

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **NAD<sup>+</sup> in extracellular parasites: Biosynthetic and transport processes.**

**Leidy Constanza Villalobos González**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2021

# **El NAD<sup>+</sup> en parásitos extracelulares: Procesos biosintéticos y de transporte**

**Leidy Constanza Villalobos González**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título  
de:

**Magister en Ciencias - Bioquímica**

Director (a):

Dr. Rer. Nat. María Helena Ramírez Hernández

Metabolismo energético de parásitos protozoarios  
Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica - LIBBIQ

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2021

*La vida de cada hombre es un camino hacia  
sí mismo, el ensayo de un camino, el boceto  
de un sendero.*

*Hermann*

*Hess*





# Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, mi alma mater que me permitió continuar con mi desarrollo profesional a nivel de posgrado y al Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica, el cual me brindó sus saberes a nivel académico, profesional y personal.

A la Universidad Nacional por la financiación del proyecto “Estudio del metabolismo del NAD en parásitos protozoos: consolidando resultados en busca de aplicaciones” código 48547

A la profesora María Helena Ramirez Hernández por sus enseñanzas, sabiduría y compromiso a lo largo de esta aventura, quien me ha permitido ver la ciencia y la vida con otros ojos. Al profesor Luis Ernesto Contreras por sus enseñanzas y consejos a lo largo de este trabajo. De manera muy especial a mi familia del LIBBIQ: Melisa, Sharon, Esteban, Diana, Laura, Luisa, Bryan, William y Miguel, han sido una parte fundamental en este proceso de formación académica y personal.

A mi madre y mi padrino quienes han sido mi apoyