales donde actúa como un fuerte receptor de plasminógeno, que modula la actividad fibrinolítica pericelular. Además, puede ser expresada en la superficie celular de algunos organismos patogénicos, donde funge como un fuerte receptor de plasminógeno lo que les permite a estos patógenos utilizar la actividad fibrinolítica de la plasmina humana para su propio beneficio y facilitar la invasión de tejidos (13), además de dotar a estos organismos patogénicos con una gran capacidad de degradar componentes de la ECM ya que al ser activado y transformado en plasmina, es capaz de activar la pro-colagenasa y transformarla en colagenasa, que es capaz de degradar fibrina y muchos otros componentes de la matriz extracelular como: fibronectina y laminina (12), lo que favorecería la infección celular y la diseminación hacia otros tejidos, de estos organismos patógenos.

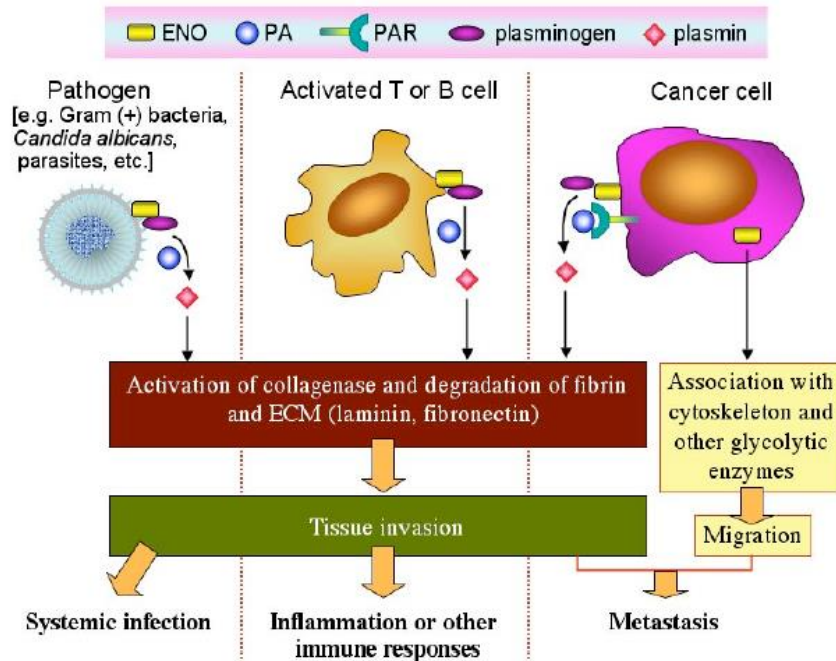


Ilustración 12: Mecanismo de invasión de patógenos y otras células haciendo uso de la enolasa como receptor de plasminógeno

Muchas enzimas metabólicas incluyendo a ENO, son conocidas por interactuar con proteínas citoesqueléticas como actina, tubulina, colágeno, laminina y fibronectina, que son componentes importantes de la membrana basal y de la matriz extracelular. Estas asociaciones proveen ATP a las células cancerosas y organismos patógenos, lo que ayuda a promover la migración de estos hacia otros tejidos (17,18).

Las alfa-enolasas carecen de las características clásicas de las proteínas de unión a superficie, como lo son: una secuencia señal o dominios conocidos por anclarse a proteínas. Por ello las enolasas han sido incluidas en la familia de las proteínas de superficie sin anclaje y se ha reportado que tiene una alta capacidad de unirse a componentes de la matriz extracelular. Debido a sus propiedades adhesivas la alfa enolasa podría potenciar la invasión de los organismos patógenos y el daño que estos son capaces de causar a los tejidos del huésped [16,17].

1.7 Colágeno

La matriz extracelular (ECM) es la porción acelular y proteica de los tejidos animales, constituye los andamiajes estructurales, regula procesos fisiológicos, señalización celular, migración y transporte de solutos a través de los tejidos.

Además, constituye la plataforma de anclaje para el epitelio, rodea los capilares sanguíneos y neuronas y es parte del tejido conectivo intersticial (19).

La ubicuidad y amplia distribución de la ECM y sus componentes, la hacen un blanco atractivo para la adherencia e invasión de muchos microorganismos patógenos durante su proceso infeccioso, y ya que el primer y más crítico paso para toda invasión exitosa es la adhesión a los tejidos del huésped, la ECM desarrolla un papel sumamente importante en este proceso.

Los patógenos se unen a la ECM por medio de proteínas de superficie llamadas adhesinas, y los organismos patógenos usualmente cuentan con muchas de ellas. Aunque estas proteínas de unión no se encuentran restringidas a los organismos patógenos, también las bacterias que forman parte de la microbiota común pueden unirse a algunos componentes de la ECM como COL1, laminina, fibronectina y fibrinógeno (16).

Las colágenas son los mayores constituyentes del tejido conectivo y son el 30% de todas las proteínas, siendo el Colágeno 1 el principal componente orgánico del cuerpo humano. Son de vital importancia para varios procesos como la organogénesis, la angiogénesis y la adhesión celular. Hasta la fecha, se han encontrado y descrito 28 tipos diferentes en el cuerpo humano (16, 19). Todas contienen un triplete recurrente conformado por Gly-Pro-Hidroxiprolina que se repite indefinidamente en la parte central de cada cadena alfa; cuando 3 de estas cadenas alfa, se juntan forman lo conocido como el dominio colagenoso (19).

El colágeno es una glicoproteína multifuncional que juega un papel importante en la morfogénesis celular, la señalización celular, la reparación de los tejidos y en la migración celular. Se encuentra de forma ubicua en los tejidos como parte de la membrana basal, ayuda a formar una membrana protectora alrededor de los capilares sanguíneos y forma parte de la ECM. Es por ello por lo que funcionan como moléculas mecánicas de contención que protegen a los tejidos de los patógenos (19).

El colágeno es usado como blanco de muchos microorganismos patógenos asociados a enfermedades del tracto gastrointestinal, respiratorio y urogenital, los cuales usan sus adhesinas, para adherirse al colágeno e inducir la respuesta inflamatoria del huésped, lo que lleva a la colonización e invasión del tejido. Muchos de estos organismos tienen la capacidad de degradar colágeno con ayuda de sus proteasas segregadas llamadas colagenasas o con ayuda de metaloproteinasas que secuestran del mismo hospedero. Esto con la finalidad de adherirse e invadir y así allanar el camino para poder colonizar de forma más profunda los tejidos del hospedero (16, 19)

2. Antecedentes

2.1 Antecedentes Generales

En un artículo publicado por Hsiao K-C, et al (20), se demostró que la enolasa de células cancerígenas de pulmón está directamente relacionada con la degradación de la matriz extracelular, gracias a su capacidad para degradar colágeno; Con esta finalidad los autores, estudiaron el efecto de bloquear ENO1 con anticuerpos o silenciar su expresión con un shRNA específico. Para esto suspendieron células PE089 (línea celular humana de cáncer de pulmón), LLC/luc (células de carcinoma de pulmón de Lewis transfectadas con el gen de la luciferasa) o A549/luc (células de carcinoma de pulmón transfectadas con el gen de la luciferasa) en matrigel que contenía DQ-colágeno (colágeno fluorogénico), el cual fungió como sustrato para determinar la degradación de la ECM por las células tumorales. A continuación, añadieron un anticuerpo específico para ENO1; después las incubaron con anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado a PE, específico para anticuerpos de mENO1 o con anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado a PE para anticuerpo humano específico anti ENO1. Posteriormente, el núcleo fue teñido con DAPI y finalmente fueron inmersas en Vectashield y selladas para poder ser analizadas mediante microscopia confocal laser. Los análisis revelaron que los productos degradados de Colágeno-DQ y ENO1 se encontraban co-localizados en la interfaz entre las células tumorales y el matrigel, lo que sugiere que ENO1 está asociada

con la degradación del colágeno y que además se acumula en el sitio de invasión de las células tumorales.

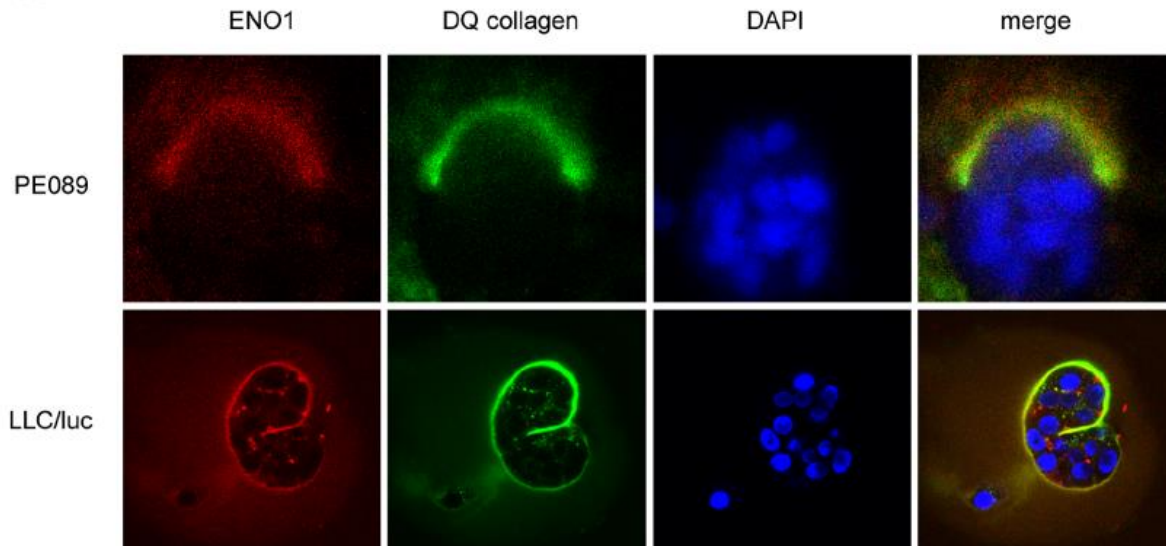


Ilustración 13: Células PE089 y LLC/luc embebidas en matrigel con colágeno DQ el cual emite fluorescencia verde al ser degradado, y con un anticuerpo marcado con PE para detectar la presencia de colágeno. La colocalización de ambas señales en la interfaz de la membrana celular y el matrigel muestran la correlación entre la degradación de colágeno y la presencia de la enolasa en el sitio (20).

Después, para determinar el efecto del tratamiento con anticuerpos específicos para ENO1 en la actividad proteolítica, cultivaron células por 24hrs y después el sobrenadante fue sustituido con medio que contenía mENO1-Ab, anti ENO1-Ab de ratón o anticuerpo isótopo de control. A continuación, se recolecto el sobrenadante y se incubó con colágeno-DQ soluble y la fluorescencia emitida por el colágeno-DQ al ser degradado se detectó usando un Wallac multilabel counter. Los resultados obtenidos mostraron que en los cultivos celulares con el anticuerpo control, se podía observar una degradación de colágeno-DQ dependiente de tiempo. En los cultivos con el anticuerpo específico para ENO se encontró que la degradación de Colágeno-DQ, se veía seriamente inhibida; y finalmente se observó que el medio por sí solo no era capaz de promover la degradación de colágeno-DQ de ningún modo, por lo que se concluyó que al bloquearse la superficie de ENO1 la actividad proteolítica de las células tumorales se veía altamente reducida.

Estos resultados muestran la necesidad de ENO1, para poder llevar a cabo la degradación de la ECM. Además de la co-localización de Colágeno-DQ y enolasa encontrada en la microscopía dan pista de que la enolasa no solo podría estar

mediando la degradación del colágeno, sino que también se podría estar dando algún tipo de interacción entre ambas moléculas (20).

En otro estudio llevado a cabo en 2017 por Moitza Príncipe, et al (18), buscaron demostrar el rol de ENO1 en la unión a proteínas de la matriz extracelular como: Colágeno 1 y 4, de una línea celular de cáncer de páncreas (PDA). Para ello utilizaron una línea celular de cáncer de páncreas (CFPAC-1) con el gen de la enolasa silenciado. Primero observaron que la inhibición de ENO1 provocó la regulación negativa de varias proteínas adhesinas involucradas en la adhesión a la ECM, además de que la integridad de la ECM se vio comprometida. Posteriormente, para determinar la pérdida de la capacidad de estas células para unirse a la ECM, hicieron ensayos de adhesión, donde diluyeron Colágeno 1 y Colágeno 4 dentro de una microplaca de 96 pozos, posteriormente, añadieron las células PDA; ya fueran las células control shCTRL (silenciadas mediante un *scrambled* shRNA) o las shENO1 (silenciadas mediante un shRNA dirigido al gen de la ENO). A continuación, las células fueron sembradas en las placas cubiertas con Colágeno 1 y 4, tanto en presencia como en ausencia del anticuerpo CD61, después las tiñeron con cristal violeta y finalmente hicieron la cuantificación midiendo la absorbancia a 570nm. Con esto encontraron que las células con el gen de la enolasa silenciado (shENO1) se unían de forma significativamente menor a Colágeno 1 y 4, que las células control (shCTRL)

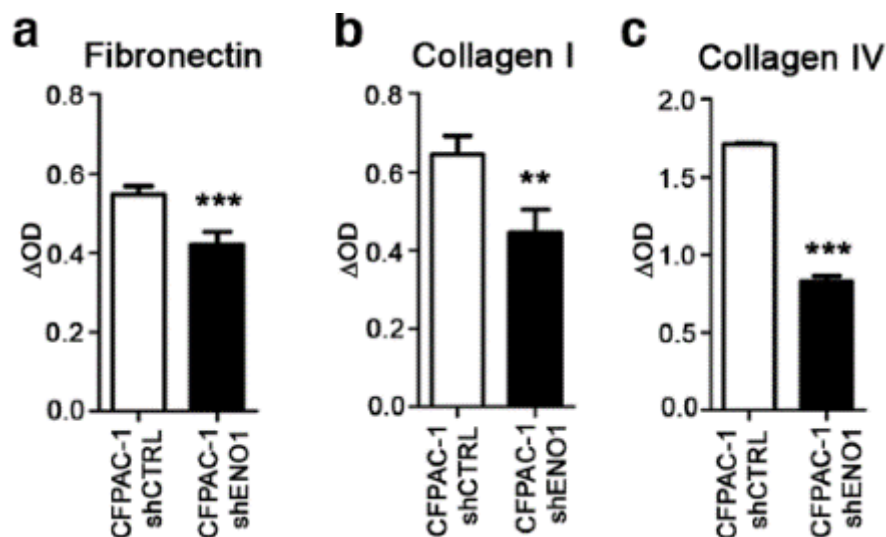


Ilustración 14: Gráficas que muestran la afinidad de las células CFPAC-1-shCTRL y CFPAC-1-shENO1 por diferentes proteínas de la matriz extracelular. En las gráficas B y C podemos ver como la afinidad por el colágeno de las células CFPAC-1 con el gen de la enolasa silenciado, se ve reducida (18).

Estos resultados muestran que la enolasa juega un papel clave en la unión a colágeno, ya que, al no encontrarse presente en la superficie celular, la unión de dichas células a colágeno se ve altamente comprometida, por lo que esto es un gran indicio de que ENO podría estar interactuando directamente con las colágenas.

De igual forma en 2007, Jenni Antikainen, et al (17), buscaron evaluar la capacidad de la enolasa de diversas bacterias, tanto patógenas como probióticas, para unirse a proteínas de la matriz extracelular, entre ellas Colágeno 1 y 4. Para ello llevaron a cabo un ensayo de ELISA usando una enolasa ligada a His₆ (His₆-ENO), donde recubrieron microplacas de 96 pozos con Colágeno 1 o Colágeno 4 y a continuación, añadieron la His₆-ENO y las dejaron interactuar. Posteriormente, para detectar las proteínas unidas añadieron un anticuerpo monoclonal anti-His₆ e inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas a fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo. Con este experimento encontraron una fuerte unión a Colágeno 1 por parte de la enolasa de *L. crispatus* y *S. aureus*. Y de igual forma encontraron que ninguna de las enolasas de las diversas bacterias se unió al Colágeno 4 inmovilizado. Con este experimento se prueba que las enolasas de algunos microorganismos tanto patógenos como no patógenos tienen la capacidad de unirse directamente a colágeno.

Finalmente, en un estudio realizado por Salzillo, M. et al en 2015 (16). Se demostró que la enolasa de *Lactobacillus plantarum* tiene la capacidad de unirse a colágeno humano, además de que describieron el sitio y la secuencia donde se lleva a cabo esta interacción entre ambas proteínas. Para esto, primero llevaron a cabo una electroforesis 2D de la fracción de la pared para poder llevar a cabo un ensayo con colágeno y así detectar posibles adhesinas, posteriormente mediante análisis MALDI-TOF llegaron a la conclusión de que una de las proteínas con las que se solapaba el colágeno era la enolasa de *L. plantarum* (ENOA1). Posteriormente para comprobar la importancia de ENOA1 en la adhesión a colágeno, el equipo realizó una prueba de adhesión en una microplaca de 96 pozos recubierta con colágeno, donde añadieron 2 tipos de cepas, la primera fue *L. plantarum* silvestre con el gen de la enolasa intacto y en la segunda usaron una cepa modificada que tenía el gen de la enolasa silenciado y las dejaron

interaccionar. Con este estudio encontraron que la cepa de *L. plantarum* con el gen de la enolasa silenciado tenía una capacidad 6 veces menor de unirse a colágeno. Posteriormente y con el fin de caracterizar la unión de ENOA1 a colágeno, llevaron a cabo ensayos de ELISA con ENOA1 recombinante clonada en *E. coli*, donde pusieron a interaccionar la rENOA1 con colágeno inmovilizado y GST como control. Con lo cual determinaron que rENOA1 tenía una capacidad de unión a colágeno 10 veces más grande que GST.

Finalmente, para determinar qué región de la ENOA1 estaba llevando a cabo la interacción con colágeno, los investigadores dividieron la proteína en 3 partes: ENOA1₁₋₆₁, ENOA1₆₁₋₂₀₉, y ENOA1₂₀₉₋₄₄₂, las cuales expresaron, purificaron y finalmente pusieron a interaccionar con colágeno, encontrando que la única fracción que interactuaba con colágeno fue ENOA1₆₁₋₂₀₉. Posteriormente con la finalidad de disminuir la región donde se encuentra el sitio de unión, dividieron una vez más ENOA1, esta vez en los 3 fragmentos: ENOA1₁₋₇₃, ENOA1₁₋₁₀₄, ENOA1₁₀₄₋₂₀₉, y los ensayos con colágeno mostraron que solo las regiones 1-104 y 104-209 conservaron la habilidad de unirse a colágeno. Finalmente cortaron la proteína en 2 fragmentos más: ENOA1₇₃₋₁₄₀ y ENOA1₁₄₀₋₂₀₉ y encontraron que la única región que conservó su capacidad de unión a colágeno fue ENOA1₇₃₋₁₄₀, por lo que concluyeron que la región de unión a colágeno de ENOA1 debía encontrarse entre este fragmento.

2.2 Antecedentes directos

La realización de este trabajo toma como precedente directo el trabajo realizado por Tapia, F. en 2020 (21), en el cual realizó ensayos *in silico* donde llevó a cabo acoplamiento molecular entre la proteína recombinante de *T. cruzi* y las proteínas de Homo Sapiens: Colágeno tipo 1 (COL 1) y Colágeno tipo 3 (COL3). Para esto se basó en una secuencia de unión a colágeno tipo 1 de la enolasa de *L. plantarum*, descrita por Salzillo, M (16), la cual tiene homología con la enolasa de *T. cruzi*, con una similitud del 68%.

Con base en los resultados del alineamiento que realizaron entre la enolasa de *T. cruzi* y de *L. plantarum*; y de un Matchmaker que llevaron a cabo entre la rTcENO y procolágeno tipo 1 de *H. sapiens*, modificaron dicha secuencia para finalmente obtener una de 9 aminoácidos (${}_{115}\text{AISKAAAAR}_{123}$), con 41 enlaces rotativos y de fórmula química $\text{C}_{36}\text{H}_{70}\text{N}_{13}\text{O}_{10}$, la cual fungió como ligando en los acoplamientos moleculares de rTcENO con COL1 y COL3.

En el caso de COL1 llevaron a cabo 3 acoplamientos moleculares distintos, uno teniendo como receptor al dominio $\alpha 1$, otro al dominio $\alpha 2$ y uno más utilizando la estructura completa de procolágeno tipo I de *H. sapiens*, para el caso de COL3 utilizaron la estructura del procolágeno tipo III de *H. sapiens* y llevaron a cabo 2 acoplamientos moleculares distintos, el primero usando solo el dominio $\alpha 1$ como receptor y en el otro utilizando la estructura completa.

Los resultados que obtuvo indican que el modelo donde el receptor fue COL1 completo, muestra una ΔG menor (-6.2Kcal/Mol) en comparación a los modelos donde los receptores solo fueron los dominios alfa 1 y alfa 2 de COL1, lo que indica que la enolasa de *T. cruzi* necesita unirse a ambos dominios para lograr una mejor estabilidad. Además, se encontró que la interacción que mostró un K_d más bajo y por lo tanto una mayor afinidad de la macromolécula por su ligando, fue la interacción entre la colágena 1 completa y la rTcENO con un K_d de 28503nM, lo que ratifica el descubrimiento previo.

Finalmente, encontraron que los aminoácidos (K_{118}) y (R_{123}) del ligando ${}_{115}\text{AISKAAAAR}_{123}$, junto con los aminoácidos de cada receptor, son los responsables de formar el campo de fuerza necesario para llevar a cabo la interacción.

Posterior a los estudios *in silico*, Tapia, F. (21) llevó a cabo ensayos *in vitro*, para confirmar de forma experimental los resultados obtenidos previamente en los ensayos *in silico*. Estos, consistieron en ensayos de interacción proteína-proteína mediante Far Western Blot y ensayos de ELISA.

Para llevar a cabo el Far Western Blot, migraron 20µg de COL 1 y COL 3, en gel de poliacrilamida en condiciones nativas al 7.5% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, a continuación, agregaron rTcENO y se dejó interaccionar con las proteínas, finalmente se les añadió 1mL del primer anticuerpo (anti-HIS) y se les dejó interaccionar.

Además, realizaron otro Western Blot bajo las mismas condiciones solo que esta vez empleando un segundo anticuerpo (anti-rTcENO) en lugar del anti-HIS.

Finalmente, como control negativo realizaron otro Far Western Blot bajo las mismas condiciones, pero sustituyendo la rTcENO por albúmina de suero bovino (BSA).

Con dicho análisis fueron capaces de observar una posible interacción entre rTcENO y las proteínas COL 1 y COL3. Dicha interacción fue visible tanto con el anticuerpo anti-HIS como primer anticuerpo, como con anti-rTcENO como primer anticuerpo. Para confirmar que dichas interacciones se estuvieran llevando a cabo, Tapia, F. (21) realizó posteriormente un ensayo de ELISA que le permitió esclarecer si las bandas que se observaron en el Far Western Blot eran realmente interacciones entre rTcENO y las colágenas.

El ensayo de ELISA se llevó a cabo en una microplaca de 96 pozos. Se llenaron 4 de estos pozos con 20 µg de COL1 y 4 pozos más con 20 µg de COL 3. El primero de los 4 pozos, sirvió como blanco, el segundo como control negativo, el tercero para la interacción con Anti-HIS como primer anticuerpo y el cuarto para la interacción con Anti-rTcENO como primer anticuerpo. Los resultados obtenidos a partir de este ensayo demostraron que en efecto se estaba llevando a cabo una interacción entre la enolasa de *T. cruzi* y las proteínas de colágeno humano, además se encontró que rTcENO presenta más afinidad por COL 1 que por COL 3.

3. Justificación

La enfermedad de Chagas es una enfermedad desatendida a nivel mundial, para la cual no existe un tratamiento efectivo o vacuna hasta el momento, por lo que es necesario entender los diversos mecanismos de patogenicidad con los que cuenta

el parásito causante de esta enfermedad y como estos influyen en su supervivencia e infectividad. La enolasa de *Trypanosoma cruzi* (TcENO), no solo desarrolla funciones metabólicas en el parásito, también se ha propuesto que tiene un papel importante en la entrada del parásito a las células a través de la degradación de la matriz extracelular, la cual está conformada por colágenas. Por tal motivo es importante determinar que aminoácidos favorecen esta interacción, con la finalidad de entender la importancia de la enolasa en el proceso patogénico de *T. cruzi* y poder ser utilizada como un posible blanco terapéutico o vacunal.

4. Hipótesis

Mutaciones *in silico* generadas en aminoácidos del sitio de interacción de la enolasa con colágena del hospedero, afectará la interacción entre ambas proteínas.

5. Objetivo General

Analizar mediante ensayos bioinformáticos la unión entre la enolasa de *Trypanosoma cruzi* (TcENO), y las colagenas del hospedero por medio de mutaciones en los aminoácidos involucrados en la interacción.

6. Objetivos Específicos

1. Obtener y modelar las estructuras de la enolasa de *Trypanosoma cruzi* y del colágeno, con la finalidad de realizar ensayos de Docking molecular para establecer el control de interacción.
2. Realizar mutaciones puntuales en el sitio de interacción de la TcENO con colágeno y evaluar mediante Docking molecular cambios en su interacción.
3. Crear mutantes múltiples (dobles y triples) a partir de los residuos aminoacídicos que demuestren ser de mayor importancia para la interacción de la TcENO con colágeno.
4. Analizar las interacciones polares y no polares que se estén llevando a cabo entre la TcENO y el colágeno y evaluar cómo se ven afectadas al hacer las mutaciones.

7. Materiales y Métodos

7.1 Selección de estructuras

Para llevar a cabo el Docking Proteína-Proteína entre la enolasa de *Trypanosoma cruzi* y el colágeno tipo I de Humano se seleccionaron las siguientes estructuras de la base de datos Protein Data Bank (RCSB-PDB).

Para la enolasa de *Trypanosoma cruzi* se eligió la estructura con ID: 4G7F (22), la cual fue obtenida mediante el método de difracción de Rayos-X, con una resolución de 2.4 Å. Dicha estructura tiene una longitud de 429 aa de longitud, y es de una sola cadena (A).

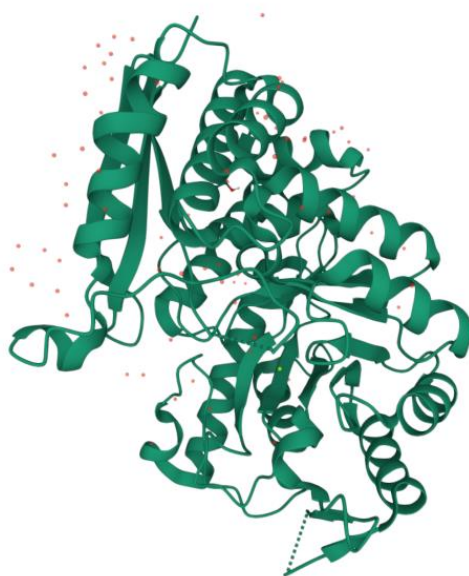


Ilustración 15: Imagen 3D de la enolasa de Trypanosoma Cruzi.

4G7F. Crystal structure of enolase from *Trypanosoma Cruzi*., Mol (D. Sehnal, S. Bittrich, M. Deshpande, R. Svobodová, K. Berka, V. Bazgier, S. Velankar, S.K. Burley, J. Koča, A.S. Rose (2021)., Mol Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. Nucleic Acids Research. doi: [10.1093/nar/gkab314](https://doi.org/10.1093/nar/gkab314)). RCSB PDB.

Para el colágeno tipo I de Humano, se eligió la estructura con ID: 7CWK (23), la cual fue obtenida mediante difracción de rayos-X y tiene una resolución de 1.54 Å. Esta estructura tiene una longitud de 28 aa y tiene tres cadenas (A, B, C)

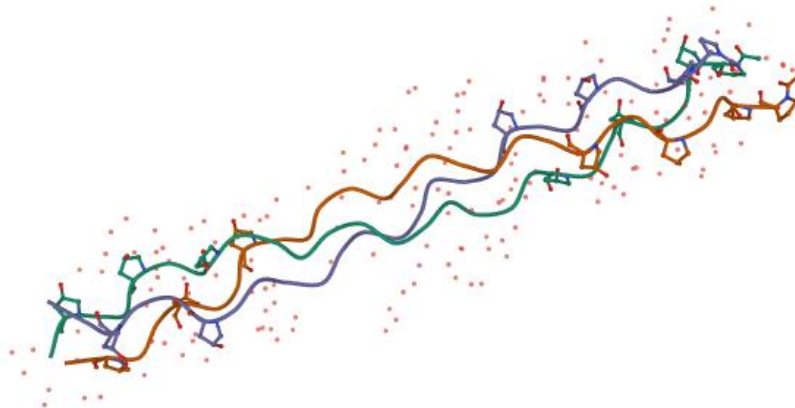


Ilustración 16: Imagen 3D del colágeno tipo I de Humano.
*Mol** (D. Sehnal, S. Bittrich, M. Deshpande, R. Svobodová, K. Berka, V. Bazgier, S. Velankar, S.K. Burley, J. Koča, A.S. Rose (2021) *Mol* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures*. *Nucleic Acids Research*. doi: [10.1093/nar/qkab314](https://doi.org/10.1093/nar/qkab314)), and RCSB PDB.

7.2 Preparación de las estructuras

Una vez obtenidas las estructuras en formato PDB, estas fueron preparadas para el Docking molecular, para esto ambas proteínas fueron procesadas con el software PyMol 2.5 (24) y los scripts de PDB-Tools (25); donde se removieron moléculas de agua no relevantes para el Docking y ligandos experimentales. En el caso de la enolasa de *T. cruzi*, se decidió conservar el ion de Mg^{+2} , debido a la importancia del magnesio en el funcionamiento y conformación estructural de la enolasa. Para ello se tuvo que modificar el archivo PDB de la enolasa, haciendo uso de un editor de texto, con el fin de asignarle la carga correspondiente al ion y de esta forma poder incluirlo en el Docking.

7.3 Docking de la enolasa Wild Type

Con la finalidad de seleccionar la cadena de colágeno tipo I que se utilizaría durante los Dockings con las enolasas mutadas, primero se llevaron a cabo 3 Docking diferentes usando cada una de las 3 cadenas del colágeno tipo I (A, B, C), para determinar cuál de las tres presentaba mayor afinidad con la enolasa de *T. cruzi*.

Los Docking se llevaron a cabo usando el servidor de Haddock 2.4 (26, 27) usando los parámetros estándar de Docking del servidor. Ya que la principal característica que destaca a Haddock del resto de los servicios de Docking es la capacidad de

utilizar datos experimentales en el proceso de Docking, se introdujeron los sitios de interacción de ambas proteínas o “residuos activos” con la finalidad de brindar mayor precisión al proceso de Docking. Para la enolasa de *T. cruzi* se utilizaron los residuos hallados de forma experimental por Salzillo, et al (16), encargados de la unión de la enolasa de *L. plantarum* a colágeno humano: aa73-aa140 (LAPALVVGKDELQQSTLDKLMRDLDGTPNKSCLGANAILGCSMAISKAAAARKGV PLYRYLAELAGTKE).

En el caso del colágeno tipo I humano, se utilizó un motivo de unión a colágeno descrito por Yi Xu, et al (28): (GER). Con esta información se decidió utilizar como sitio de interacción a los siguientes residuos aa9-aa17 (GQRGERGFP).

7.4 Análisis del Docking de la enolasa Wild type

Para llevar a cabo el análisis de los 3 Docking se utilizaron los puntajes otorgados por la plataforma de Haddock2.4 (26, 27), en especial 6 de ellos ya que son los de mayor impacto al calificar la interacción entre ambas proteínas (Haddock score, RMSD, Energía de Van der Waals, Energía electrostática, Energía de solvatación y tamaño del Clúster)

Una vez analizados los resultados de los Docking de las 3 cadenas de Colágeno tipo I, se determinó que la mejor opción para llevar a cabo los Docking con las mutantes de la enolasa de *T. cruzi* era la cadena C de colágeno humano.

Una vez decidido esto, se utilizó Pymol 2.5 (24) y Maestro 13 (29) para analizar el Docking de la enolasa con colágeno y determinar que aminoácidos de la enolasa de *T. cruzi* estaban jugando un papel importante en la interacción con la cadena C de colágeno humano.

Lo primero que se hizo fue aislar los aminoácidos de la enolasa que se encontraban a 5 Å del colágeno, ya que estos aminoácidos son los que se encuentran a una distancia lo suficientemente cerca como para llevar a cabo interacciones polares y no polares con la cadena de colágeno. Posteriormente se utilizó PyMol 2.5 (24) para determinar cuáles de estos aminoácidos estaban llevando a cabo interacciones

polares con la cadena C de Colágeno. De esta forma se obtuvieron los aminoácidos que se cambiarían para hacer las mutantes.

Finalmente con ayuda del software Maestro13 (29), se aislaron los residuos de la enolasa lo suficientemente cerca del colágeno como para llevar a cabo interacciones de tipo no polar, una vez identificados, se extrajeron de la estructura principal de la proteína y se dejó únicamente al colágeno con los aminoácidos identificados, finalmente se encontraron los aminoácidos de la enolasa que estaban llevando a cabo interacciones de tipo no polar (puentes de hidrógeno, puentes salinos, puentes halógenos, interacción catión pi, apilamiento pi) y con ayuda del software se hizo un diagrama 2D donde se muestran las interacciones entre los distintos aminoácidos y el colágeno.

7.5 Elaboración de las mutaciones de la enolasa de *T. cruzi*

Una vez obtenida la lista de aminoácidos que se modificarían para hacer las 7 mutantes, se utilizó una serie de scripts de Python llamados Haddock tools (30), los cuales permiten hacer mutaciones en la secuencia aminoacídica de las proteínas, para hacer las primeras 7 mutantes con el fin de analizar cuáles de ellas tenían el mayor efecto en la interacción de la enolasa con el colágeno. Para esto se decidió intercambiar los aminoácidos de importancia por una Alanina (A), debido a que es un aminoácido no polar e hidrofóbico, que no contribuye mucho a la interacción entre proteínas y que por ello permitirá analizar el efecto de las mutaciones de estos aminoácidos de importancia en la interacción proteína-proteína. A continuación, se muestra una lista de las 7 mutantes resultantes:

- Mutante 1: D₈₁ por A₈₁
- Mutante 2: L₈₃ por A₈₃
- Mutante 3: S₈₆ por A₈₆
- Mutante 4: T₈₇ por A₈₇
- Mutante 5: K₉₀ por A₉₀
- Mutante 6: D₉₄ por A₉₄
- Mutante 7: K₁₂₄ por A₁₂₄

7.6 Docking de las mutaciones Puntuales

Una vez obtenidas las mutantes se procedió a realizar el Docking correspondiente de cada una con la cadena C de colágeno humano. Para ello de igual forma se utilizó el servidor de Haddock 2.4 (26, 27), utilizando los parámetros estándar de Docking del servidor y los sitios de interacción de colágeno y de la enolasa previamente descritos en el Docking con la enolasa *wild type*. De esta forma se llevaron a cabo 7 Docking diferentes, uno por cada mutante de la enolasa.

7.7 Análisis de las Mutaciones Puntuales

A continuación, se procedió a hacer el análisis de cada una de los dockings, con el fin de encontrar cuál de los aminoácidos mutados tuvo un mayor efecto sobre la interacción entre la enolasa y el colágeno. En primer lugar, se utilizó el programa PyMol 2.5 (24) para encontrar los aminoácidos de la enolasa que se encontraban a 5 Å o menos del colágeno y después se obtuvieron todos los aminoácidos de la enolasa que estaban llevando a cabo interacciones polares con el colágeno. De igual forma se analizaron los puntajes obtenidos en el servidor de Haddock 2.4 (26,27), al igual que con el Docking de la enolasa *wild type*, se tomó en cuenta el Haddock score, tamaño del clúster, energía de solvatación, energía de Van der Waals, energía electrostática y RMSD. Con la información obtenida se determinó que las 4 mutaciones que mayor efecto habían tenido en la afinidad de la enolasa por el colágeno son: D81, L83, D94 y K124. Por ello se eligieron estos 4 aminoácidos para hacer 3 mutantes más: una mutante doble y dos mutantes triples, esto con el fin de ver un mayor efecto de las mutaciones sobre la afinidad de la enolasa de *T. cruzi* por la cadena C del colágeno humano.

7.8 Elaboración de las mutantes múltiples

Conforme a los resultados obtenidos se procedió a crear las nuevas mutantes múltiples utilizando los aminoácidos con los que se consiguieron mejores resultados. Para ello se utilizaron los scripts de Haddock tools (30), con los cuales se sustituyeron los aminoácidos de importancia antes mencionados por alaninas. De esta forma se obtuvieron las siguientes mutantes:

- Mutante 8: D₉₄ y K₁₂₄ por A₉₄ y K₁₂₄
- Mutante 9: D₈₁, D₉₄ y K₁₂₄ por A₈₁, A₉₄ y A₁₂₄
- Mutante 10: L₈₃, D₉₄ y K₁₂₄ por A₈₃, A₉₄ y A₁₂₄

7.9 Docking de las mutantes múltiples

Una vez elaboradas las mutantes, se procedió a realizar el Docking de cada una con la cadena C de colágeno humano. Para esto se utilizó el servidor de Haddock 2.4 (26,27), usando los parámetros estándar para Docking y utilizando los sitios activos de colágeno y de la enolasa antes descritos. Finalmente se eligieron los mejores clústeres para cada Docking y se procedió a hacer el análisis de los resultados.

7.10 Análisis de las mutaciones múltiples

Para llevar a cabo el análisis del impacto de las mutaciones múltiples en la afinidad de la enolasa de *T. cruzi* por el colágeno humano, se tomaron en cuenta varios factores. En primer lugar, se analizaron los puntajes arrojados por el servidor de Haddock 2.4 (26, 27), posteriormente se hizo un análisis del sitio de interacción de ambas proteínas usando PyMol 2.5 (24) donde se obtuvieron los aminoácidos de la enolasa que se encontraban a menos de 5 Å del colágeno, y posteriormente se hallaron los aminoácidos que estaban llevando a cabo interacciones polares con la cadena C de colágeno. Finalmente se utilizó el software Maestro 13.0 (29), para encontrar los aminoácidos de la enolasa de *T. cruzi* que estaban llevando a cabo interacciones de tipo no polar (puentes de hidrógeno, puentes salinos, puentes halógenos, interacción catión pi, apilamiento pi) con la cadena C de colágeno Humano.

8. Resultados

A continuación, se muestran las secuencias de las proteínas usadas para llevar a cabo el Docking entre la enolasa *wild type* (PDB ID 4G7F) (22) con cada una de las 3 cadenas de colágeno humano (PDB ID 7CWK) (23).

- Secuencia aminoacídica de la enolasa *wild type* de *T. cruzi*. El texto resaltado muestra el sitio de interacción de la enolasa

MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHE
 ACELRDDDKRRYLGGKCLNAVKNVNDVL⁷³**APALVGKDELQQS**
TLDKLMRDLDGTPNKSKLGANAIL**GCSMAISKAAAARKGVPLY**
RYLAELAGTKE¹⁴⁰VRLPVPCFNVINGGKHAGNALPFQEFMIAPV
 KAGSFNEALRMGAEVYHSLKSIKKKYGQDAVNVGDEGGFAPPI
 TDINEPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLT
 FKSPPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLEDPYDQDDFDGFA
 GITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTI
 TEAIEASKFCMSNGWSVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIK
 TGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS

- Secuencia aminoacídica del colágeno humano. El texto resaltado muestra el sitio de interacción del colágeno.

PPGPPGPPG⁹**QRGERGFP**¹⁷GPPGPPGPPG

En seguida podemos observar los resultados de los 3 docking que se llevaron a cabo, uno por cada cadena de colágeno, aquí se enlistan los aminoácidos a 5 Å de distancia con respecto a su receptor (cadena C del colágeno), de igual forma los aminoácidos llevando a cabo interacciones polares con el receptor y finalmente se muestra una tabla con los principales puntajes arrojados por el servidor de Haddock 2.4 (26, 27), los cuales brindan información acerca de la energía de las interacciones que se están llevando a cabo entre ambas proteínas, además de la distancia promedio que hay entre los residuos de ambas proteínas.

8.1 Docking enolasa *wild type*-Colágeno cadena A

Aminoácidos de la enolasa a 5 Å de la Cadena A del colágeno 1

G⁷⁹ K⁸⁰ D⁸¹ E⁸² Q⁸⁴ S⁸⁶ T⁸⁷ L⁸⁸ K⁹⁰ L⁹¹ D⁹⁴ L⁹⁵ A¹³³ E¹³⁴ L¹³⁵ A¹³⁶ G¹³⁷ T¹³⁸ K¹³⁹

Aminoácidos de la enolasa llevando a cabo contactos polares con la cadena B del colágeno1

D⁸¹ Q⁸⁴ T⁸⁷ K⁹⁰

Cluster 1	Puntajes
HADDOCK score	-52.1
Tamaño del cluster	51
RMSD	10.7
Energía de Van der Waals	-40.2
Energía Electroestática	-219.2
Energía de solvatación	5.6

Tabla 1: Puntajes obtenidos del Docking entre la enolasa Wild type de *T. cruzi* y la cadena A de colágeno Humano.

8.2 Docking enolasa *wild type*-Colágeno cadena B

Aminoácidos de la enolasa a 5 Å de la Cadena B del colágeno 1

G₇₉ K₈₀ D₈₁ L₈₃ Q₈₄ Q₈₅ S₈₆ T₈₇ L₈₈ K₉₀ L₉₁ D₉₄ L₉₅ R₁₃₀ Y₁₃₁ A₁₃₃ E₁₃₄ L₁₃₅ A₁₃₆ G₁₃₇
T₁₃₈ K₁₃₉ E₃₅₅ K₃₅₈

Aminoácidos de la enolasa llevando a cabo contactos polares con la cadena B del colágeno 1

D₈₁T₈₇K₉₀D₉₄L₁₃₅

Cluster 2	Puntajes
HADDOCK score	-46.2
Tamaño del cluster	69
RMSD	5.2
Energía de Van der Waals	-43.5
Energía Electroestática	-194.3
Energía de solvatación	6.5

Tabla 2: Puntajes obtenidos del Docking entre la enolasa Wild type de *T. cruzi* y la cadena B de colágeno Humano.

8.3 Docking enolasa *wild type*-Colágeno cadena C

Aminoácidos de la enolasa a 5 Å de la cadena C del colágeno 1

D₈₁ L₈₃ Q₈₄ Q₈₅ S₈₆ T₈₇ L₈₈ K₉₀ L₉₁ R₉₃ D₉₄ L₉₅ G₉₇ T₉₈ P₉₉ R₁₂₃ K₁₂₄ G₁₂₅ E₁₃₄ L₁₃₅

Aminoácidos de la enolasa llevando a cabo contactos polares con la cadena C del colágeno1

D₈₁ L₈₃ S₈₆ T₈₇ K₉₀ D₉₄ K₁₂₄

HADDOCK score	-48.1
Tamaño del cluster	29
RMSD	3.2
Energía de Van der Waals	-38.5
Energía Electrostática	-233.8
Energía de solvatación	5.6

Tabla 3: Puntajes obtenidos del Docking entre la enolasa Wild type de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno Humano.

8.4 Análisis del Docking enolasa *wild type*-Colágeno cadena C

Á continuación, podemos observar el modelo 3D resultante del Docking entre la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C del colágeno humano

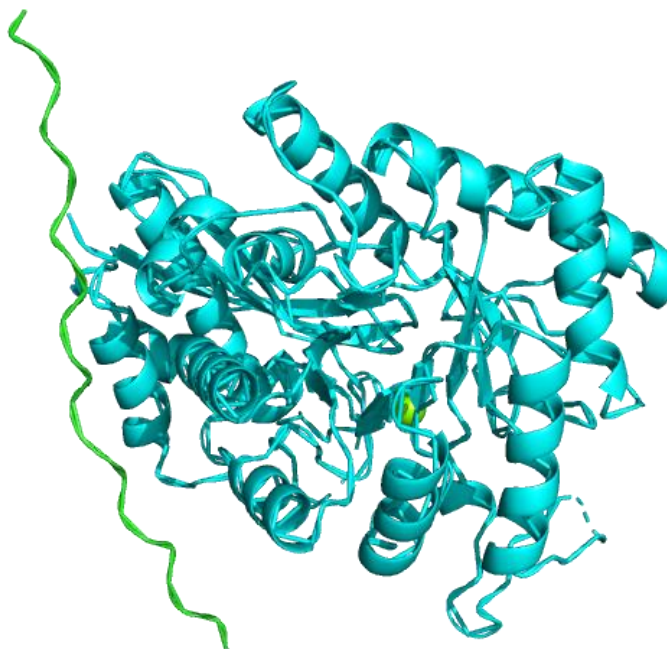


Ilustración 17: Modelo 3D del Docking entre la enolasa de *Trypanosoma cruzi* (estructura en color azul) y la cadena C del colágeno humano (mostrado en color verde). También se puede apreciar el ion de Mg que requiere la enolasa para su correcto funcionamiento.

En seguida se muestran imágenes de los aminoácidos de la enolasa de *T. cruzi* que se encuentran a una distancia de 5 Å de la cadena C de colágeno humano. Estos aminoácidos son de suma importancia debido a que estos son los principales responsables de mediar la interacción entre ambas proteínas, ya que se encuentran dentro del rango donde pueden llevar a cabo interacciones tanto polares como apolares.

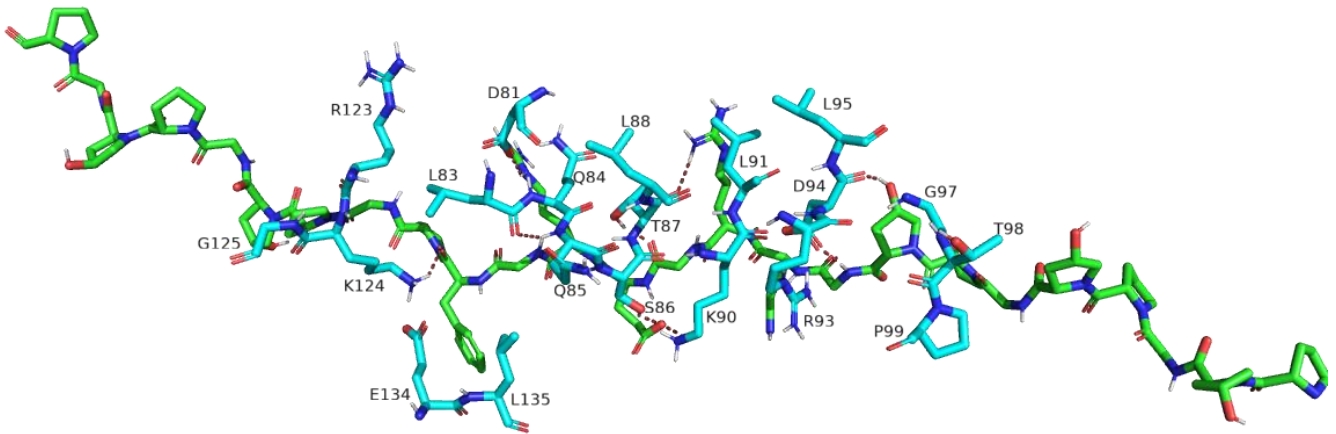


Ilustración 18: Modelo 3D de los aminoácidos de la enolasa de *T. cruzi* a 5 Å o menos de la cadena C de colágeno humano. En color verde se puede observar la cadena C de colágeno humano en su representación de varas, y en color azul se muestran los residuos de la enolasa en su representación de varas. Las líneas punteadas color rojo representan las interacciones polares que están llevando a cabo esos aminoácidos.

Posteriormente podemos observar una imagen 3D que muestra únicamente los aminoácidos llevando a cabo interacciones polares con el colágeno, dichas interacciones están señaladas por las líneas punteadas en color rojo, además se muestra la distancia en Armstrongs entre los aminoácidos llevando a cabo las interacciones.

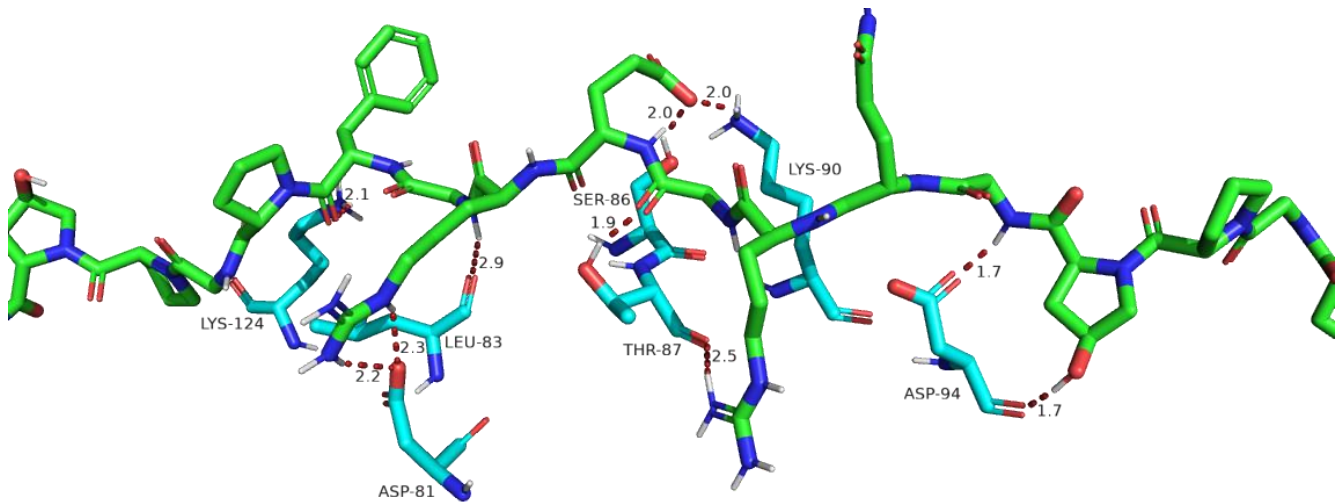


Ilustración 19: Modelo 3D que muestra las interacciones polares entre la cadena C de colágeno humano (verde) y residuos de la enolasa de *T. cruzi* (azul). Las interacciones se encuentran denotadas por las líneas punteadas rojas y además se puede observar la distancia que hay entre los aminoácidos que están llevando a cabo las interacciones.

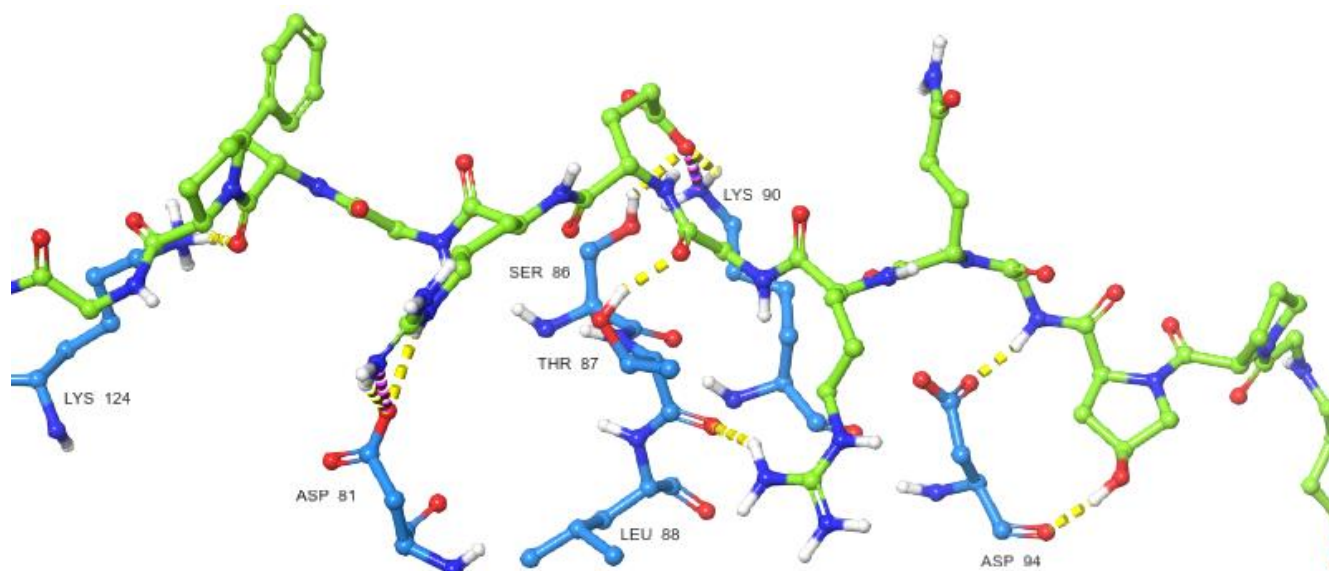


Ilustración 20: Modelo 3D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno (verde) y los residuos aminoácidos de la enolasa de *T. cruzi* (azul). Las líneas punteadas amarillas representan los puentes de hidrógeno y las líneas punteadas rosas representan los puentes salinos.

Con la finalidad de ver detalladamente las interacciones no polares que se están llevando a cabo entre estas moléculas, se muestran los siguientes diagramas 2D, donde se puede observar con más claridad las características de cada interacción no polar que se está llevando a cabo.

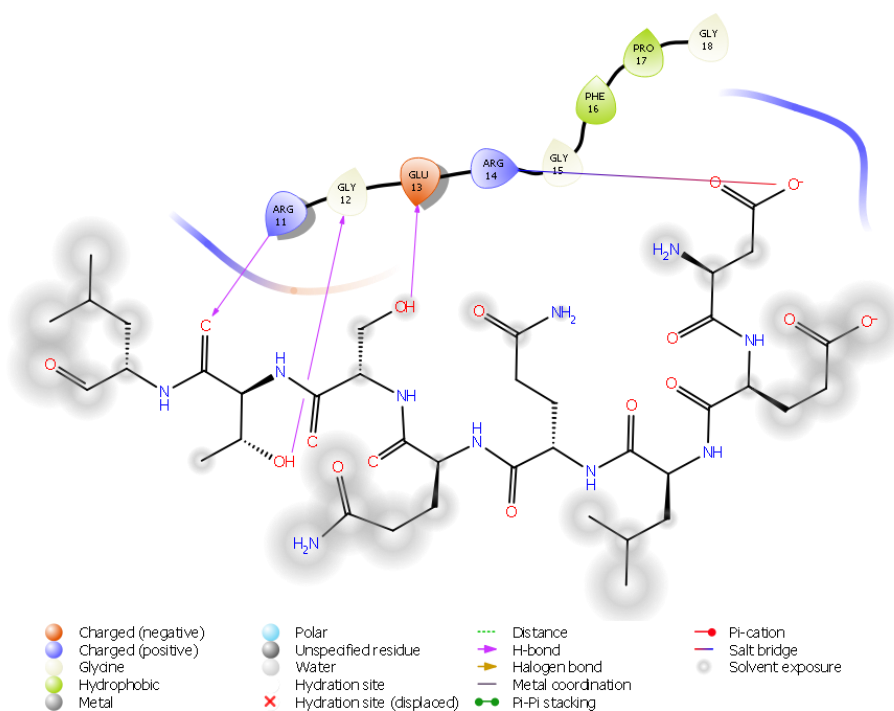


Ilustración 21: Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y los residuos: D_{81} , S_{86} , T_{87} y L_{88} de la enolasa de *T. cruzi*

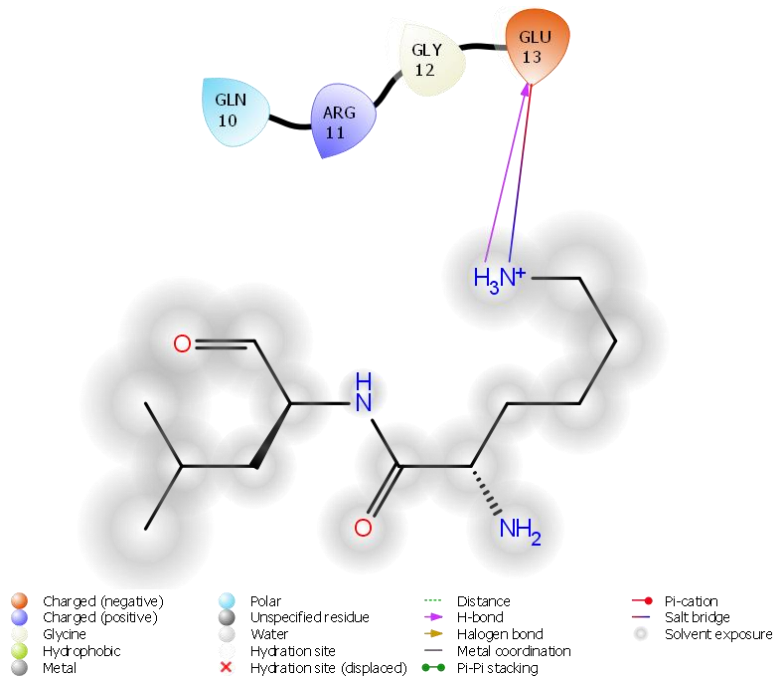


Ilustración 22: Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo: K₉₀ de la enolasa de *T. cruzi*

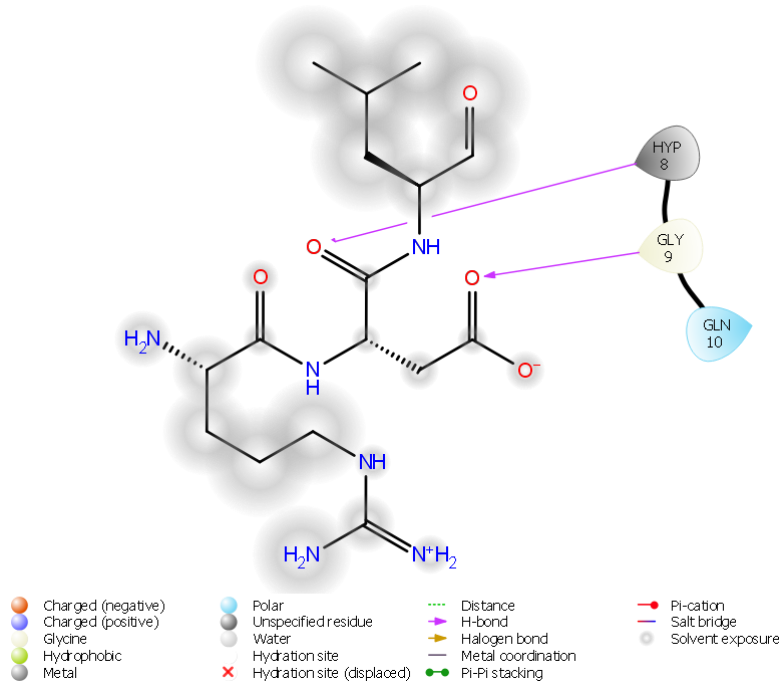


Ilustración 23: Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo: D₉₄ de la enolasa de *T. cruzi*

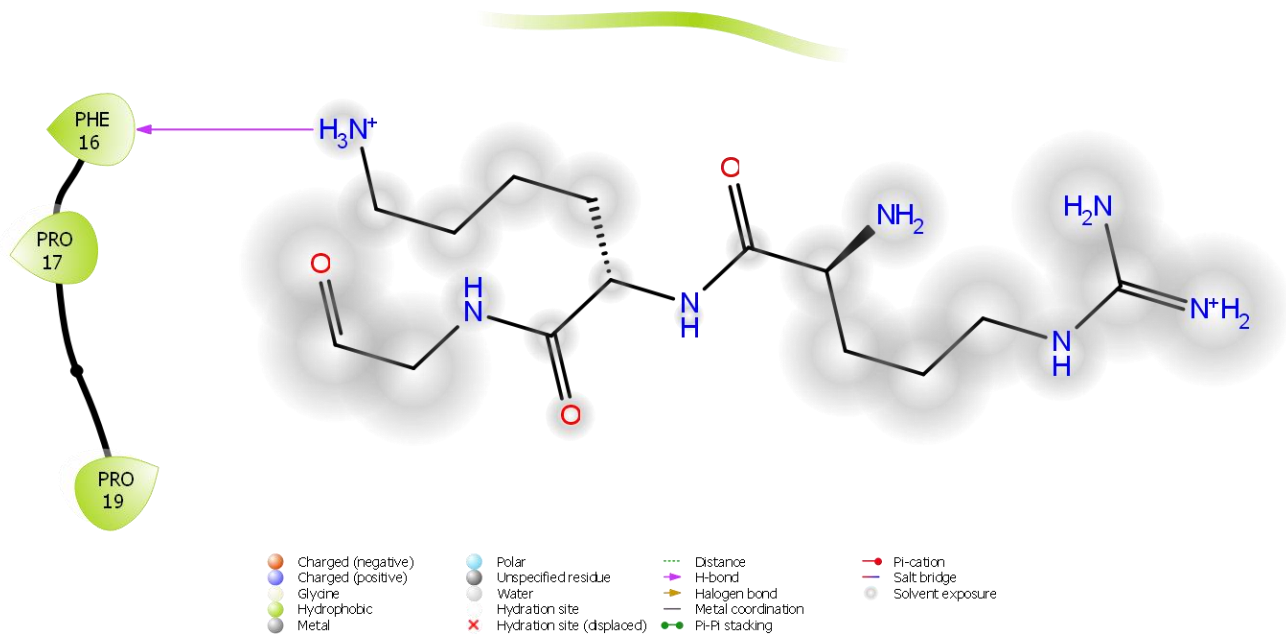
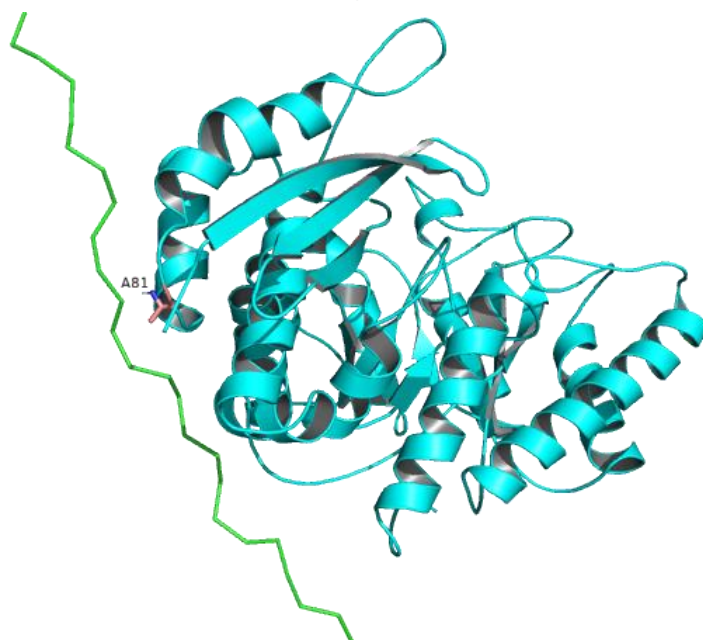


Ilustración 24: Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo: K_{124} de la enolasa de *T. cruzi*

8.5 Docking de la Mutante 1 (D_{81A})

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del Docking de la primera mutante, a la cual se le intercambi6 el 6cido asp6rtico en la posici6n 81 por una alanina con el fin de alterar la afinidad de la enolasa por el col6geno. En primer lugar, podemos observar el modelo resultante del Docking entre ambas prote6nas y posteriormente se muestra la lista de amino6cidos interactuando y la tabla de puntajes obtenida del servidor de Docking.



Ilustraci6n 25: Modelo 3D del Docking entre la mutante D_{81A} (azul) creada a partir de la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de col6geno humano (verde). En rosa podemos observar el residuo aminoac6dico que

- **Secuencia aminoacídica de la mutante 1 (D₈₁A).** El texto resaltado señala el sitio de interacción de la enolasa usado en el Docking, y resaltado en color rojo, se muestra el aminoácido mutado.

MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACEL
 RDDDKRRYLKGKCLNAVKNVNDV**L73APALVGK****AEL**QQSTLDKLMRD
LDGTPNKSKL**GANAILGCSMAISKAAAARKGV**PLYRYLAELAGTKE₁₄₀
 VRLPVPCFNVIINGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEALRMGAEVYH
 SLKSIKKKYGQDAVNVGDEGGFAPPITDINEPLPILMEAIEQAGHKGRF
 AICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWWTAKQLAETYAKWVSEYP
 IVSLEDPYDQDDFDGFAGITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKA
 CNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGWSVMVSHRSGETEDTYIADLVV
 GLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS

Aminoácidos de la enolasa a 5 Å de la cadena C del colágeno 1

T₂ P₇₅ A₇₆ G₇₉ K₈₀ A₈₁ L₈₃ Q₈₄ Q₈₅ S₈₆ T₈₇ L₈₈ L₉₁ K₁₂₄ A₁₃₃ E₁₃₄ L₁₃₅ G₁₃₇ T₁₃₈ K₁₃₉
 E₁₄₀ T₃₅₁ E₃₅₅ K₃₅₈ H₄₂₀ K₄₂₂

Aminoácidos de la enolasa llevando a cabo contactos polares con la cadena C del colágeno1

Q₈₄ S₈₆ T₈₇ E₁₃₄ T₁₃₈ K₁₃₉ E₃₅₅

Cluster 1	Puntajes
HADDOCK score	-45.0
Tamaño del cluster	10
RMSD	2.0
Energía de Van der Waals	-38.0
Energía Electrostática	-230.9
Energía de solvatación	4.1

Tabla 4: Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 1 (D₈₁) creada a partir de la enolasa de T. cruzi y la cadena C de colágeno Humano.

En la siguiente imagen podemos ver un modelo 3D donde se muestran los aminoácidos de la enolasa próximos al colágeno

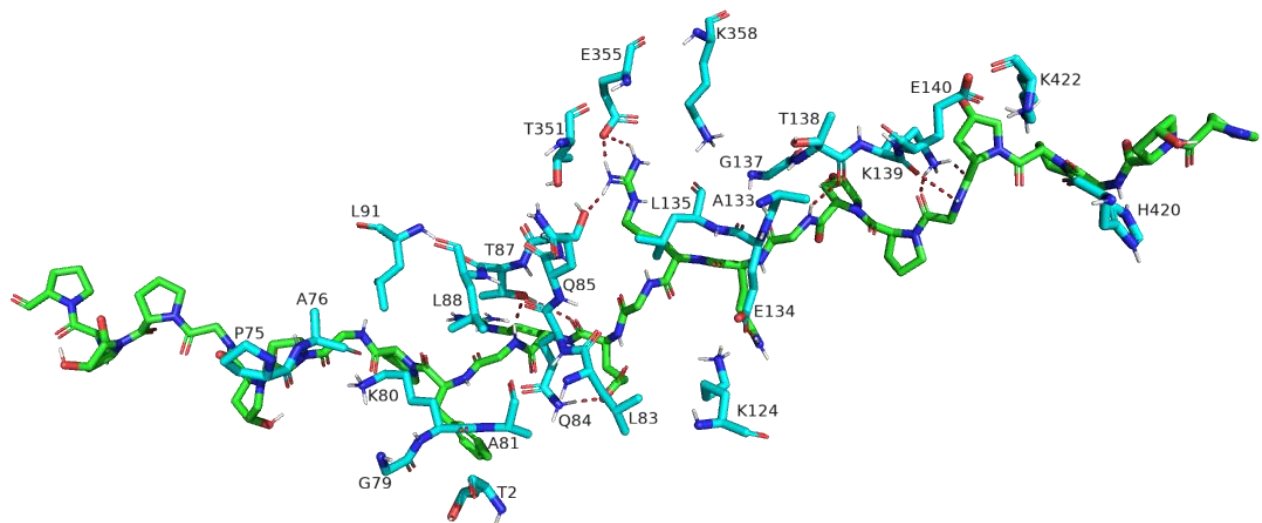


Ilustración 26: Imagen de los aminoácidos de la mutante $D_{81}A$ (azul) a una distancia de 5Å o menos de la cadena C de colágeno (verde). Además, en la imagen podemos observar las interacciones de tipo polar que se están llevando a cabo, representadas con una línea roja punteada.

En la próxima imagen se muestran solamente los aminoácidos llevando a cabo interacciones polares con la cadena C del colágeno. Además, se señalan las distancias en Armstrong de los aminoácidos llevando a cabo estas interacciones.

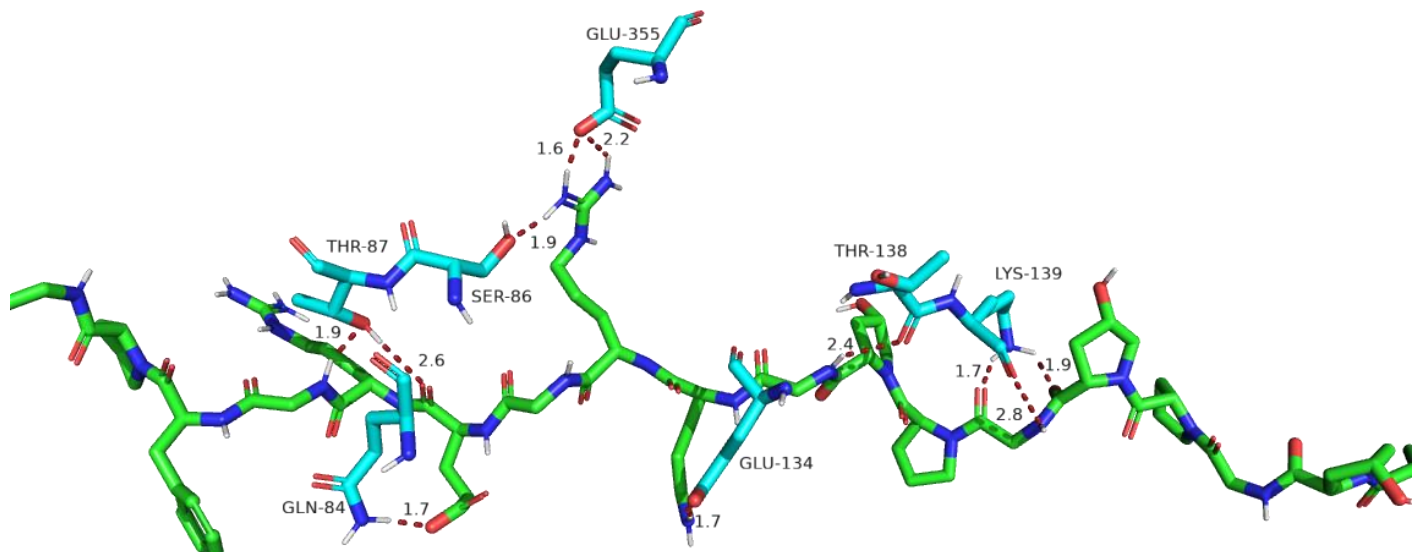


Ilustración 27: modelo 3D de las interacciones polares entre los residuos de la mutante $D_{81}A$ de la enolasa de *T. cruzi* (azul) y la cadena C de colágeno (verde). La línea punteada roja indica las interacciones polares que se están llevando a cabo y las distancias entre los aminoácidos interactuando, las distancias están medidas en Armstrongs.

8.6 Docking de la Mutante 2 ($L_{83}A$)

En la siguiente mutante, la mutación llevada a cabo fue en el aminoácido L_{83} , el cual se cambió por una alanina, lo cual permitió observar si este aminoácido estaba llevando a cabo algún rol importante en la interacción entre la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno.

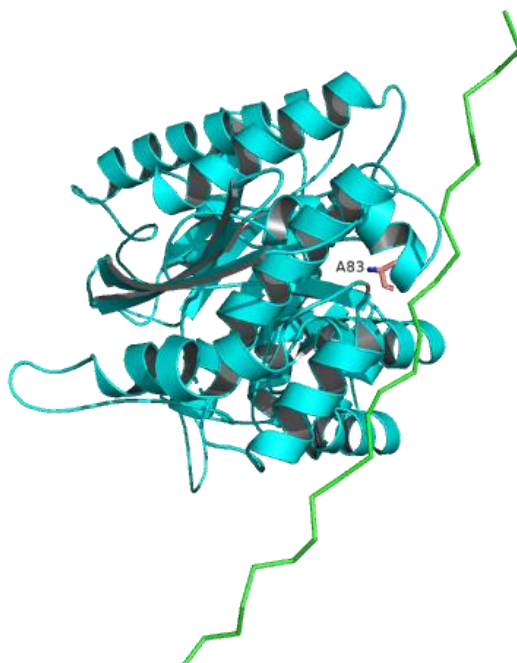


Ilustración 28: Modelo 3D del Docking de la segunda mutante creada a partir de la enolasa de *T. cruzi*. En la imagen se puede observar la mutante de color azul, con el residuo aminoacídico mutado en color rosa y el colágeno en color verde

- **Secuencia aminoacídica de la mutante 2 (L₈₃A).** En la secuencia se muestra de forma resaltada el sitio de interacción de la enolasa y resaltado en color rojo, el residuo que ha sido mutado.

MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHE
 ACELRDDDKRRYLKGKCLNAVKNVNDVL₇₃**APALVGKDE**AQQST
LDKLMRDLDGTPNKS**KL**GANAILGCSMAISKAAAARKGVPLYR
 YLAELAGTKE₁₄₀VRLPVPFCFNVINGGKHAGNALPFQEFMIAPVKA
 GSFNEALRMGAEVYHSLKSIKKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDI
 NEPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKS
 PEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLEDPYDQDDFDGFAGITEA
 LKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEA
 SKFCMSNGWSVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCR
 GERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS

La lista de aminoácidos de la enolasa a 5 Å del colágeno y los aminoácidos llevando a cabo interacciones polares se muestra a continuación

Aminoácidos de la enolasa a 5 Å de la cadena C del colágeno 1

A₇₆ L₇₇ K₈₀ D₈₁ A₈₃ Q₈₄ Q₈₅ S₈₆ T₈₇ L₈₈ K₉₀ L₉₁ R₉₃ D₉₄ L₉₅ K₁₂₄ V₁₂₆ E₁₃₄ L₁₃₅ A₁₃₆ G₁₃₇
 K₃₅₄

Aminoácidos de la enolasa llevando a cabo contactos polares con la cadena C del colágeno1

A₇₆ A₈₃ S₈₆ T₈₇ K₉₀ K₁₂₄

A continuación, se muestra la tabla con los puntajes obtenidos del servidor de Docking.

Cluster 1	Puntajes
HADDOCK score	-46.0
Tamaño del cluster	37
RMSD	2.5
Energía de Van der Waals	-41.7
Energía Electrostatica	-207.6
Energía de solvatación	4.8

Tabla 5: Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 2 (L₈₃) creada a partir de la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno Humano.

Las siguientes imágenes muestran un modelo 3D donde se puede observar claramente a los aminoácidos que se encuentran a una distancia de 5 Å o menos de la cadena C del colágeno y los aminoácidos llevando a cabo interacciones polares y las distancias que existen entre ellos.

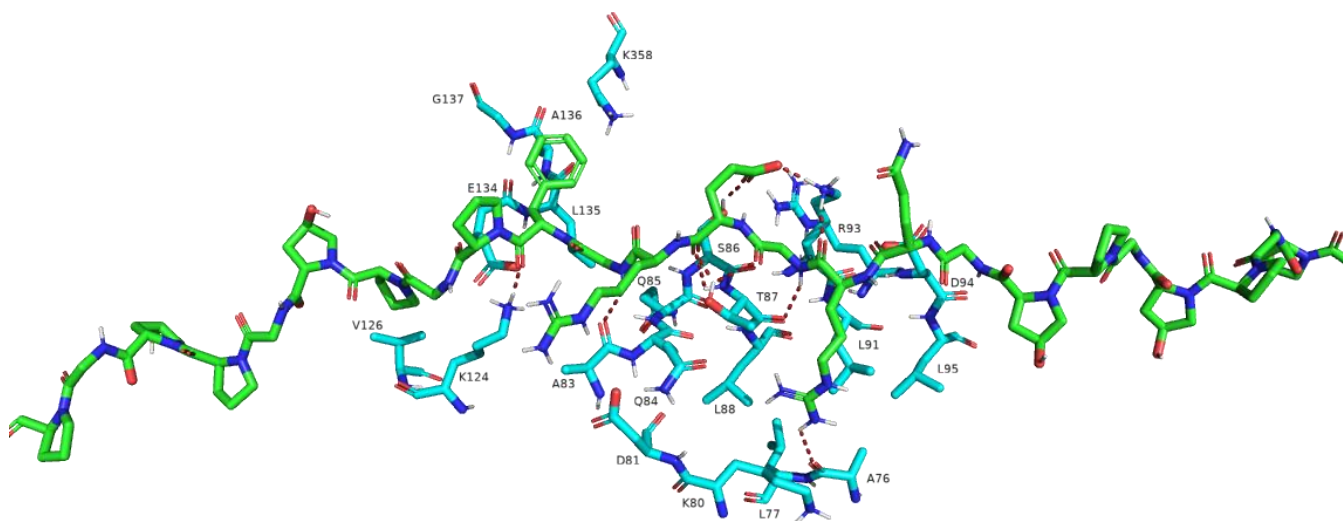


Ilustración 29: Modelo 3D del Docking de la mutante L₈₃A, en esta imagen se pueden observar los aminoácidos de la mutante que se encuentran a menos de 5 Å del colágeno, que es la distancia máxima a la que se pueden llevar a cabo interacciones polares y apolares. En color verde se observa la cadena C de colágeno tipo I humano y en color azul se muestran los residuos de la mutante. Las líneas punteadas rojas señalan las interacciones polares que se están llevando a cabo entre ambas proteínas

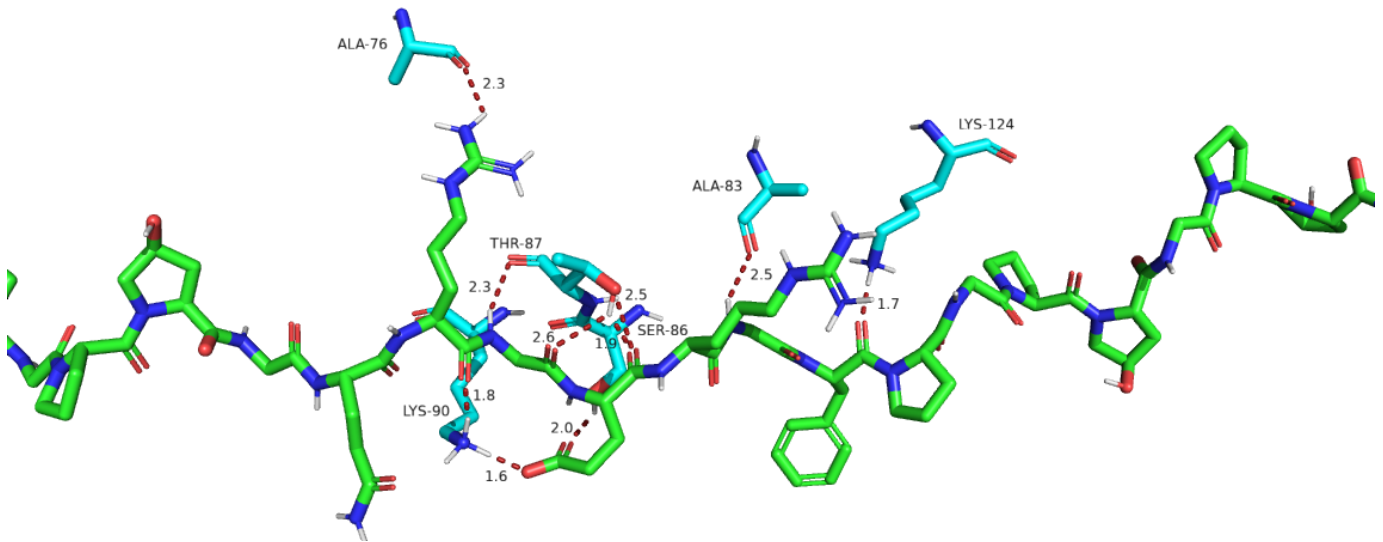


Ilustración 30: Modelo 3D de la mutante $L_{83}A$ que muestra los residuos que están llevando a cabo interacciones polares con la cadena de colágeno. En color azul podemos ver los residuos de la mutante de enolasa y en verde la cadena de colágeno. Denotadas por líneas rojas punteadas podemos encontrar las interacciones polares entre ambas cadenas y aun lado la distancia entre estos átomos medida en Armstrong.

8.7 Docking de la mutante 3 ($S_{86}A$)

La próxima mutante creada a partir de la enolasa de *T. cruzi* fue la $S_{86}A$, en la cual se sustituyó el residuo 86 de Serina por una Alanina. A continuación, podemos ver el modelo resultante al llevar a cabo el Docking entre ambas proteínas.

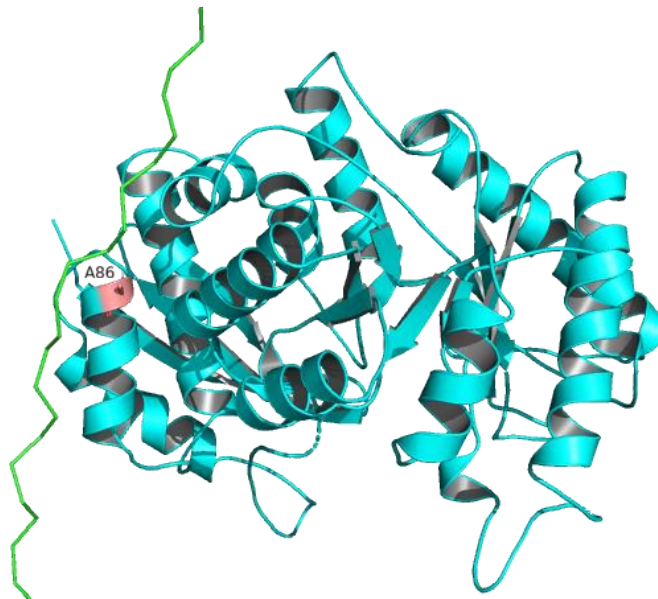


Ilustración 31: Modelo 3D del Docking entre la mutante $S_{86}A$ (azul) creada a partir de la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno humano. En color rosa podemos observar el dominio aminoacídico mutado.

- **Secuencia aminoacídica de la mutante 3 (S₈₆A).** En la secuencia se muestra de forma resaltada el sitio de interacción de la enolasa y resaltado en color rojo, el residuo que ha sido mutado.

MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEAC
 ELRDDDKRRYLKGKCLNAVKNVNDV**L₇₃APALVGKDELQQATL**DKL
MRDLDGTPNK**SKL**GANAILGCSMAISKAAAARKGVPLYRYLAELA
GTKE₁₄₀VRLPVPCFNVINGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEAL
 RMGAEVYHSLKSIKKKYGQDAVNVGDEGGFAPPITDINEPLPILME
 AIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQ
 LAETYAKWVSEYPIVSLEDPYDQDDFDGFAGITEALKGKAQVVGDD
 LTVTNSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGWSVM
 VSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEE
 ELGAHAKFGFPAWS

En seguida se enlistan los aminoácidos de la enolasa a 5 Å del colágeno, y los aminoácidos llevando a cabo interacciones polares.

Aminoácidos de la enolasa a 5 Å de la cadena C del colágeno 1

K₈₀ D₈₁ L₈₃ Q₈₄ Q₈₅ A₈₆ T₈₇ L₈₈ K₉₀ L₉₁ D₉₅ L₉₄ A₁₃₃ E₁₃₄ L₁₃₅ G₁₃₇ T₁₃₈ K₁₃₉ T₃₅₁ E₃₅₅
 K₃₅₈

Aminoácidos de la enolasa llevando a cabo contactos polares con la cadena C del colágeno1

Q₈₄ T₈₇ K₉₀ D₉₄

En la siguiente tabla se presentan los puntajes obtenidos del Docking entre ambas moléculas.

Cluster 1	Puntajes
HADDOCK score	-48.1
Tamaño del cluster	50
RMSD	4.9
Energía de Van der Waals	-44.3
Energía Electrostática	-171.6
Energía de solvatación	1.4

Tabla 6: Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 3 (S₈₆) creada a partir de la enolasa de T. cruzi y la cadena C de colágeno Humano.

En las siguientes imágenes se pueden observar los aminoácidos de la enolasa lo suficientemente cerca de la cadena C de colágeno humano como para interactuar y los aminoácidos que están llevando a cabo interacciones polares con el colágeno.

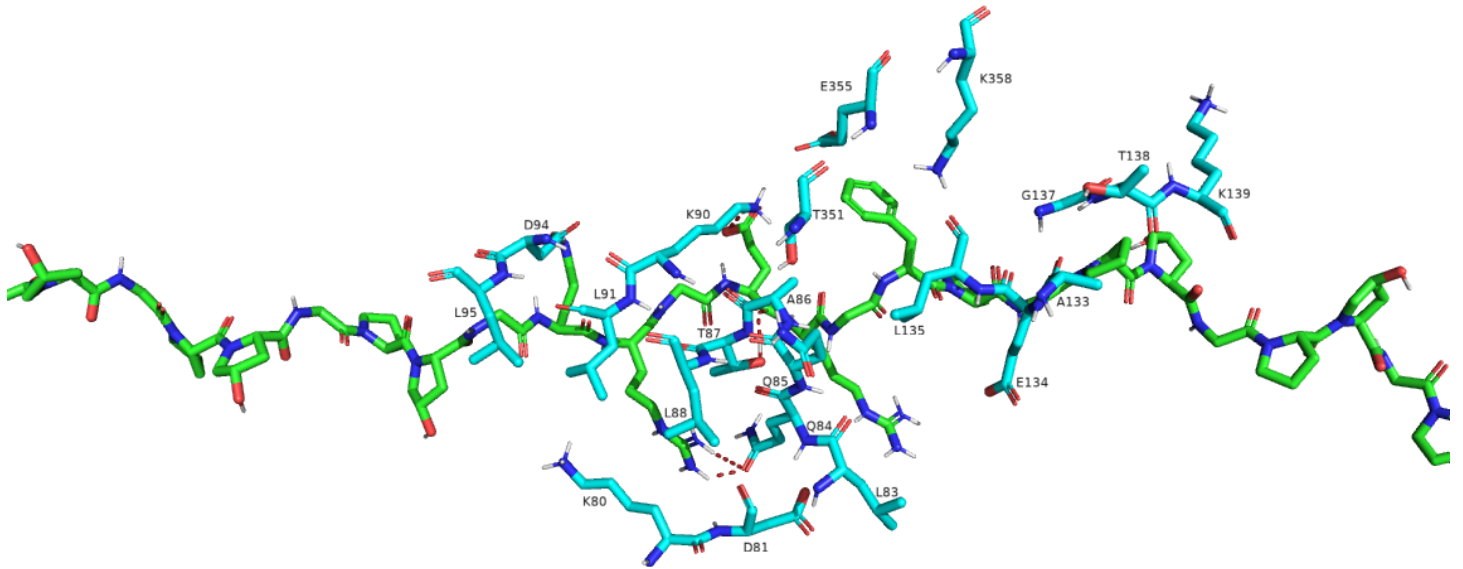


Ilustración 32: Imagen 3D de los aminoácidos de la mutante S86 (azul) a menos de 5 Å de la cadena C de colágeno (verde). Las líneas punteadas rojas representan las interacciones polares entre ambas proteínas.

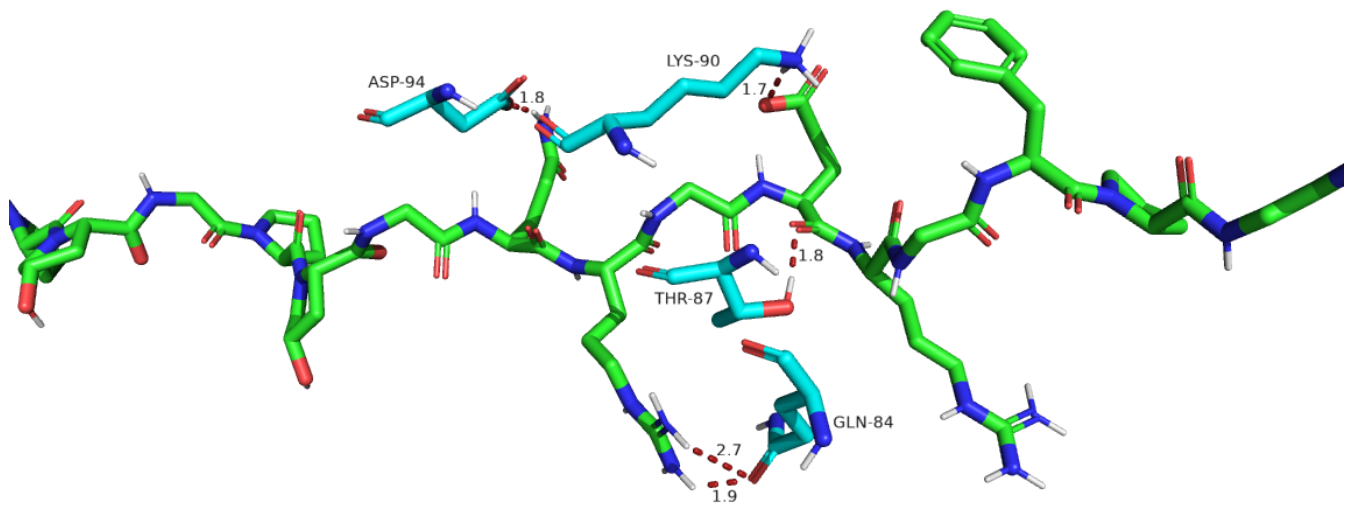


Ilustración 33: Imagen 3D de los aminoácidos de la mutante S86 (azul) llevando a cabo interacciones polares con la cadena C de colágeno humano (verde). Las líneas punteadas rojas representan las interacciones y a un lado se pueden observar las distancias entre estos aminoácidos medidas en Armstrong.

8.8 Docking de la mutante 4 (T₈₇A)

La siguiente mutante de la enolasa de *T. cruzi* es la T₈₇A, la cual se creó cambiando la treonina 87 por una alanina. En la siguiente imagen podemos observar el modelo resultante de su Docking con la cadena C de colágeno humano,



Ilustración 34: Modelo 3D del Docking entre la mutante T₈₇ (azul) creada a partir de la enolasa de *Trypanosoma Cruzi* y la cadena C de colágeno humano (verde). El aminoácido mutado se muestra en color rosa.

- **Secuencia aminoacídica de la mutante 4 (T₈₇A).** En la secuencia se muestra de forma resaltada el sitio de interacción de la enolasa y resaltado en color rojo, el residuo que ha sido mutado.

```
MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHE  
ACELRDDDKRRYLKGKCLNAVKNVNDVL73APALVGKDELQQSA  
LDKLMRDLDGTPNKSKLGANAILGCSMAISKAAAARKGVPLYR  
YLAELAGTKE140VRLPVPCFNVINGGKHAGNALPFQEFMIAPVKA  
GSFNEALRMGAEVYHSLKSIKKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDI  
NEPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKS  
PEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLEDPYDQDDFDGFAGITEA  
LKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEA  
SKFCMSNGWSVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCR  
GERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS
```

En seguida se enlistan los aminoácidos de la enolasa a 5 Å del colágeno, y los aminoácidos llevando a cabo interacciones polares.

Aminoácidos de la enolasa a 5 Å de la cadena C del colágeno 1

A76 K80 D81 L83 Q84 Q85 S86 A87 L88 K90 L91 D94 K124 V126 R130 Y131 E134 L135 K358

Aminoácidos de la enolasa llevando a cabo contactos polares con la cadena C del colágeno1

D81 L83 Q84 S86 A87 K90 D94 K124 E134

En la siguiente tabla se muestran los puntajes obtenidos del Docking entre la mutante T₈₇ y a cadena C de colágeno humano.

Cluster 1	Puntajes
HADDOCK score	-51.0
Tamaño del cluster	36
RMSD	3.0
Energía de Van der Waals	-34.4
Energía Electrostática	-259.6
Energía de solvatación	4.6

Tabla 7: Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 4 (T₈₇) creada a partir de la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno Humano.

En las siguientes imágenes se pueden observar los aminoácidos a una distancia viable para llevar a cabo interacciones y los aminoácidos llevando a cabo interacciones polares.

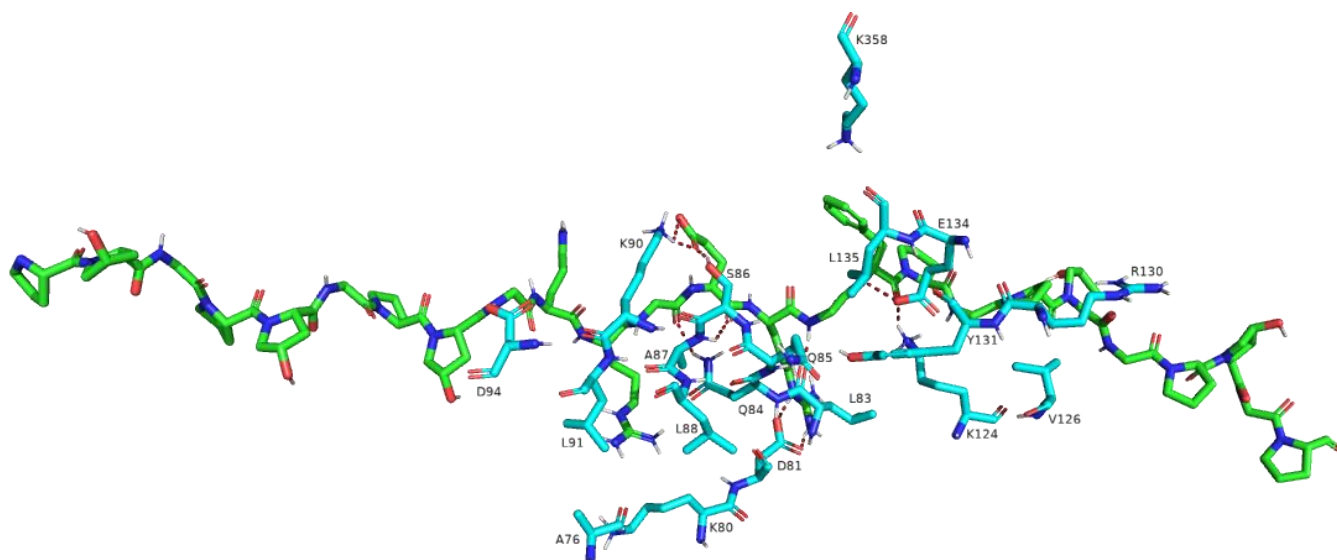


Ilustración 35: Imagen 3D que muestra los aminoácidos de la mutante T₈₇A (azul), que se encuentran dentro del rango de interacción con la cadena C de colágeno humano (verde). Las líneas rojas punteadas señalan las interacciones polares que se están llevando a cabo entre ambas proteínas.

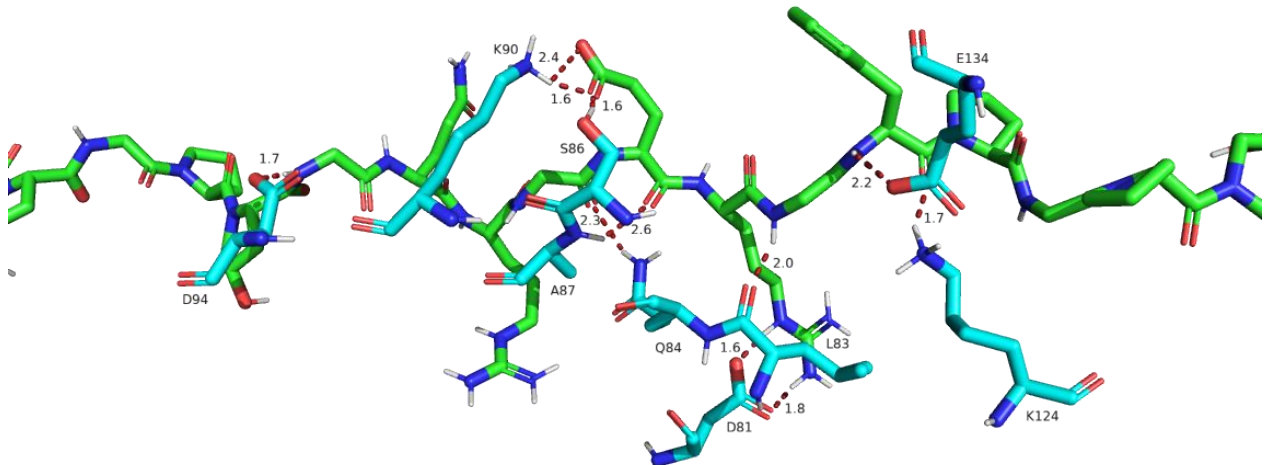


Ilustración 36: Imagen 3D de los aminoácidos de la mutante $T_{87}A$ (azul) llevando a cabo interacciones polares con la cadena C de colágeno (verde). Las interacciones se muestran como líneas punteadas rojas y la distancia entre los aminoácidos llevando a cabo las interacciones está marcada en Armstrongs

8.9 Docking de la mutante 5 ($K_{90}A$)

Otra de las mutantes creadas a partir de la enolasa de *T. cruzi*, fue la mutante $K_{90}A$, la cual se creó cambiando la lisina ubicada en la posición 90 por una alanina. En la siguiente imagen se observa el modelo resultante del Docking entre esta proteína y la cadena C de colágeno.



Ilustración 37: Modelo 3D del Docking entre la mutante $K_{90}A$ (azul) creada a partir de la enolasa de *T. cruzi*, y la cadena C de colágeno humano (verde). El residuo mutado de la enolasa se muestra en color rosa.

- **Secuencia aminoacídica de la mutante 5 (K₉₀A).** En la secuencia se muestra de forma resaltada el sitio de interacción de la enolasa y resaltado en color rojo, el residuo que ha sido mutado.

MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTELGVFRSAVPSGASTGIHEACE
 LRDDDKRRYLKGKCLNAVKNVNDV**L73APALVGKDELQQSTLDALM**
RDLDGTPNKSKLGANAILGCSMAISKAAAARKGVPLYRYLAELAGTK
E140VRLPVPCFNIVINGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEALRM
 GAEVYHSLKSIKKKYGQDAVNVDGDEGGFAPPITDINEPLPILMEAIE
 QAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQLAE
 TYAKWVSEYPIVSLEDPYDQDDFDGFAGITEALKGKAQVVGDDLTV
 TNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGWSVMVSHR
 SGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAH
 AKFGFPAWS

Posteriormente se enlistan los aminoácidos de la enolasa que se encuentran una distancia óptima para llevar a cabo interacciones con colágeno y también los aminoácidos llevando a cabo interacciones polares.

Aminoácidos de la enolasa a 5 Å de la cadena C del colágeno 1

Q₈₅ S₈₆ T₈₇ D₈₉ A₉₀ R₉₃ D₉₄ D₉₆ G₉₇ T₉₈ P₉₉ N₁₀₀ K₁₀₁ A₁₃₃ E₁₃₄ L₁₃₅ A₁₃₆ G₁₃₇ T₁₃₈ K₁₃₉
 T₃₄₉ T₃₅₁ E₃₅₂ I₃₅₄ E₃₅₅ K₃₅₈

Aminoácidos de la enolasa llevando a cabo contactos polares con la cadena C del colágeno1

S₈₆ R₉₃ D₉₄ E₁₃₄ L₁₃₅ T₃₅₁ K₃₅₈

En la próxima tabla se muestran los puntajes obtenidos del Docking entre ambas proteínas.

Cluster 3	Puntajes
HADDOCK score	-53.5
Tamaño del cluster	21
RMSD	8.9
Energía de Van der Waals	-48.5
Energía Electrostática	-177.8
Energía de solvatación	-4.4

Tabla 8: Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 5 (K₉₀A) creada a partir de la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno Humano.

A continuación, se muestran imágenes del Docking entre ambas proteínas donde se pueden observar los aminoácidos de la enolasa a menos de 5 Å del colágeno, y también los aminoácidos llevando a cabo interacciones polares.

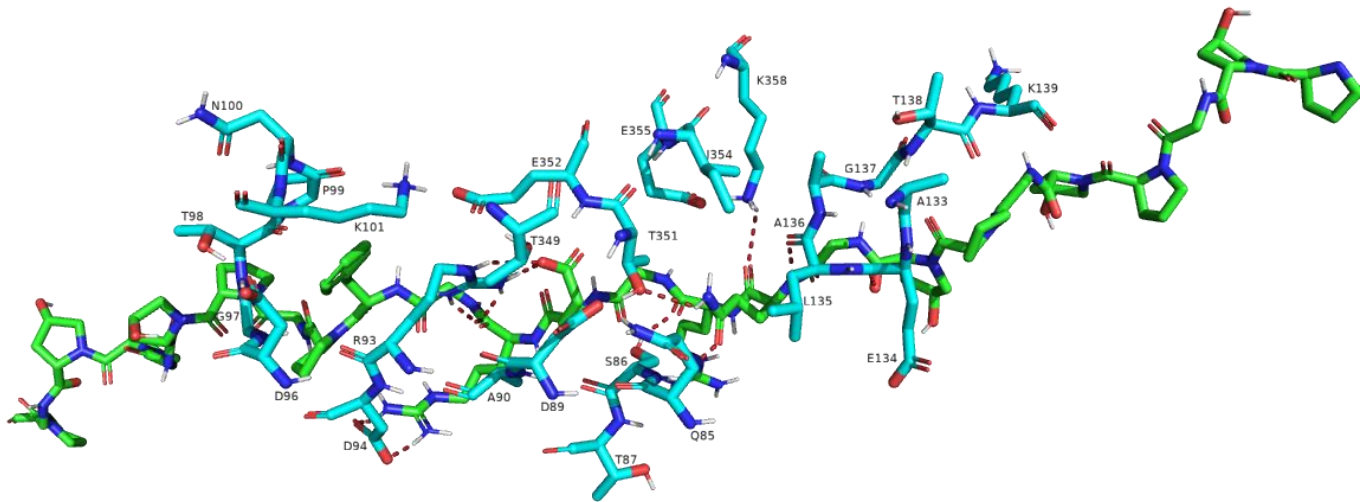


Ilustración 38: Modelo 3D del Docking entre la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno. En la imagen se observan los aminoácidos de la mutante $K_{90}A$ (azul) a 5 Å o menos de la cadena C de colágeno humano (verde). De igual forma se pueden observar en forma de líneas punteadas rojas las interacciones polares entre ambas proteínas.

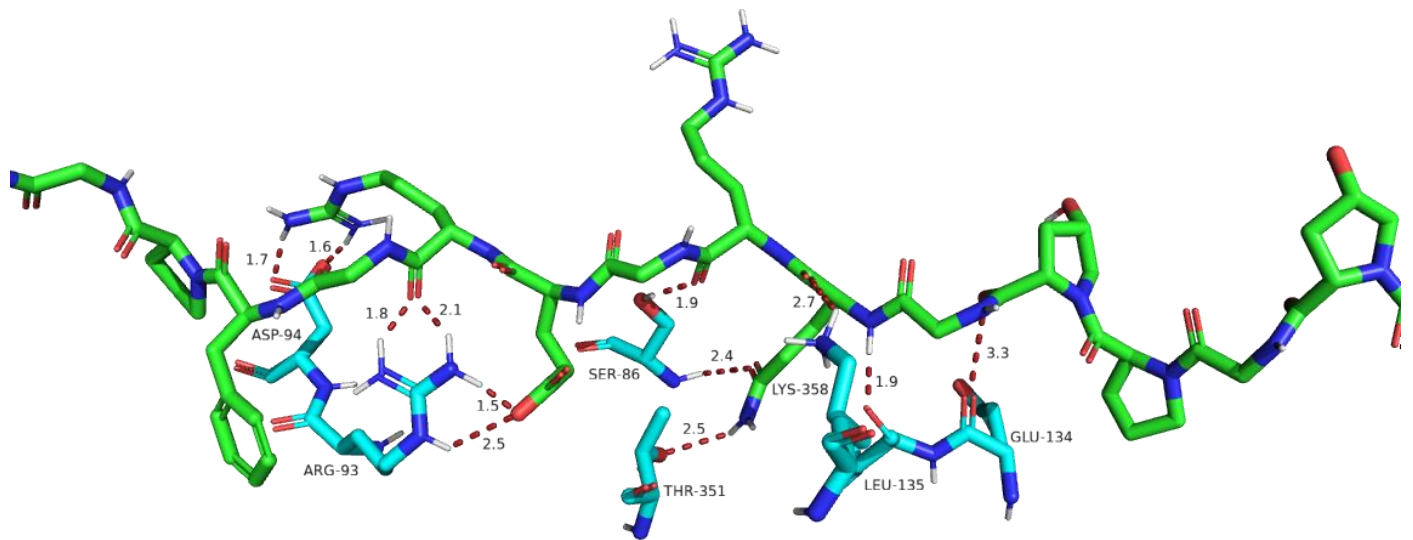
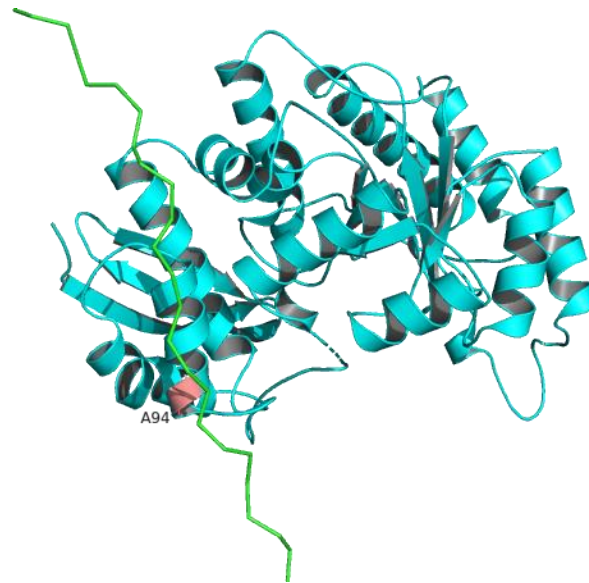


Ilustración 39: Imagen 3D de los residuos aminoácidos de la mutante $K_{90}A$ (azul) llevando a cabo interacciones polares con la cadena C de colágeno humano (verde). Las interacciones se muestran como líneas punteadas rojas y las distancias están medidas en Armstrongs.

8.10 Docking de la Mutante 6 (D₉₄A)

La siguiente mutante en la lista es la mutante D₉₄A, la cual se generó a partir de la enolasa de *T. cruzi*, sustituyendo el residuo aminoacídico 94 (ácido aspártico) por una alanina. El modelo resultante del Docking de esta mutante con la cadena C del colágeno se muestra a continuación.



*Ilustración 40: Modelo 3D del Docking entre la mutante D₉₄A (azul) creada a partir de la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno Humano (verde). El residuo mutado se muestra en color rosa*

- **Secuencia aminoacídica de la mutante 6 (D₉₄A).** En la secuencia se muestra de forma resaltada el sitio de interacción de la enolasa y resaltado en color rojo, el residuo que ha sido mutado.

```
MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHE
ACELRDDDKRRYLGGKCLNAVKNVNDVL73APALVGKDELQQS
TLDKLMRALDGTPNKSKLGANAILGCSMAISKAAAARKGVPLY
RYLAELAGTKE140VRRLPVPCFNVIINGGKHAGNALPFQEFMIAPV
KAGSFNEALRMGAEVYHSLKSIKKKYGQDAVNVGDEGGFAPPI
TDINEPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLT
FKSPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLEDPYDQDDFDGFA
GITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTI
TEAIEASKFCMSNGWSVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIK
TGAPCRGERTAKLNQLLRIEEELGAHAKFGFPAWS
```

En seguida se muestra una lista de los aminoácidos dentro del rango de interacción de la enolasa con el colágeno y de los aminoácidos llevando a cabo interacciones polares entre ambas proteínas.

Aminoácidos de la enolasa a 5 Å de la cadena C del colágeno 1

A76 K80 D81 L83 Q84 Q85 S86 T87 L88 K90 L91 R93 A94 L95 D96 G97 T98 K103 V126 E134 L135

Aminoácidos de la enolasa llevando a cabo contactos polares con la cadena C del colágeno 1

D81 L83 T87 K90 R93 K124

En la siguiente tabla se muestran los puntajes obtenidos del Docking entre ambas proteínas.

Cluster 2	Puntajes
HADDOCK score	-46.7
Tamaño del cluster	23
RMSD	9.7
Energía de Van der Waals	-41.5
Energía Electrostatica	-206.3
Energía de solvatación	4.9

Tabla 9: Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 6 (D₉₄A) creada a partir de la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno Humano.

En las siguientes imágenes podremos observar los aminoácidos de la mutante de la enolasa de *T. cruzi* dentro de la zona de interacción con el colágeno, y los aminoácidos llevando a cabo interacciones polares.

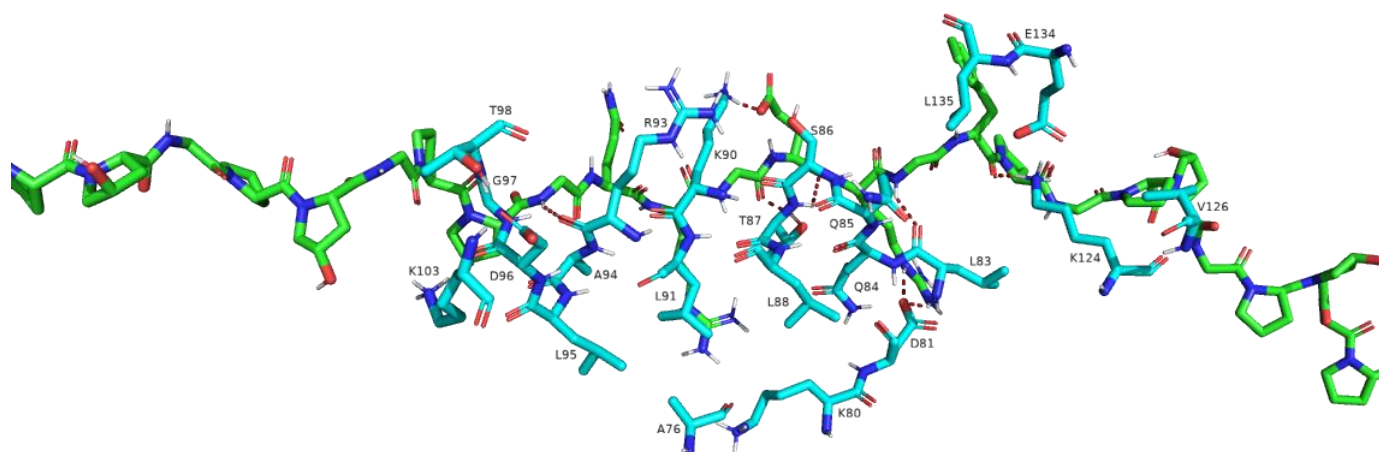


Ilustración 41: Imagen 3D de los aminoácidos de la mutante D₉₄A (azul) dentro del perímetro de interacción con la cadena C de colágeno humano (verde). Las líneas punteadas rojas representan las interacciones polares entre ambas proteínas.

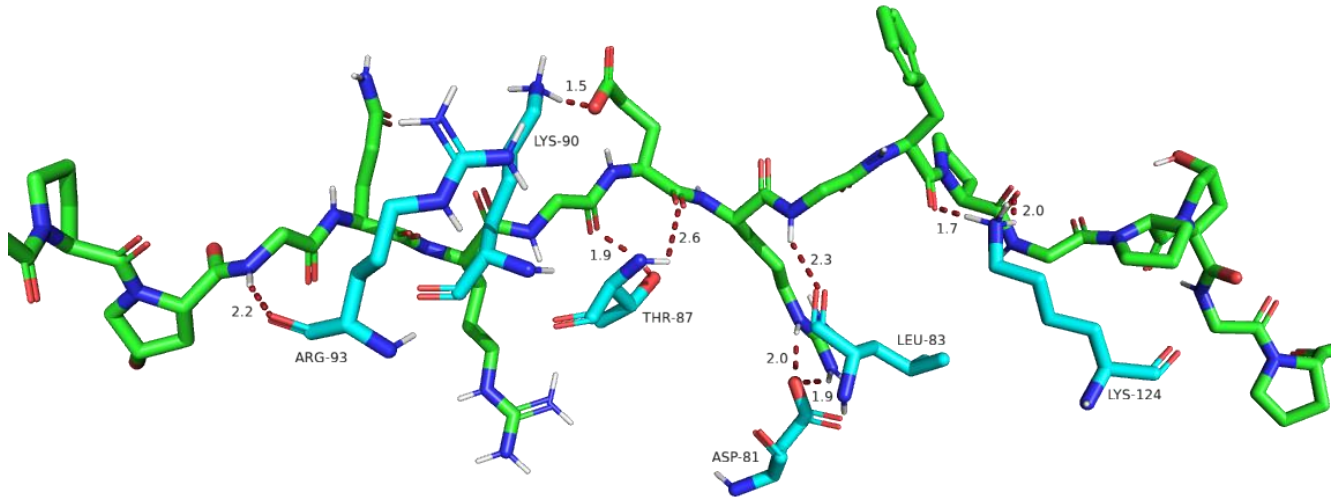


Ilustración 42: Imagen que muestra los aminoácidos de la mutante $D_{94}A$ (azul) llevando a cabo interacciones polares con la cadena C de colágeno humano (verde). Las interacciones se muestran como líneas punteadas rojas y las distancias están medidas en Armstrongs.

8.11 Docking de la mutante 7 ($K_{124}A$)

La última mutante simple creada a partir de la enolasa de *T. cruzi* fue la $K_{124}A$, la cual se creó cambiando el residuo aminoacídico en la posición 124 (lisina) por una alanina. El modelo resultante del Docking entre ambas proteínas se puede observar a continuación.

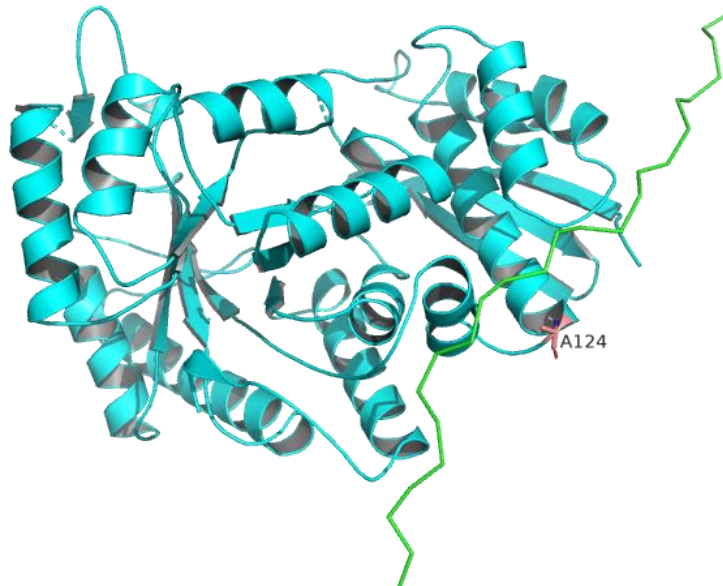


Ilustración 43: Modelo 3D del Docking entre la mutante $K_{124}A$ (azul) creada a partir de la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno humano (verde). El residuo mutado se observa en color rosa.

- **Secuencia aminoacídica de la mutante 7 (K₁₂₄A).** En la secuencia se muestra de forma resaltada el sitio de interacción de la enolasa y resaltado en color rojo, el residuo que ha sido mutado.

MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHE
 ACELRDDDKRRYLGGKCLNAVKNVNDV**L₇₃APALVGKDELQQS**
TLDKLMRDLGTPNKSKL**GANAILGCSMAISKAAAARAGVPLY**
RYLAELAGTKE₁₄₀VRLPVPCFNVINGGKHAGNALPFQEFMIAPV
 KAGSFNEALRMGAEVYHSLKSIKKKYGQDAVNVGDEGGFAPPI
 TDINEPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLT
 FKSPPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLEDPYDQDDFDGFA
 GITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTI
 TEAIEASKFCMSNGWSVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIK
 TGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS

A continuación, se muestran los aminoácidos de la enolasa a menos de 5 Å de la cadena C del colágeno, y también los aminoácidos de la enolasa llevando a cabo interacciones polares con el colágeno.

Aminoácidos de la enolasa a 5 Å de la cadena C del colágeno 1

M₁ T₂ G₇₉ K₈₀ D₈₁ E₈₂ L₈₃ Q₈₄ Q₈₅ S₈₆ T₈₇ L₈₈ R₁₂₃ R₁₃₀ A₁₃₃ E₁₃₄ L₁₃₅ A₁₃₆ G₁₃₇ T₁₃₈
 K₁₃₉ E₁₄₀ V₁₄₁ K₃₅₈ H₄₂₀

Aminoácidos de la enolasa llevando a cabo contactos polares con la cadena C del colágeno1

M₁ G₇₉ K₈₀ D₈₁ S₈₆ T₈₇ E₁₃₄

En la siguiente tabla se muestran los puntajes obtenidos del Docking entre ambas proteínas.

Cluster 5	Puntajes
HADDOCK score	-44.7
Tamaño del cluster	12
RMSD	0.9
Energía de Van der Waals	-38.6
Energía Electrostatica	-229.9
Energía de solvatación	5.8

Tabla 10: Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 7 (K₁₂₄A) creada a partir de la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno Humano.

Posteriormente Podemos observar imágenes de los aminoácidos de la mutante que se encuentran a una distancia de 5 Å o menos de la cadena de colágeno, y de los aminoácidos llevando a cabo interacciones polares.

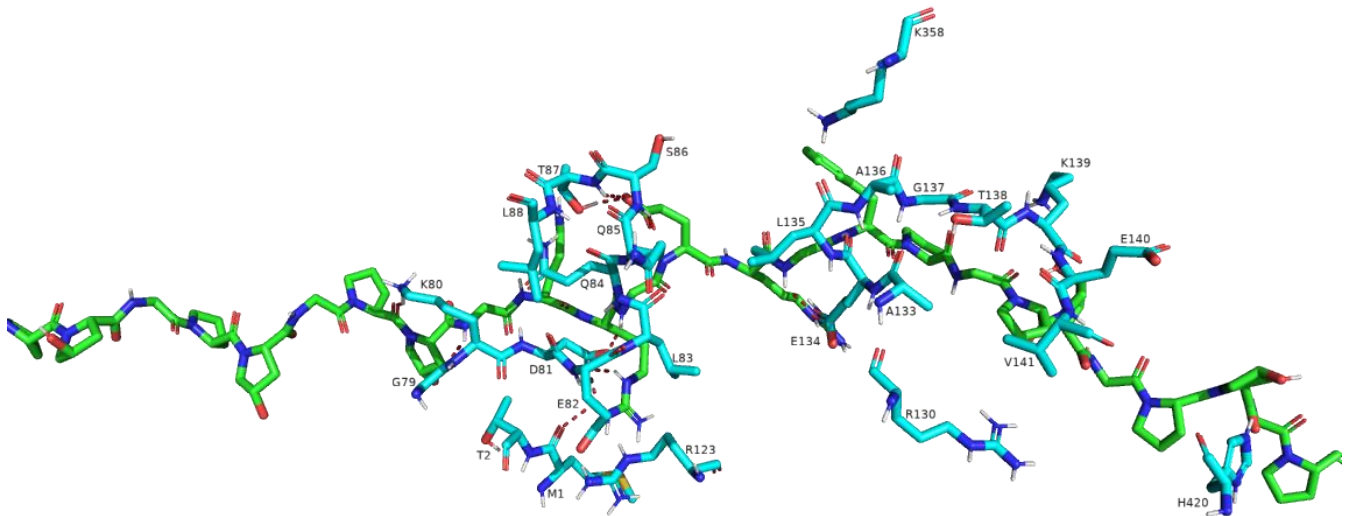


Ilustración 44: Imagen de los aminoácidos de la mutante $K_{124}A$ (azul) a 5 Å o menos de la cadena C de colágeno Humano (verde). Las líneas punteadas rojas representan las interacciones polares que se están llevando a cabo entre ambas proteínas.

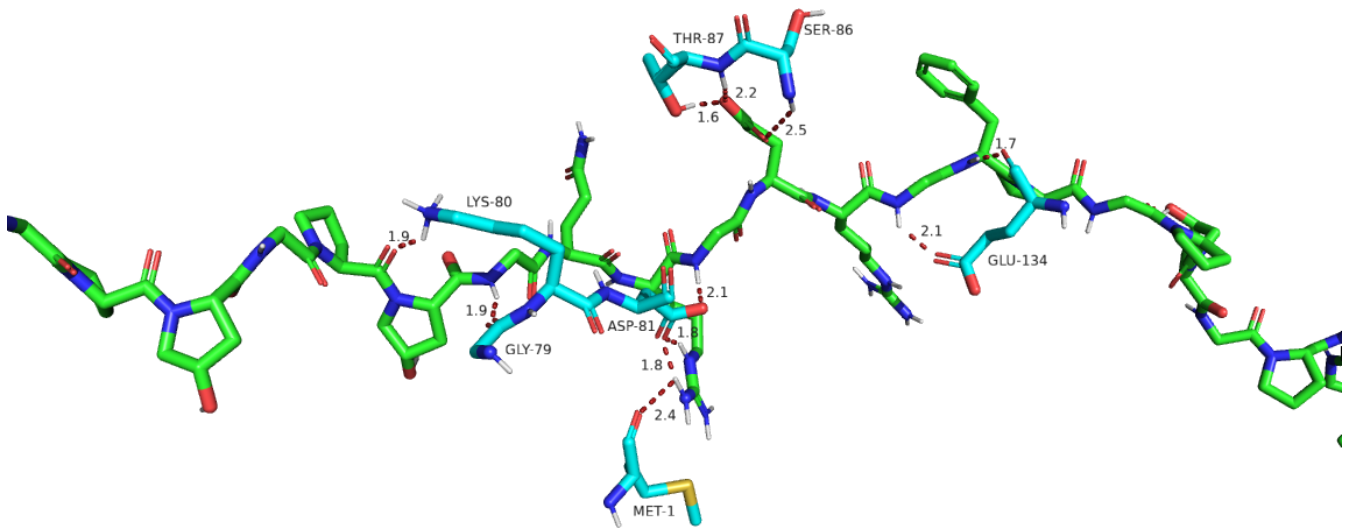


Ilustración 45: Imagen de los aminoácidos de la mutante $K_{124}A$ (azul) llevando a cabo interacciones polares con la cadena C de colágeno humano (verde). Las interacciones están representadas como líneas punteadas rojas y las distancias están medidas en Armstrongs

8.12 Docking de la mutante 8 (D₉₄A-K₁₂₄A)

Después de llevar a cabo los Docking de las 7 mutantes simples, se eligieron las 4 con las que mejores resultados se habían obtenido para crear las mutantes múltiples a partir de estas. Estas mutantes permitirán observar de forma más clara el efecto en la afinidad de la enolasa por el colágeno al mutar estos aminoácidos. La primera de estas mutante múltiples que se creó fue la D₉₄K₁₂₄, la cual se creó sustituyendo los residuos 94 y 124 (ácido aspártico y lisina) de la enolasa de *T. cruzi* por alaninas.

El modelo resultante del Docking entre esta mutante y la cadena C de colágeno humano se muestra a continuación.

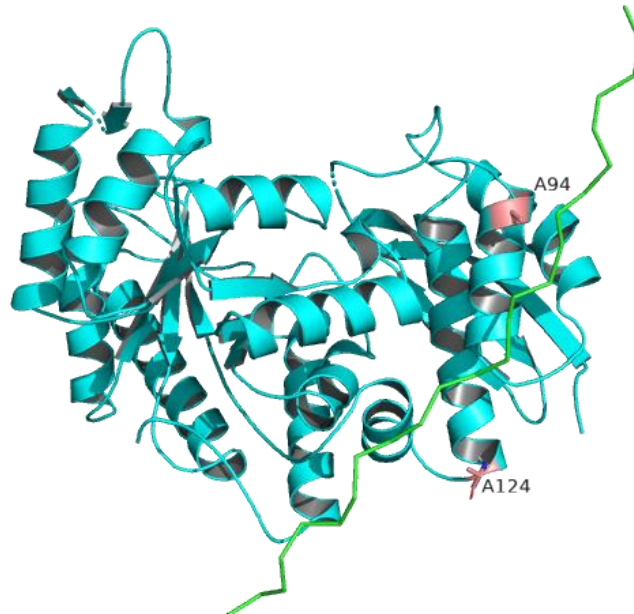


Ilustración 46: Modelo 3D del Docking entre la mutante $D_{94}A-K_{124}A$ (azul) creada a partir de la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno humano (verde). Los residuos mutados se muestran en color rosa.

- **Secuencia aminoacídica de la mutante 8 ($D_{94}A-K_{124}A$).** En la secuencia se muestra de forma resaltada el sitio de interacción de la enolasa y resaltados en color rojo, los residuos que han sido mutados.

MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHE
 ACELRDDDKRRYLGGKCLNAVKNVNDVL₇₃**APALVGKDELQQS**
TLDKLMRALDGTPN**SK**LGANILGCS**MAISKAAAARAGVPLY**
RYLAELAGTKE₁₄₀VRLPVPCFNVI**NGGKHAGNALPFQEFMIAPV**
 KAGSFNEALRMGAEVYHSLKSIKKKYGQDAVNVGDEGGFAPPI
 TDINEPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLT
 FKSPPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLEDPYDQDDFDGFA
 GITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTI
 TEAIEASKFCMSNGWSVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIK
 TGAPCRGERTAKLNQLLRIEEELGAHAKFGFPAWS

En seguida se enlistan los aminoácidos de la mutante que se encuentran dentro del rango de interacción con la cadena C de colágeno y los aminoácidos llevando a cabo interacciones polares con esta proteína.

Aminoácidos de la enolasa a 5 Å de la cadena C del colágeno 1

K₈₀ L₈₃ Q₈₄ S₈₆ T₈₇ L₈₈ K₉₀ L₉₁ A₉₄ L₉₅ A₁₃₃ E₁₃₄ L₁₃₅ A₁₃₆ G₁₃₇ T₁₃₈ K₁₃₉ E₁₄₀ T₃₅₁ E₃₅₅
K₃₅₈ H₄₂₀ K₄₂₂

Aminoácidos de la enolasa llevando a cabo contactos polares con la cadena C del colágeno1

Q₈₄ T₈₇ A₁₃₄ K₁₃₉ E₁₄₀ E₃₅₅

Cluster 5	Puntajes
HADDOCK score	-47.1
Tamaño del cluster	51
RMSD	3.1
Energía de Van der Waals	-43.1
Energía Electrostática	-187.4
Energía de solvatación	1.5

Tabla 11: Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 8 (*D₉₄K₁₂₄*) creada a partir de la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno Humano.

En las siguientes imágenes podemos observar los aminoácidos de la mutante que se encuentran lo suficientemente cerca de la cadena C de colágeno como para poder llevar a cabo algún tipo de interacción (5 Å) y además podemos observar los aminoácidos que están llevando a cabo interacciones polares.

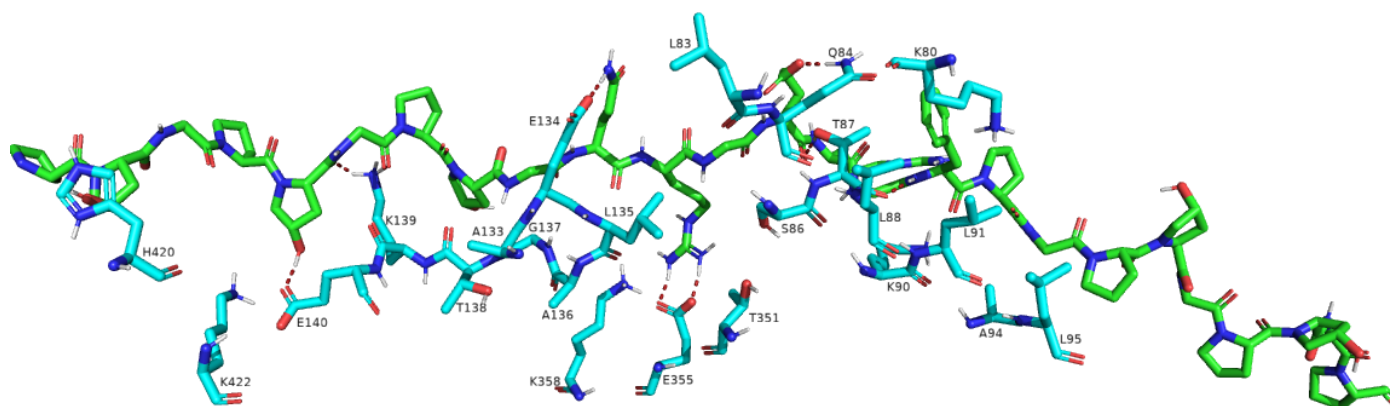


Ilustración 47: Imagen de los aminoácidos de la mutante *D₉₄A-K₁₂₄A* (azul) que se encuentran a una distancia de 5 Å o menor de la cadena C de colágeno Humano (verde). Las líneas rojas punteadas denotan las interacciones polares entre ambas proteínas.

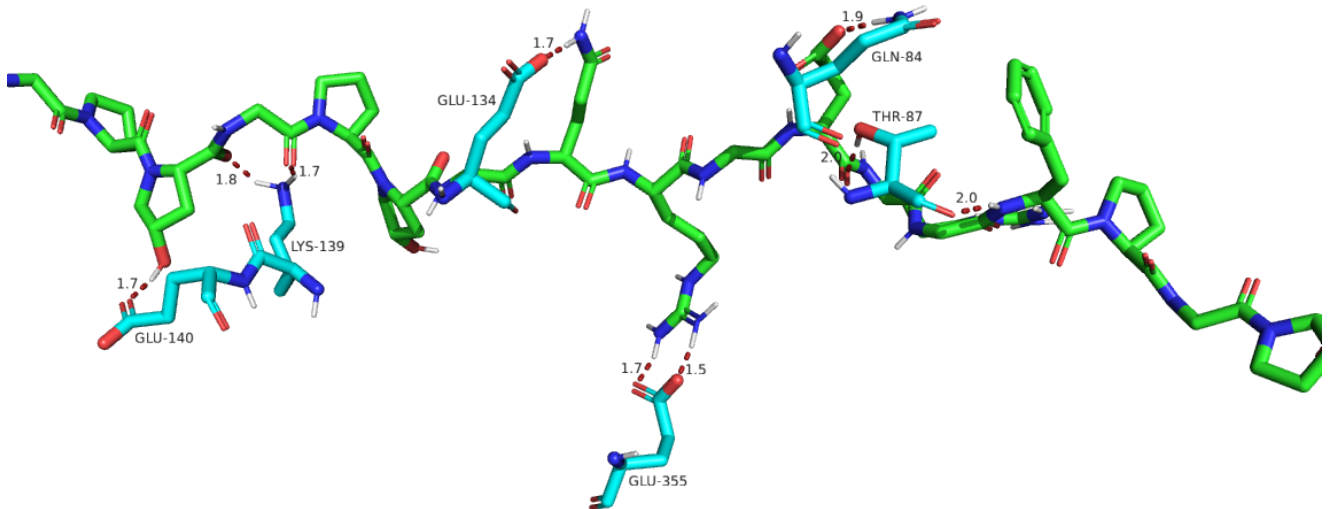


Ilustración 48: Imagen 3D de los aminoácidos de la mutante $D_{94}A-K_{124}A$ (azul) llevando a cabo interacciones de tipo polar con la cadena C de colágeno humano (verde). Las interacciones polares se marcan en la imagen como líneas rojas punteadas, y la distancia entre los aminoácidos llevando a cabo la interacción está medida en Armstrongs.

En la siguiente imagen se muestran las interacciones de tipo no polar que se están llevando a cabo entre esta mutante y el colágeno

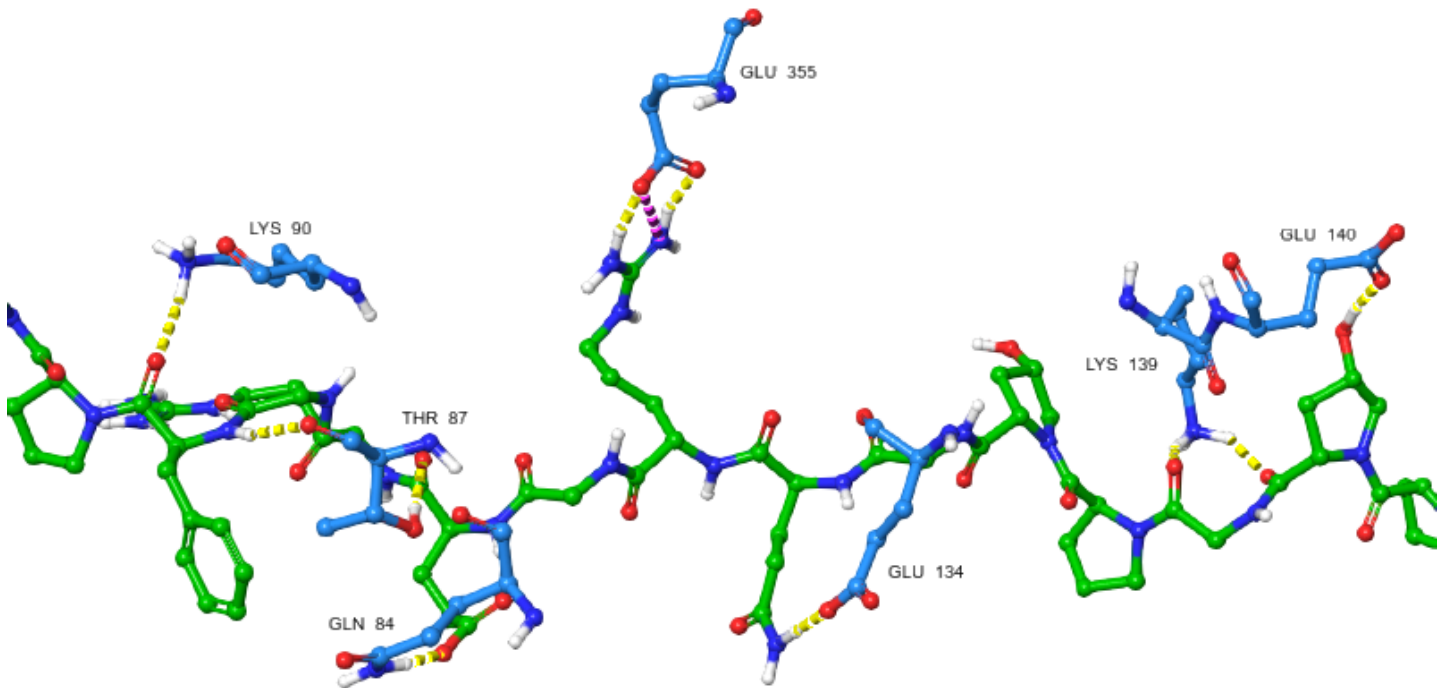


Ilustración 49: Imagen 3D que muestra las interacciones de tipo no polar que se están llevando a cabo entre los residuos de la mutante $D_{94}A-K_{124}A$ (azul) y la cadena C de colágeno humano (verde). Las líneas punteadas amarillas representan los puentes de hidrógeno, las líneas punteadas rosas representan puentes salinos.

Posteriormente se muestran diagramas 2D donde se puede observar de manera más clara las interacciones no polares que se están llevando a cabo entre ambas moléculas.

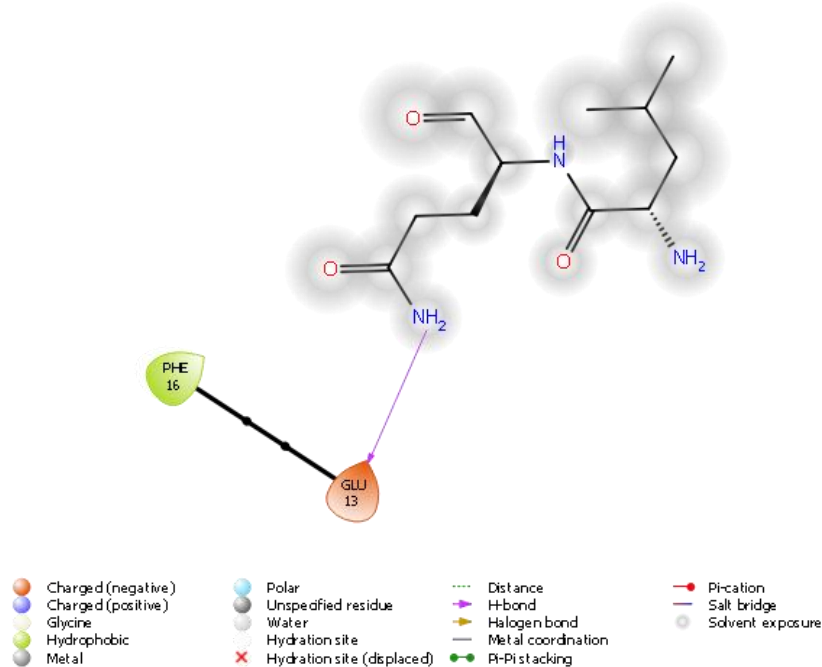


Ilustración 50: Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo Q₈₄ de la mutante D₉₄A-K₁₂₄A.

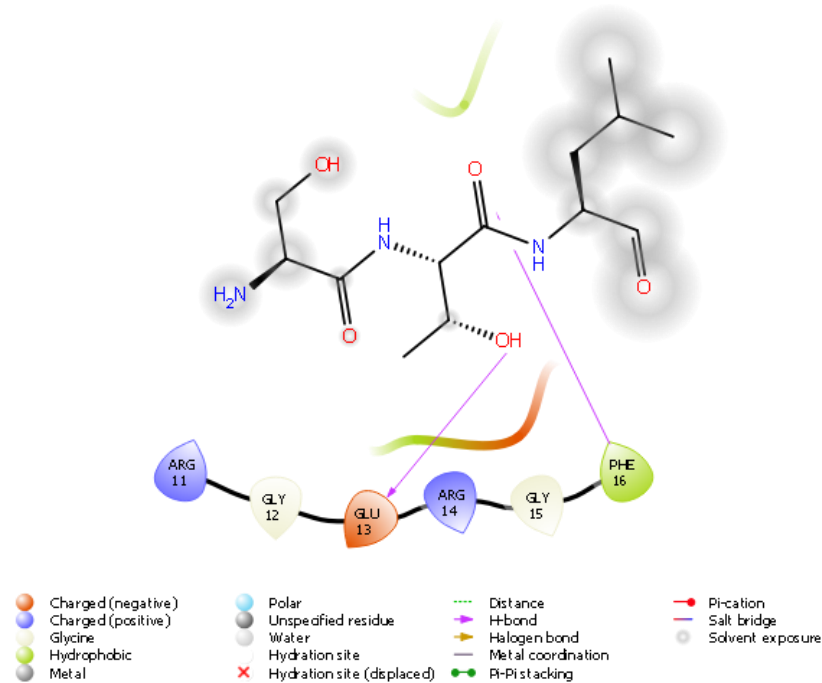


Ilustración 51: Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo T₈₇ de la mutante D₉₄A-K₁₂₄A.

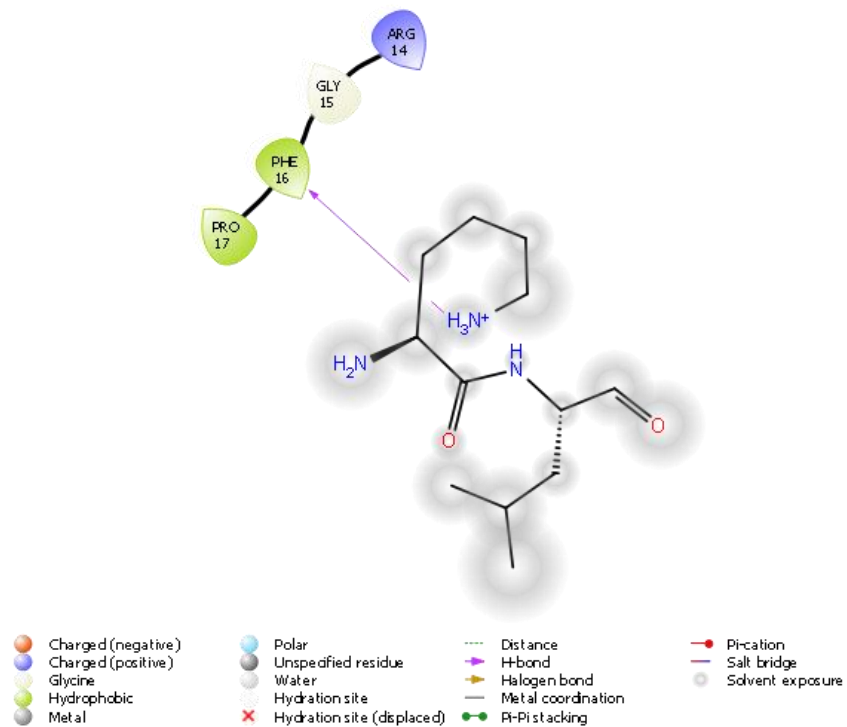


Ilustración 52: Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo K₉₀ de la mutante D₉₄A-K₁₂₄A.

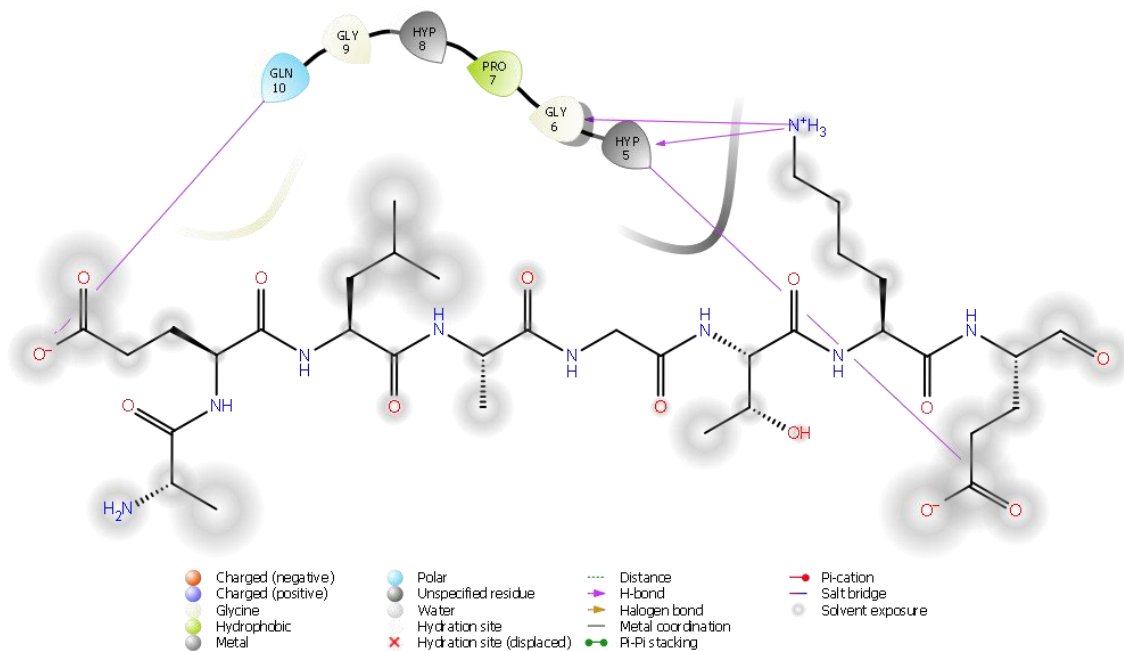


Ilustración 53: Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y los residuos E₁₃₄, K₁₃₉ y E₁₄₀ de la mutante D₉₄A-K₁₂₄A.

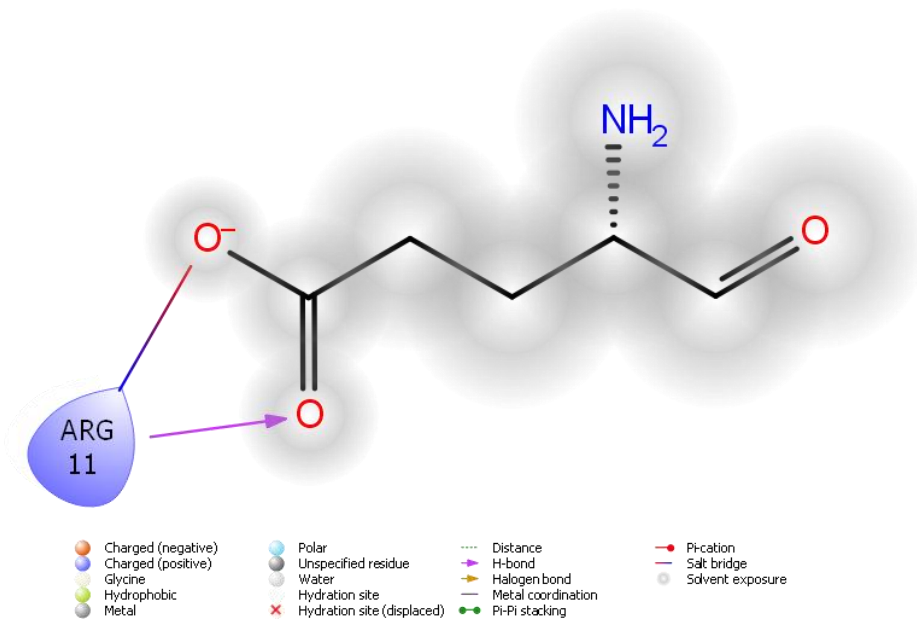


Ilustración 54: Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo E₃₅₅ de la mutante D_{94A}-K_{124A}.

8.13 Docking de la mutante 9 (D_{81A}-D_{94A}-K_{124A})

La siguiente mutante múltiple con la que se llevó a cabo un Docking fue la D_{81A}-D_{94A}-K_{124A}, la cual se creó a partir de la enolasa de *T. cruzi*, mutando 3 residuos aminoacídicos: el ácido aspártico en la posición 81, el ácido aspártico en la posición 94, y finalmente la lisina en la posición 124, cambiando todos ellos por alaninas. El modelo 3D resultante del Docking de la mutante con el colágeno se muestra a continuación.

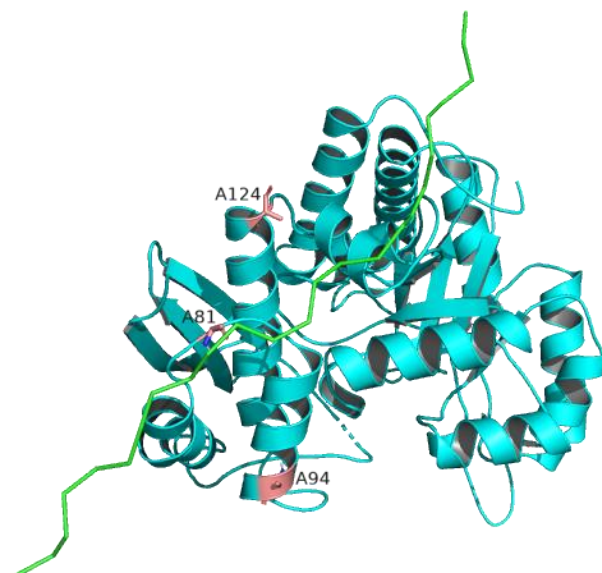


Ilustración 55: Modelo 3D del Docking entre la mutante D_{81A}-D_{94A}-K_{124A} (azul) y la cadena C de colágeno humano (verde). Los residuos mutados se ven en color rosa.

- **Secuencia aminoacídica de la mutante 9 (D₈₁A-D₉₄A-K₁₂₄A).** En la secuencia se muestra de forma resaltada el sitio de interacción de la enolasa y resaltados en color rojo, los residuos que han sido mutados.

MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHE
 ACELRDDDKRRYLGGKCLNAVKNVNDV**L₇₃APALVGK**A**E**L**Q**Q**S**
TLDKLMRA**LDGTPNK**S**KLGANILGCSMAISKAAAAR**A**GVPLY**
RYLAELAG**T**KE**K**₁₄₀VRLPVPCFNVINGGKHAGNALPFQEFMIAPV
 KAGSFNEALRMGAEVYHSLKSIKKKYGQDAVNVGDEGGFAPPI
 TDINEPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLT
 FKSPPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLEDPYDQDDFDGFA
 GITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTI
 TEAIEASKFCMSNGWSVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIK
 TGAPCRGERTAKLNQLLRIEEELGAHAKFGFPAWS

A continuación, se muestra una lista de los aminoácidos de la mutante que se encuentran a menos de 5 Å de distancia de la cadena C de colágeno y de los aminoácidos llevando a cabo interacciones polares.

Aminoácidos de la enolasa a 5 Å de la cadena C del colágeno 1

M₁ T₂ V₇₈ G₇₉ K₈₀ A₈₁ E₈₂ L₈₃ Q₈₄ Q₈₅ S₈₆ T₈₇ L₈₈ R₁₂₃ A₁₂₄ R₁₃₀ Y₁₃₁ A₁₃₃ E₁₃₄ L₁₃₅
 A₁₃₆ G₁₃₇ T₁₃₈ K₁₃₉ E₁₄₀ V₁₄₁ H₄₂₀

Aminoácidos de la enolasa llevando a cabo contactos polares con la cadena C del colágeno1

G₇₉ K₈₀ E₈₂ S₈₆ T₈₇ E₁₃₄ H₄₂₀

Cluster 5	Puntajes
HADDOCK score	-50.3
Tamaño del cluster	11
RMSD	6.9
Energía de Van der Waals	-35.3
Energía Electrostatica	-228.7
Energía de solvatación	2.0

Tabla 12: Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 9 (D₈₁A-D₉₄A-K₁₂₄A) creada a partir de la enolasa de T. cruzi y la cadena C de colágeno Humano.

En seguida se muestran las imágenes de los aminoácidos que se encuentran dentro de la zona de interacción con colágeno y los aminoácidos que están llevando a cabo interacciones polares.

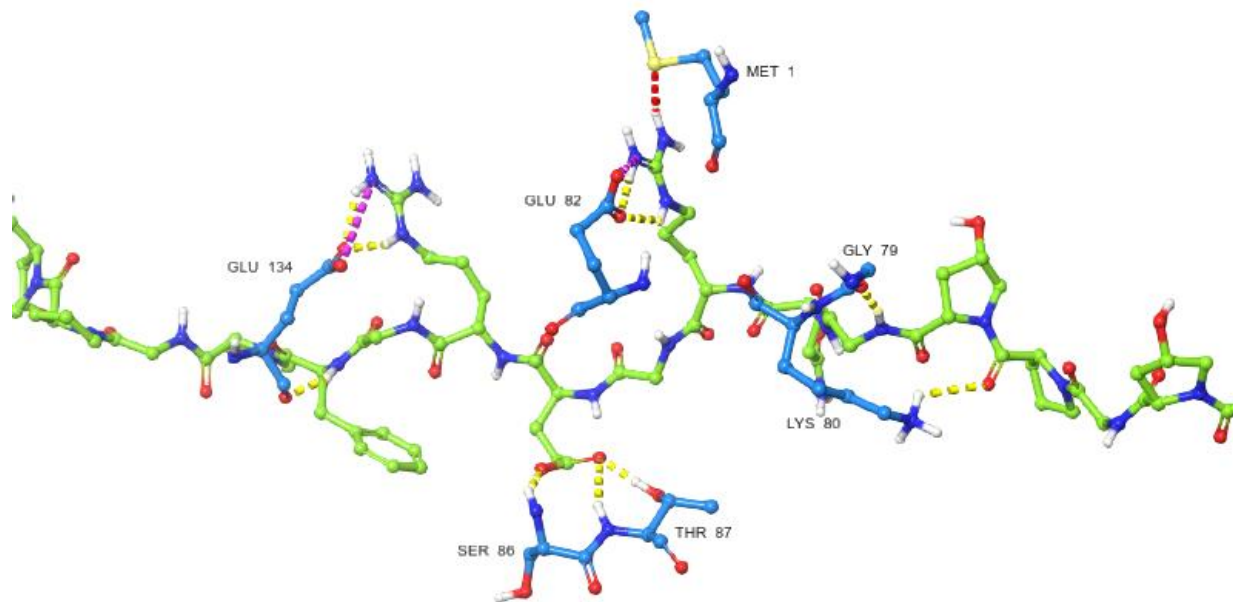


Ilustración 58: Imagen 3D de los residuos aminoacídicos de la mutante $D_{81}A-D_{94}A-K_{124}A$ (azul) llevando a cabo interacciones de tipo no polar con la cadena C de colágeno humano (verde). Las líneas amarillas representan los puentes de hidrógeno, las líneas rosas representan los puentes salinos y las líneas punteadas rojas señalan los impedimentos estéricos graves entre dos aminoácidos.

En seguida se muestran diagramas 2D de las interacciones no polares que se están llevando entre ambas proteínas para poder apreciarlas con mayor claridad.

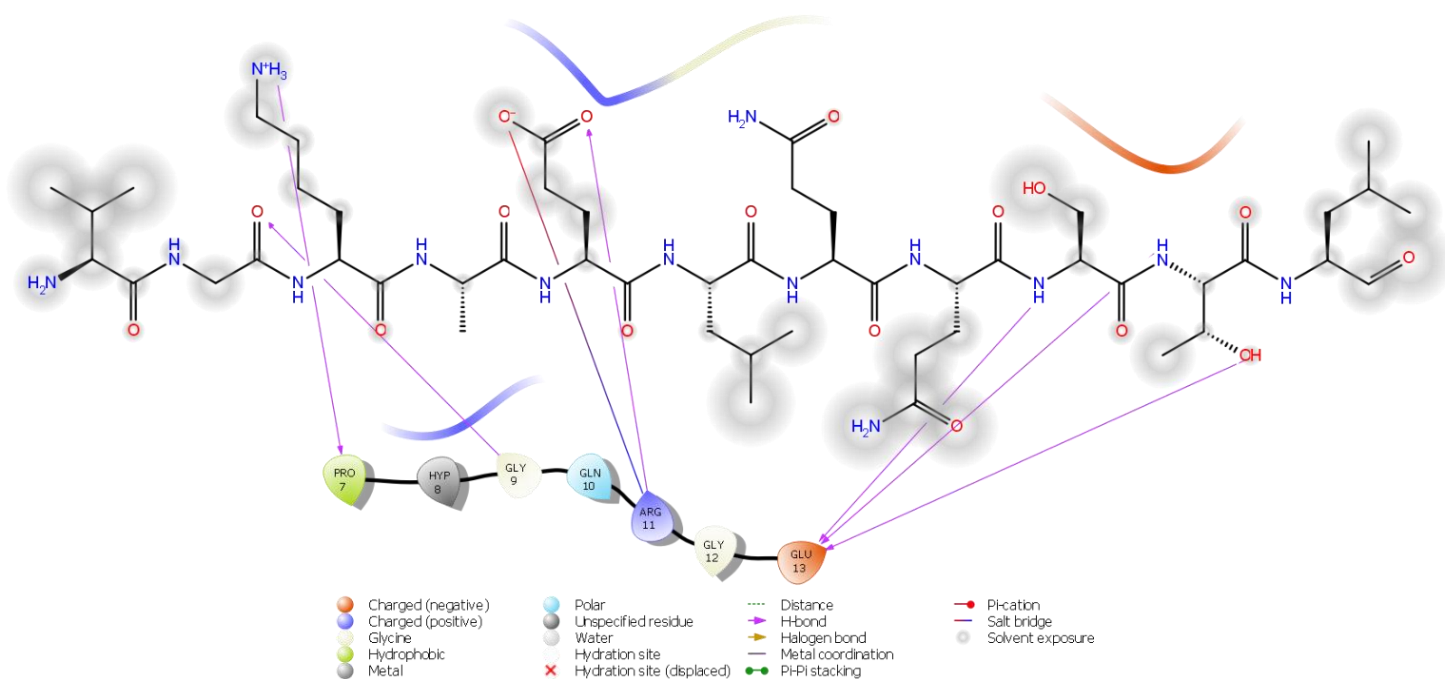


Ilustración 59: Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y los residuos G_{79} , K_{80} , E_{82} , S_{86} y T_{87} de la mutante $D_{81}A-D_{94}A-K_{124}A$

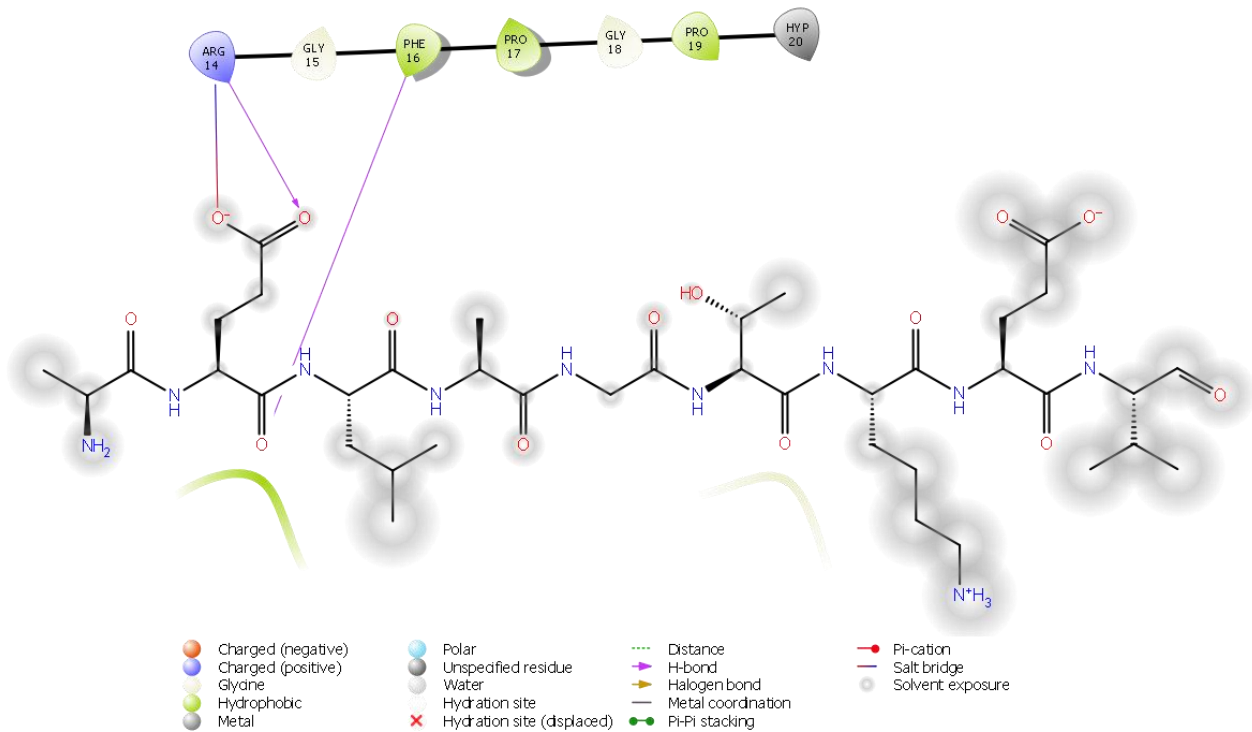


Ilustración 60: Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo E₁₃₄ de la mutante D₈₁A-D₉₄A-K₁₂₄A).

8.14 Docking de la mutante 10 (L₈₃A-D₉₄A-K₁₂₄A)

La última mutante con la que se llevó a cabo un Docking fue la L₈₃A-D₉₄A-K₁₂₄A que se creó a partir de la enolasa de *T. cruzi*, esta se creó mutando los residuos leucina 83, ácido aspártico 94 y lisina 124, los cuales se cambiaron por alaninas. El modelo resultante del Docking de la mutante con la cadena C de colágeno humano es el siguiente.

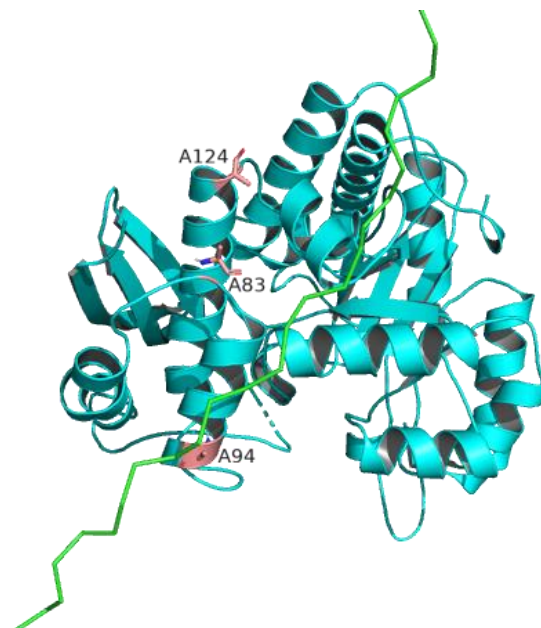


Ilustración 61: Modelo 3D del Docking entre la mutante L₈₃A-D₉₄A-K₁₂₄A (azul) creada a partir de la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno humano (verde). Los residuos mutados se muestran en color rosa.

- **Secuencia aminoacídica de la mutante 10 (L₈₃A-D₉₄A-K₁₂₄A).** En la secuencia se muestra de forma resaltada el sitio de interacción de la enolasa y resaltados en color rojo, los residuos que han sido mutados.

MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHE
 ACELRDDDKRRYLGGKCLNAVKNVNDV**L₇₃APALVGGKDEAQQS**
TLDKLMRALDGTPN**SKL**GAN**ILGCSMAISKAAAARAGVPLY**
RYLA**E**LAG**TKE₁₄₀**VRLPVPCFN**VINGGKHAGNALPFQEFMIAPV**
 KAGSFNEALRMGAEVYHSLKSIKKKYGQDAVNVGDEGGFAPPI
 TDINEPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLT
 FKSPPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLEDPYDQDDFDGFA
 GITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTI
 TEAIEASKFCMSNGWSVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIK
 TGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS

En seguida podemos ver una lista de los aminoácidos de la mutante de la enolasa a una distancia menor a 5 Å de la cadena C de colágeno, y una lista de los aminoácidos llevando a cabo interacciones polares.

Aminoácidos de la enolasa a 5 Å de la cadena C del colágeno 1

G₇₉ K₈₀ D₈₁ A₈₃ Q₈₄ Q₈₅ S₈₆ T₈₇ L₈₈ K₉₀ L₉₁ R₉₃ A₉₄ L₉₅ R₁₃₀ Y₁₃₁ A₁₃₃ E₁₃₄ L₁₃₅ A₁₃₆
 G₁₃₇ T₁₃₈ K₁₃₉ E₁₄₀ V₁₄₁ T₃₅₁ E₃₅₅ K₃₅₈

Aminoácidos de la enolasa llevando a cabo contactos polares con la cadena C del colágeno1

Q₈₄ T₈₇ K₉₀ R₉₃ L₁₃₅

Cluster 6	Puntajes
HADDOCK score	-47.5
Tamaño del cluster	8
RMSD	3.6
Energía de Van der Waals	-39.5
Energía Electrostatica	-189.7
Energía de solvatación	3.3

Tabla 13: Puntajes obtenidos del Docking entre la Mutante 10 (L₈₃A-D₉₄A-K₁₂₄A) creada a partir de la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno Humano.

Las siguientes imágenes muestran los aminoácidos de la mutante que se encuentran dentro del rango de los 5 Å de la cadena C de colágeno y los aminoácidos llevando a cabo interacciones polares.

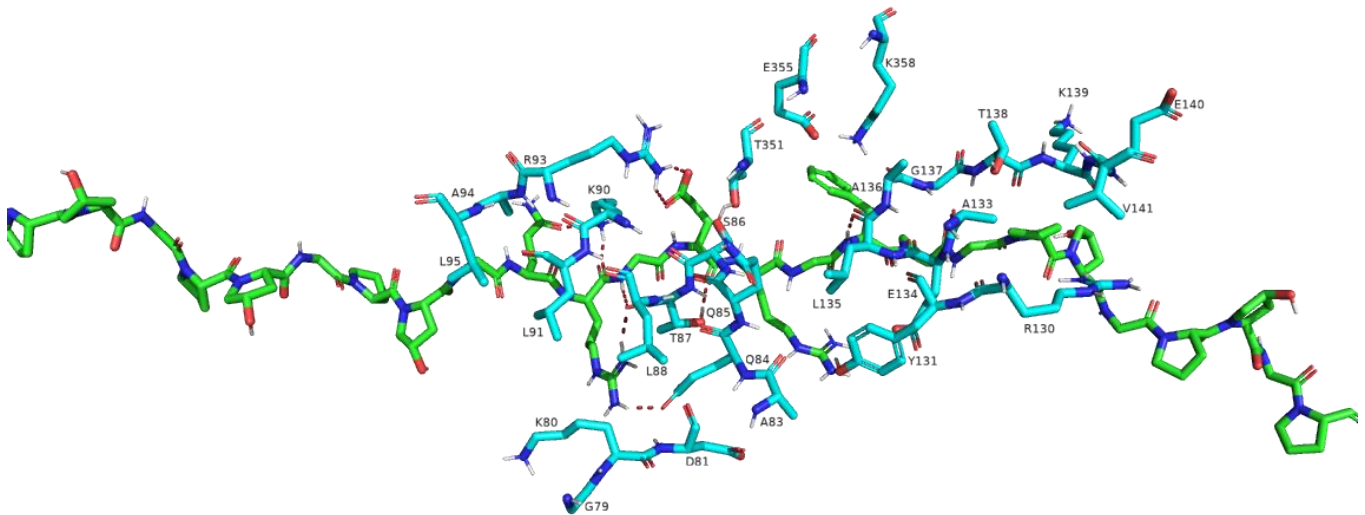


Ilustración 62: Imagen de los aminoácidos de la mutante $L_{83}A-D_{94}A-K_{124}A$ (azul) que se encuentran a 5 Å o menos de la cadena C de colágeno humano (verde). Las líneas rojas punteadas señalan donde se están llevando a cabo interacciones polares.

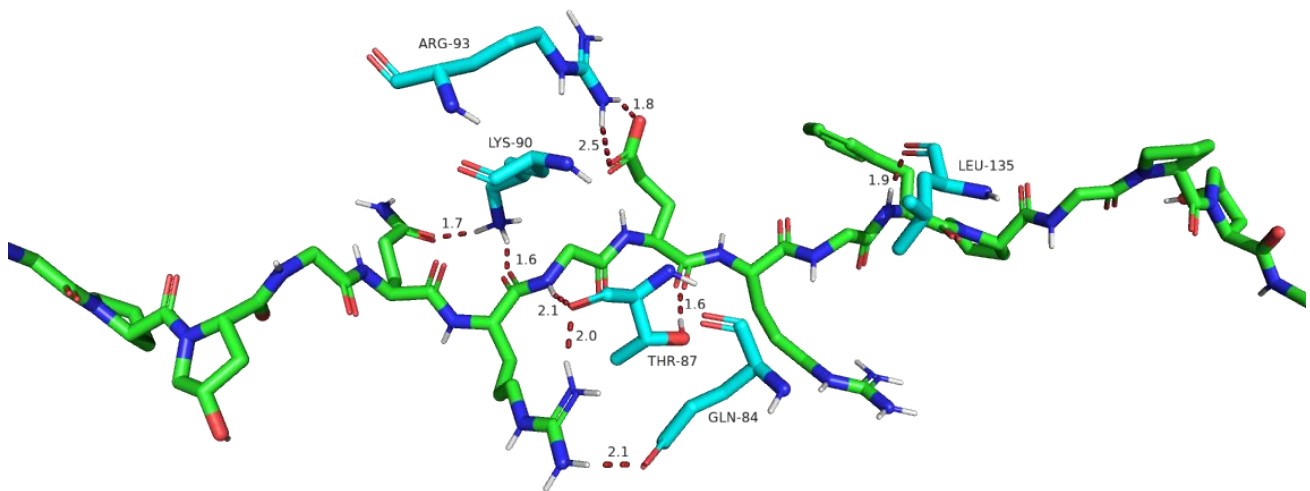


Ilustración 63: Imagen que muestra los aminoácidos de la mutante $L_{83}A-D_{94}A-K_{124}A$ (azul) llevando a cabo interacciones no polares con la cadena C de colágeno humano (verde). Las interacciones polares entre ambas moléculas están representadas como una línea roja punteada y las distancias entre los aminoácidos llevando a cabo la interacción están medidas en Armstrongs.

En la siguiente imagen se muestran los aminoácidos de la mutante llevando a cabo interacciones de tipo no polar con el colágeno humano.

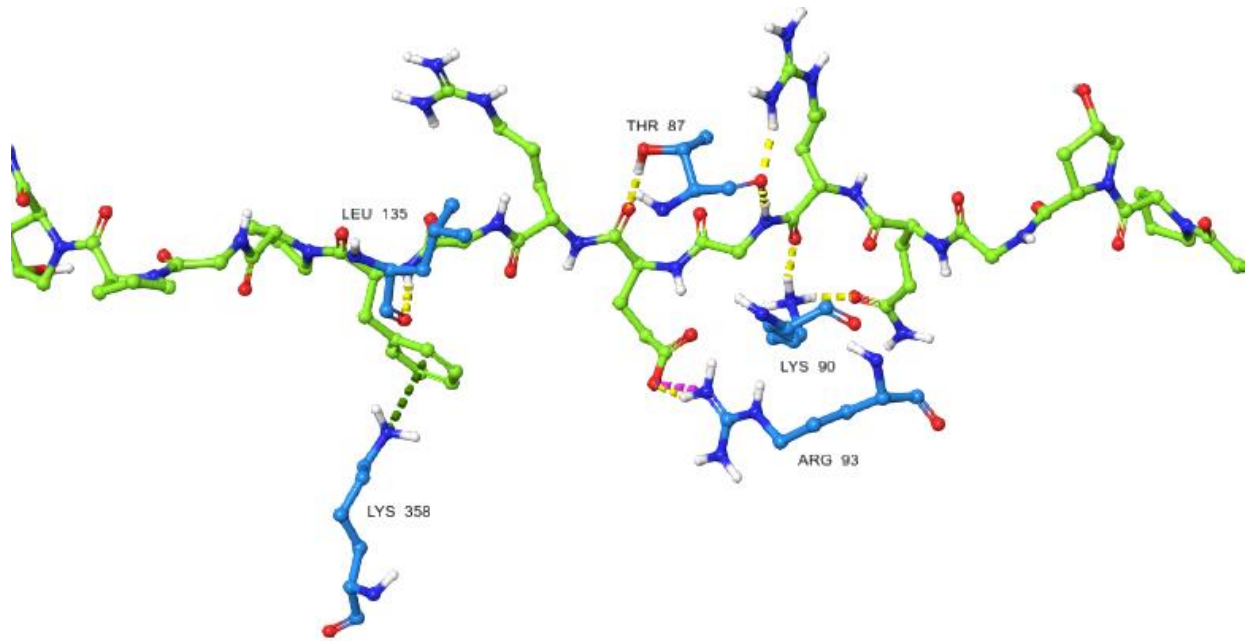


Ilustración 64: Imagen que muestra los aminoácidos de la mutante $L_{83}A-D_{94}A-K_{124}A$ (azul) llevando a cabo interacciones de tipo no polar con la cadena C de colágeno humano (verde). Las líneas punteadas verdes representan las interacciones de tipo catión pi, las líneas punteadas amarillas representan interacciones por puente de hidrógeno y las líneas rosas punteadas representan interacciones de tipo puente salino.

Finalmente, en las siguientes imágenes se puede observar con mayor precisión las interacciones de tipo no polar que la mutante está llevando a cabo con la cadena C de colágeno.

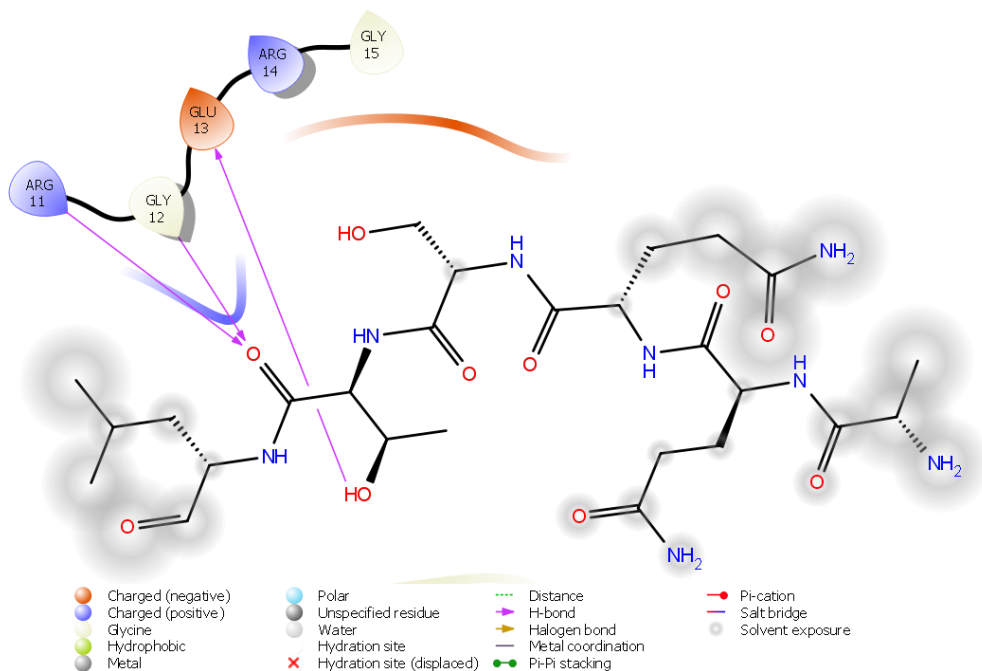


Ilustración 65: Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo T_{87} de la mutante $L_{83}A-D_{94}A-K_{124}A$

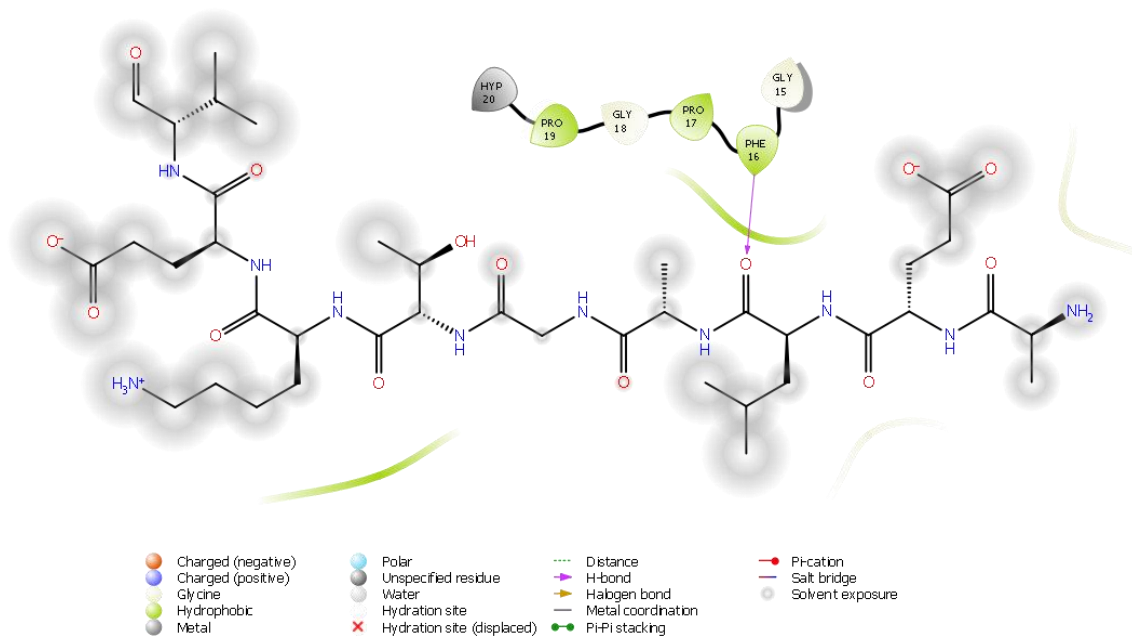


Ilustración 66: Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo K₉₀ de la mutante L₈₃A-D₉₄A-K₁₂₄A

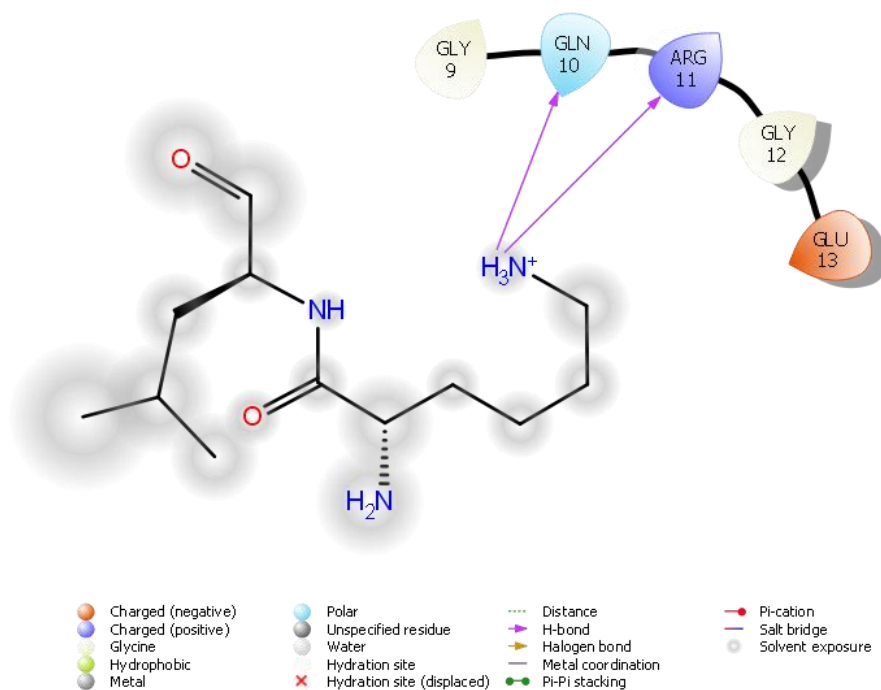


Ilustración 67: Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo L₁₃₅ de la mutante L₈₃A-D₉₄A-K₁₂₄A.

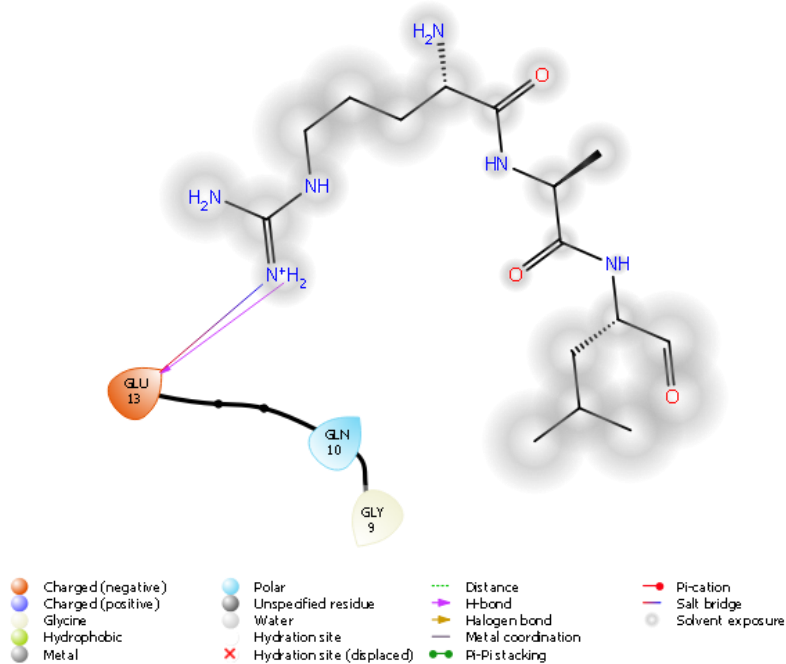


Ilustración 68: Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo R₉₃ de la mutante L₈₃A-D₉₄A-K₁₂₄A.

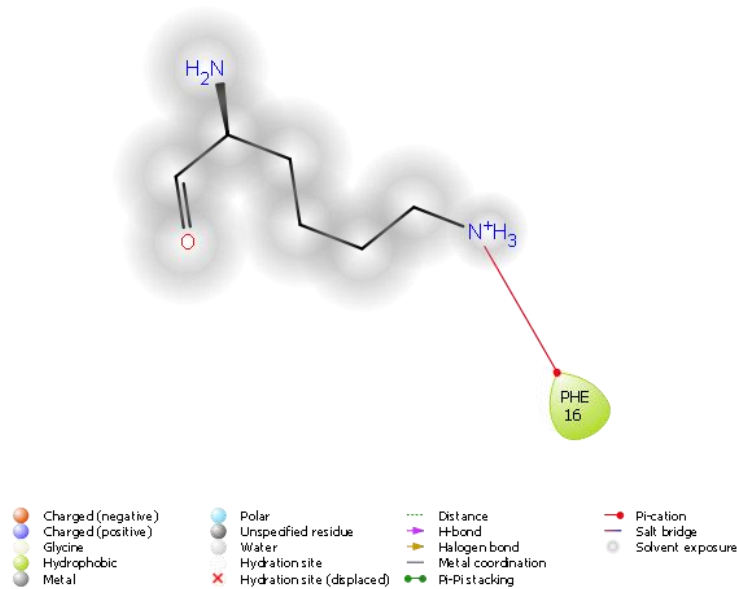


Ilustración 69: Diagrama 2D de las interacciones no polares entre la cadena C de colágeno humano y el residuo K₃₅₈ de la mutante L₈₃A-D₉₄A-K₁₂₄A

A continuación, podemos observar una tabla donde se resumen los resultados de todos los docking con la finalidad de comparar fácilmente los puntajes obtenidos entre los diversos docking llevados a cabo.

Mutación	Haddock Score	Cluster Size	RMSD	Energía de Van deer Waals	Energía Electrostática	Energía de desolvatación
Wild Type	-48.1	29	3.2	-38.5	-233.8	5.6
S86	-48.1	50	4.9	-44.3	-171.6	1.4
T87	-51	36	3	-34.4	-259.6	4.6
K90	-53.5	21	8.9	-48.5	-177.8	-4.4
L83	-46.0	37	2.5	-41.7	-207.6	4.8
D81	-45.0	10	2.0	-38	-230.9	4.1
D94	-46.7	23	9.7	-41.5	-206.3	4.9
K124	-44.7	12	0.9	-38.6	-229.9	5.8
D94K124	-47.1	51	3.1	-43.1	-187.4	1.5
D81D94K124	-50.3	11	6.9	35.3	-228.7	2.0
L83D94K124	-47.5	8	3.6	-39.5	-189.7	3.3

Tabla 14: Puntajes obtenidos de los múltiples docking entre las mutantes de la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno Humano. En color verde se muestran los puntajes obtenidos del Docking con la enolasa Wild type de *T. cruzi*. En color rojo se muestran las mutantes que se descartaron debido a su bajo impacto en la afinidad de la enolasa por el colágeno. En color naranja se muestran las mutantes que mostraron ser de importancia para la interacción de la enolasa con colágeno. En color azul se muestran los puntajes de los docking de las mutantes múltiples

9. Discusión

La enolasa de *T. cruzi* tiene un rol de suma importancia en el metabolismo y en los mecanismos de infección de este microorganismo, uno de estos mecanismos es la adherencia de este patógeno al colágeno humano por medio de la proteína enolasa. En estudios anteriores Salzillo et al., (16) demostraron que la enolasa de *L. plantarum* tiene la capacidad de unirse a proteínas colágenas y propusieron una región de unión entre ambas. Posteriormente Tapia, F (21) por medio de alineamiento de secuencias encontró que la enolasa de *T. cruzi* posee una región con una alta similitud a la que usa la enolasa de *L. plantarum* para unirse a colágeno, con una identidad del 68%, por lo que la enolasa de *T. cruzi* debería contar con la capacidad de unirse a colágeno.

Partiendo de esos resultados se llevó a cabo un Docking proteína-proteína entre las diferentes cadenas de colágeno humano y la enolasa de *T. cruzi* con la finalidad de

encontrar cuál de las 3 cadenas presentaba mayor afinidad con la enolasa de *T. cruzi*.

Lo primero que se notó al momento de hacer el Docking con las 3 diferentes cadenas de colágeno es que los scores obtenidos mediante el servidor de Haddock 2.4 (26, 27) eran similares para los 3, lo cual se puede observar en las tablas 1, 2 y 3. Esto fue un buen indicativo de que la precisión de los Docking era buena, ya que al compartir la misma secuencia las 3 cadenas de colágeno, era de esperar que los resultados fueran similares. Finalmente, la cadena de colágeno que se decidió elegir para llevar a cabo los Docking posteriores fue la cadena C; tomando en cuenta varios factores, el primero fue que el RMSD resultante del Docking entre la enolasa de *T. cruzi* y esta cadena de colágeno fue el más bajo de todos, lo que indica que existe una buena complementariedad entre ambas estructuras, lo que les permite acercarse más entre ellas y llevar a cabo un mayor rango de interacciones entre ambas, lo que hará la interacción más estable y duradera. El segundo factor a tomar en cuenta fue la energía electrostática de las interacciones entre ambas proteínas; que fue la más baja de los 3 Docking, esto es un muy buen indicativo de la estabilidad y la especificidad de la unión entre ambas proteínas, debido a que las interacciones electrostáticas son las que guían el posicionamiento en primera instancia, además de que son interacciones fuertes de largo alcance que favorecen la duración de la interacción entre ambas estructuras. El último factor a tomarse en cuenta al elegir esta cadena sobre las otras fue que esta presentó más interacciones de tipo polar con la enolasa de *T. cruzi*, como se puede observar en la ilustración 17. Se sabe que este tipo de interacciones son interacciones débiles de corto alcance, y el hecho de que se estén llevando a cabo una mayor cantidad de estas interacciones, significa que las dos se encuentran lo suficientemente cerca y con un posicionamiento ideal para que se den estas interacciones, lo cual concuerda con el bajo valor del RMSD obtenido en el Docking.

Una vez seleccionada esta cadena de colágeno se procedió a hacer un análisis de las interacciones no polares que se estaban llevando a cabo entre esta y la enolasa de *T. cruzi*. Al llevar a cabo este análisis se pudo observar que los puentes de

hidrógeno son el tipo de interacción no polar dominante entre ambas estructuras como se puede observar en la ilustración 18. De igual forma (en las imágenes 19 y 20) se pudo observar que se están llevando interacciones del tipo puente salino. Estas interacciones son de suma importancia debido a que son interacciones de muy alta energía, generalmente entre las 2 kcal/mol de acuerdo con la CMC (31), lo que le confiere una alta especificidad a la unión entre ambas proteínas y también una alta estabilidad a la interacción.

Una de las grandes desventajas de las interacciones de tipo puente de hidrógeno y puente salino, es que estas reciben una gran penalización de la energía de desolvatación. Esto se debe a que las moléculas que normalmente llevan a cabo este tipo de interacciones se encuentran solvatadas en el agua del medio donde se está llevando a cabo la interacción, y para poder empezar a interactuar y crear interacciones proteína-proteína, primero deben liberarse de las interacciones que están llevando a cabo con el agua circundante (32), para lo cual necesitan energía extra, lo que hace que la reacción no se de en forma tan espontánea como lo haría si se tratara de otro tipo de interacciones. Como se observa de forma clara en la tabla 3 donde se ve que la energía de desolvatación resultante del Docking entre la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno es bastante alta.

Una vez seleccionada la cadena C para llevar a cabo los Dockings con las mutantes de la enolasa de *T. cruzi*, se generaron 7 mutantes de la enolasa de *T. cruzi* mutando puntualmente los aminoácidos que estaban llevando a cabo interacciones polares y no polares con la cadena C de colágeno, por un residuo de alanina. Se decidió cambiar estos residuos por alanina debido a que es un aminoácido no polar y con un bajo impedimento estérico, lo que hace que su aporte a la energía de interacción sea casi nulo, permitiendo observar de forma más clara si la ausencia del aminoácido mutado tiene algún efecto en la afinidad de la enolasa por el colágeno. A partir de esto se hicieron Dockings de todas las mutantes creadas a partir de la enolasa de *T. cruzi* con la cadena C de colágeno y se fueron descartando aquellas mutaciones que no habían causado ningún efecto negativo significativo en la afinidad de la enolasa por el colágeno.

La primer mutante en descartarse fue la mutante 5 (K₉₀A) debido a que hubo un cambio drástico en la energía de solvatación del Docking, ya que como se puede observar en la tabla 14 la energía de solvatación pasó a ser de 5.6 con la enolasa wild type a -4.4 con la mutante, lo que indica que este residuo no está favoreciendo la interacción entre ambas proteínas. Además comparando los datos obtenidos por Tapia, F (21) se puede observar que en la enolasa de *L. plantarum*, *B. alsatica* y *B. bovis* el residuo aminoacídico 90 está ocupado por una glutamina, lo que indica que este es un residuo altamente conservado en otros organismos; que mutó en la enolasa de *T. cruzi* y que podría ser importante para la interacción entre el colágeno y la enolasa, ya que al cambiar el residuo K₉₀ por una alanina que es un aminoácido sin carga al igual que la glutamina, la energía de desolvatación se redujo drásticamente, haciendo que la reacción entre ambas proteínas pueda darse de forma espontánea. Con la finalidad de demostrar esto sería necesario llevar a cabo más pruebas y comprobar si el residuo Q₉₀ de la enolasa de *L. plantarum* juega un papel importante en la interacción de esta con colágeno.

La segunda mutante que decidió descartarse fue la mutante 2 (S₈₆A), ya que a pesar del aumento en el RMSD y la energía electrostática; la energía de solvatación se redujo de forma importante mutando solamente un aminoácido, al igual que con la mutante 5, además la energía de Van der Waals se redujo de forma notoria, y como se mencionó anteriormente, es un indicativo de que ambas proteínas están llevando a cabo una mayor cantidad de interacciones o de mejor calidad en la interface entre ambas proteínas. Finalmente, también se observó que el tamaño del clúster aumentó de forma significativa, ya que como se puede observar en la tabla 14 el tamaño del clúster pasó a ser de 50, a comparación del de la enolasa *wild type* que era de 29. Esto es importante ya que el tamaño del clúster generalmente se usa como indicativo de que una interacción no se está generando al azar, ya que si hay muchos aminoácidos aglomerándose en una sola región o en clúster debe ser porque hay energías como la electrostática o de desolvatación, que atraen a los aminoácidos a esa zona y no se encuentran ahí por casualidad (33).

En conjunto estos resultados nos llevan a pensar que este aminoácido (S₈₆) de la enolasa de *T. cruzi* podría estarse repeliendo con su par en la cadena de colágeno, y por eso al cambiarlo por un aminoácido no polar como la alanina se redujo la distancia entre ambas proteínas y por ende aumentó la cantidad de interacciones de van der Waals y el tamaño del clúster, lo que coincide con los resultados obtenidos al hacer el análisis con Pymol 2.5 (24); donde se observa que hay más aminoácidos de la mutante 3 (S₈₆) a 5 Å de distancia de la cadena C de colágeno; que es a la distancia donde normalmente se observan la mayoría de interacciones.

La última mutante que se decidió descartar fue la mutante 4 (T₈₇A), debido a que como se puede observar en la tabla 14, muchos de los puntajes obtenidos en su Docking con la cadena C de colágeno humano, mejoraron. En primer lugar, el tamaño del clúster aumentó a 36, el RMSD entre ambas proteínas se redujo y de igual forma la energía electrostática del complejo se redujo de forma notoria. Esto sugiere que aun que el impacto de este aminoácido en la afinidad de la enolasa de *T. cruzi* por la cadena C de colágeno no es tan grande como el de las otras 2 mutaciones, y no aporta mucho a la afinidad entre ambas proteínas.

De esta forma se consideraron 4 mutaciones que fueron las que más afectaron la afinidad de la enolasa por el colágeno.

La primera de ellas fue la mutante 1 (D₈₁A). Como se puede observar en la tabla 14, la mayoría de los puntajes obtenidos del Docking se vieron afectados de forma negativa, el tamaño del clúster disminuyó, los puntajes de la energía electrostática y de Van der Waals se hicieron menos negativos y la energía de desolvatación no se redujo de forma drástica como en las mutaciones 5 y 2, si no de forma proporcional a la desaparición de los puentes de hidrógeno y el puente salino que estaba llevando a cabo el aminoácido (Asp 81) en la enolasa *wild type* (imagen 18). En conjunto todos estos resultados muestran que este aminoácido (D₈₁) tiene un impacto importante en la afinidad de la enolasa por colágeno.

La segunda de las mutaciones elegidas para llevar a cabo las mutaciones múltiples fue la mutante 2 (L₈₃A). Esta mutación se eligió por dos razones principales, en primer lugar, como se puede observar en la tabla 14, la energía electrostática se vio

significativamente afectada de forma negativa, y la segunda razón fue que a pesar de haberse realizado el cambio del residuo L₈₃ por una alanina, esta seguía llevado a cabo interacciones polares con la cadena C de colágeno humano, lo que indica que esta posición dentro de la proteína juega un papel importante en la interacción con el colágeno.

La tercera mutación en ser elegida fue la de la mutante 6 (D₉₄A). Como se puede observar en la tabla 14, recibió un impacto negativo en casi todos los puntajes, principalmente en el RMSD el cual aumentó de forma drástica a 9.7 y el de la energía electrostática que pasó a ser de -206.3, lo que indica una menor fuerza de atracción electrostática entre ambas moléculas. Estos dos resultados sugieren que las interacciones que estaba llevando a cabo el residuo D₉₄ mantenía más cerca a ambas proteínas para que pudieran llevar a cabo otro tipo de interacciones que le brindaban más estabilidad y especificidad.

Por último, la mutante 7 (K₁₂₄A) igual demostró ser de suma importancia para la interacción entre la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno, debido a que como se observa en la tabla 14, la energía de solvatación aumentó con respecto a la de la enolasa wild type, a pesar de que se cambió un aminoácido con carga cuyas interacciones generalmente propician un aumento en la energía de solvatación, por un aminoácido sin carga cuyas interacciones no se ven afectadas por la energía de desolvatación. No solo esto, si no que el tamaño del clúster se redujo a más de la mitad y la energía electrostática entre ambas proteínas igual se vio afectada. Además con ayuda del análisis realizado con Pymol 2.5 (22) se puede observar que el cambio de este aminoácido desestabiliza de forma importante el sitio de interacción entre ambas proteínas, ya que como se puede observar en la imagen 43, hay varios aminoácidos de la mutante interactuando con la cadena C de colágeno, los cuales no se encuentran dentro del sitio de unión hallado de forma experimental, lo que podría llevar a una falta de especificidad en la formación del complejo entre ambas proteínas y por ende un mal funcionamiento de este. Con todo esto podemos decir que este aminoácido desempeña un papel importante en la formación de la interfaz de interacción entre ambas proteínas, ya que, sin él, la

probabilidad de que la interacción entre ambas proteínas se lleve a cabo de forma espontánea es menor, y además es necesario para atraer la cadena de colágeno lo suficientemente cerca como para que otros aminoácidos puedan interactuar con ella y estabilizar el complejo.

Partiendo de esta información se determinó que los aminoácidos que jugaban un papel más importante en la afinidad de la enolasa de *T. cruzi* con la cadena C de colágeno eran D₉₄ y K₁₂₄, por lo que se decidió usarlos como la base para las mutaciones múltiples, así que la primer mutante múltiple que se llevó a cabo fue la mutante 8 (D₉₄A-K₁₂₄A).

Al llevar a cabo el análisis de la mutante 8, podemos observar en la tabla 14, que la energía electrostática de la interacción entre ambas proteínas se vio fuertemente afectada pasando de tener un puntaje de -233.8 en el Docking con la enolasa *wild type* a -187.4 en el Docking de la mutante. Esta disminución en el puntaje de la energía electrostática se puede ver reflejada en la imagen 48, donde podemos observar que uno de los puentes salinos que se estaban llevado a cabo entre la enolasa de *T. cruzi* y el colágeno ya no está presente, y que además el otro puente salino que se está llevando a cabo entre ambas proteínas proviene de un aminoácido fuera de la zona de interacción hallada experimentalmente, lo que supone 2 cosas; la primera es que debido a que los puentes salinos son una de las interacciones más fuertes que hay, el hecho de que uno de ellos desapareciera supone una menor fuerza de interacción entre ambas moléculas, y la otra es que la especificidad y precisión de la unión de la enolasa con colágeno se vio afectada fuertemente.

Es importante mencionar que, aunque la energía de solvatación se redujo considerablemente, esto se explica debido a la desaparición de los puentes salinos y de las interacciones por puente de hidrógeno que estaban llevando a cabo los aminoácidos originales antes de ser mutados por una alanina, y no por que la interacción entre ambas proteínas sea más favorable *per se*. Además, al haber sustituido dos de estos aminoácidos con carga es entendible que la energía de solvatación disminuyera más que con la sustitución de uno solo de estos.

Finalmente se llevaron a cabo las mutaciones triples, con el fin de observar si el efecto sobre la afinidad de la enolasa por colágeno se veía mayormente afectado.

La primera de estas mutaciones en llevarse a cabo fue la mutante 9 (D₈₁A-D₉₄A-K₁₂₄A) y cómo podemos observar en la tabla 14 la gran mayoría de los puntajes se vio afectado de forma negativa. En primer lugar, el tamaño del clúster se redujo de forma significativa, pasando de tener un puntaje de 29 con la enolasa *wild type* a solo de 11 con esta mutante, en segundo lugar, el RMSD entre ambas proteínas aumentó de forma notoria pasando de ser de 3.2 en el Docking con la enolasa *wild type* a 6.9 con la mutante 9, lo que en conjunto indica que la complementariedad de una proteína por la otra se vio altamente afectada. De igual manera tanto la energía de Van der Waals como la energía electrostática se vieron afectadas de forma negativa con estas mutaciones, sugiriendo que la fuerza de atracción entre ambas proteínas se vio disminuida y por lo tanto la interacción es menos estable. Además, al momento de hacer el análisis del Docking con Pymol 2.5 (22) se puede observar que varios aminoácidos, fuera de la zona de interacción hallada experimentalmente, están llevando a cabo interacciones con la cadena de colágeno, lo que supone que la interacción no se está dando con la misma especificidad de un inicio. Y finalmente al hacer el análisis de la estructura del Docking con el software Maestro 13 (29) se puede observar algo sumamente importante, que el residuo de Met 1 de la mutante está llevando a cabo una colisión estérica con la cadena C de colágeno Humano, y de acuerdo con la CMC una colisión estérica puede causar la pérdida de toda afinidad debido a que a distancias tan cortas como para ocasionar la colisión entre dos aminoácidos, las fuerzas de repulsión entre los núcleos atómicos, es predominante (31).

La última de las mutaciones fue la mutante 10 (L₈₃A- D₉₄A-K₁₂₄A), cuyos puntajes como se puede observar en la tabla 14, fueron afectados de forma negativa en su gran mayoría. Lo primero que podemos observar es que el puntaje del tamaño del clúster se redujo de forma dramática, siendo este el puntaje de tamaño de clúster más bajo de todos los Docking, con un valor de 8, esto aunado al aumento del RMSD entre las 2 estructuras, indicando que la interfaz entre ambas proteínas se

vio bastante afectada por el cambio de estos aminoácidos, ya que la cantidad de aminoácidos interaccionando disminuyó y la distancia promedio que hay entre los átomos de ambas proteínas aumentó. Esto podría estarse viendo reflejado en la ilustración 61 donde se puede observar que la mutante 10 está llevando a cabo una menor cantidad de interacciones polares con colágeno que la enolasa *wild type*. Otro factor importante para tomar en cuenta es que la energía electrostática de la interacción de ambas proteínas también se vio afectada de forma notoria, pasando de tener un valor de -233.8 en el Docking con la enolasa *wild type* a uno de -189.7 en el Docking con la mutante, lo que podría indicar que la fuerza de interacción entre ambas proteínas disminuyó, haciendo que la estabilidad de la interacción se vea reducida y por ende la duración de la misma.

Esta disminución en las interacciones electrostáticas se puede explicar mediante lo que se ve en la ilustración 62, donde se puede observar que solo se está llevando a cabo 1 interacción de tipo puente salino en lugar de 2 como en la enolasa *wild type*.

Otra cosa que se observa en la ilustración 62 es que el residuo K₃₅₈ está llevando a cabo una interacción de tipo apilamiento Pi, con la cadena de colágeno, esto muestra que la precisión de la interacción de la enolasa con colágeno se vio afectada, además de que este tipo de interacción es mucho más débil que un puente salino, aunque no se ve penalizada por la energía de solvatación, lo que puede observarse en la tabla 14 al ver que la energía de desolvatación de esta mutante es menor que en la *wild type*.

Las enolasas además de ser enzimas clave en el metabolismo celular, se han llegado a encontrar en la superficie celular de organismos procariontes y eucariotes [17, 34], donde es usada especialmente por organismos patógenos, para potenciar su adhesión a los diferentes componentes de la matriz extracelular, lo que las lleva a incrementar su invasividad. Se ha demostrado que la enolasa de algunas bacterias patógenas como *Staphylococcus lugdunensis*, tiene una gran capacidad de adherirse a Colágeno 4 (34), uno de los principales componentes de la ECM. Es por esto que es importante entender de forma precisa el mecanismo de unión de la

enolasa de *T. cruzi* al colágeno humano, ya que la adhesión de estos organismos patógenos a las células es el primer paso para poder llevar a cabo una infección exitosa y entender este proceso, permitirá desarrollar nuevos tratamientos que ayuden a lidiar contra estas infecciones.

10. Conclusiones

- La mutación de ciertos residuos de la enolasa de *T. cruzi* demostró afectar la afinidad de esta por la cadena C de colágeno humano.
- Los residuos D₈₁, L₈₃, D₉₄ y K₁₂₄ mostraron tener un papel importante en la interacción de la enolasa de *T. cruzi* con la cadena C de colágeno humano.
- Los dos residuos aminoacídicos que mostraron tener un mayor impacto en la afinidad de la enolasa de *T. cruzi* por la cadena C de colágeno humano son: D₉₄ y K₁₂₄.
- La mutante que mostró mayor pérdida de afinidad por la cadena C de colágeno humano fue la mutante 9 (D₈₁A-D₉₄A-K₁₂₄A).
- Ya que la mayoría de las interacciones que se lleva a cabo entre la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno son de tipo electrostáticas o iónicas, la energía de desolvatación tiende a ser muy alta, lo que indica que es difícil que la interacción entre ambas proteínas se lleve a cabo de forma espontánea y que esta requiere de algún tipo de catalizador para poder llevarse a cabo.

11. Perspectivas

- Para comprobar que las variaciones en los puntajes obtenidos a través de los Docking de las diferentes mutantes son significativos y representan una pérdida de la afinidad significativa entre la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno humano, se podrían someter los datos a análisis estadísticos.
- Realizar ensayos *in silico* utilizando la molécula completa de colágeno al hacer los Docking con las mutantes de la TcENO.

- Elaborar mutantes múltiples con una mayor cantidad de residuos mutados (5-6) para poder observar efectos drásticos en la afinidad de la enolasa de *T. cruzi* y la cadena C de colágeno humano; como por ejemplo una completa falta de acoplamiento entre ambas proteínas.
- Llevar a cabo experimentos *in vitro*, donde por medio de ensayos de ELISA y Western Blot se pueda comprobar de forma experimental la pérdida de afinidad de las mutantes de la TcENO por la cadena C de colágeno humano.

12. Bibliografía

1. Nguyen, T. (2020, 10 agosto). *Chagas Disease - StatPearls - NCBI Bookshelf*. NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459272/?report=classic>
2. Control Disease Center. (s. f.). *CDC - Chagas Disease - Detailed FAQs*. CDC. Recuperado 15 de noviembre de 2020, de https://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/detailed.html
3. Avilán, L., Gualdrón-López, M., Quiñones, W., González-González, L., Hannaert, V., Michels, P. Á. M., & Concepción, J.-L. (2011). ENOlase: A Key Player in the Metabolism and a Probable Virulence Factor of Trypanosomatid Parasites— Perspectives for Its Use as a Therapeutic Target. *Enzyme Research*, 2011, 1-14. <https://doi.org/10.4061/2011/9325494>
4. World Health Organization. (2020, 11 marzo). *Chagas disease*. WHO. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)#:%7E:text=Chagas%20disease%2C%20also%20known%20as,parasite%20that%20causes%20Chagas%20disease.](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)#:%7E:text=Chagas%20disease%2C%20also%20known%20as,parasite%20that%20causes%20Chagas%20disease.)
5. Teixeira, A. R. L., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O., & Nitz, N. (2011). Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(3), 592-630. <https://doi.org/10.1128/cmr.00063-10>
6. Martins-Melo, F. R., Carneiro, M., Ribeiro, A. L. P., Bezerra, J. M. T., & Werneck, G. L. (2019). Burden of Chagas disease in Brazil, 1990–2016: findings from the Global Burden of Disease Study 2016. *International Journal for Parasitology*, 49(3-4), 301-310. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.008>
7. Schmunis, G. A., & Yadon, Z. E. (2010). Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, 115(1-2), 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003>
8. Pereira, A., & Mónica, P. (2003). Tripanosomosis. Enfermedad de Chagas y enfermedad del sueño. *Elsevier*, 22(2), 104-111. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-tripanosomosis-enfermedad-chagas-enfermedad-del-13043203>
9. Epting, C. L., Coates, B. M., & Engman, D. M. (2010). Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, 126(3), 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.023>
10. Kemmerling, U., Bosco, C., & Galanti, N. (2010). Infection and invasion mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas'

- disease: A proposal. *Biological Research*, 43(3). <https://doi.org/10.4067/s0716-97602010000300007>
11. Fernandes, M. C., & Andrews, N. W. (2012). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(3), 734–747. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x
 12. Ko-Jiunn, L., & Neng-Yao, S. (2007). The Role of ENOLase in Tissue Invasion and Metastasis of Pathogens and Tumor Cells. *Journal of Cancer Molecules*, 3(2), 45–48.
https://www.researchgate.net/publication/26529642_The_Role_of_ENOLase_in_Tissue_Invasion_and_Metastasis_of_Pathogens_and_Tumor_Cells
 13. Pancholi, V. (2001). Multifunctional α -enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(7), 902–920. <https://doi.org/10.1007/pl00000910>
 14. Terrier, B., Degand, N., Guilpain, P., Servettaz, A., Guillevin, L., & Mouthon, L. (2007). Alpha-enolase: A target of antibodies in infectious and autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 6(3), 176–182. doi: 10.1016/j.autrev.2006.10.004
 15. Díaz-Ramos, N., Roig-Borrellas, A., García-Melero, A., & López-Aleman, R. (2012). α -ENOLase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1–12.
<https://doi.org/10.1155/2012/156795>
 16. Salzillo, M., Vastano, V., Capri, U., Muscariello, L., Sacco, M., & Marasco, R. (2015). Identification and characterization of enolase as a collagen-binding protein in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Basic Microbiology*, 55(7), 890–897.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201400942>
 17. Antikainen, J., Kuparinen, V., Lähtenmäki, K., & Korhonen, T. K. (2007). ENOLases from Gram-positive bacterial pathogens and commensal lactobacilli share functional similarity in virulence-associated traits. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51(3), 526–534. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2007.00330.x>
 18. Principe, M., Borgoni, S., Cascione, M., Chattaragada, M. S., Ferri-Borgogno, S., Capello, M., Bulfamante, S., Chapelle, J., di Modugno, F., Defilippi, P., Nisticò, P., Cappello, P., Riganti, C., Leporatti, S., & Novelli, F. (2017b). Alpha-enolase (ENO1) controls α v/ β 3 integrin expression and regulates pancreatic cancer adhesion, invasion, and metastasis. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1).
<https://doi.org/10.1186/s13045-016-0385-8>
 19. Singh, B., Fleury, C., Jalalvand, F., & Riesbeck, K. (2012). Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(6), 1122–1180.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00340.x>
 20. Hsiao, K. C., Shih, N. Y., Fang, H. L., Huang, T. S., Kuo, C. C., Chu, P. Y., Hung, Y. M., Chou, S. W., Yang, Y. Y., Chang, G. C., & Liu, K. J. (2013). Surface α -ENOLase Promotes Extracellular Matrix Degradation and Tumor Metastasis and Represents a New Therapeutic Target. *PLoS ONE*, 8(7), e69354.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069354>
 21. Tapia, Hernández, F. J. (2020). *Análisis de la interacción de la enolasa recombinante de Trypanosoma cruzi con Plasminógeno y Proteínas Matriz Extracelular*. [Tesis de Licenciatura]. BUAP.

22. Craig, T. K., Edwards, T. E., Staker, B., & Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease. (2012). Crystal Structure of ENOLase from Trypanosoma Cruzi. PDB. <https://doi.org/10.2210/pdb4g7f/pdb>
23. Zhu, Y., Yang, X., & Sun, F. (2021). Structure of a triple-helix region of human collagen type I. PDB. <https://doi.org/10.2210/pdb7cwk/pdb>
24. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5 Schrödinger, LLC.
25. Rodrigues JPGLM, Teixeira JMC, Trellet M and Bonvin AMJJ. pdb-tools: a swiss army knife for molecular structures. F1000Research 2018, 7:1961 <https://doi.org/10.12688/f1000research.17456.1>
26. R.V. Honorato, P.I. Koukos, B. Jimenez-Garcia, A. Tsaregorodtsev, M. Verlato, A. Giachetti, A. Rosato and A.M.J.J. Bonvin (2021). "Structural biology in the clouds: The WeNMR-EOSC Ecosystem." Frontiers Mol. Biosci., 8, fmolb.2021.729513.
27. G.C.P van Zundert, J.P.G.L.M. Rodrigues, M. Trellet, C. Schmitz, P.L. Kastiris, E. Karaca, A.S.J. Melquiond, M. van Dijk, S.J. de Vries and A.M.J.J. Bonvin (2016). "The HADDOCK2.2 webserver: User-friendly integrative modeling of biomolecular complexes." J. Mol. Biol., 428, 720-725 (2015).
28. Xu, Y., Gurusiddappa, S., Rich, R. L., Owens, R. T., Keene, D. R., Mayne, R., Höök, A., & Höök, M. (2000). Multiple Binding Sites in Collagen Type I for the Integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$. Journal of Biological Chemistry, 275(50), 38981–38989. <https://doi.org/10.1074/jbc.m007668200>
29. Schrödinger Release 2021-4: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
30. Bonvin, A., Trellet, M., Torchala, M., & Honorato, R. V. (2018). Haddock tools [This is a collection of scripts useful for pre- and post-processing and analysis for HADDOCK runs]. Haddock. <https://github.com/haddock/haddock-tools>
31. Swain, C. (2020, 4 agosto). *Molecular Interactions*. Cambridge MedChem Consulting. Recuperado 15 de enero de 2022, de https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/molecular_interactions.html
32. Swain, C. (2015, 13 mayo). Solvation and desolvation | Cambridge MedChem Consulting. Cambridge MedChem Consulting. Recuperado 15 de enero de 2022, de <https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/solvation.html>
33. Kozakov, D., Clodfelter, K. H., Vajda, S., & Camacho, C. J. (2005). Optimal Clustering for Detecting Near-Native Conformations in Protein Docking. Biophysical Journal, 89(2), 867–875. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.058768>.
34. Hussain, M., Kohler, C., & Becker, K. (2022). Enolase of Staphylococcus lugdunensis Is a Surface-Exposed Moonlighting Protein That Binds to Extracellular Matrix and the Plasminogen/Plasmin System. Frontiers in Microbiology, 13, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.837297>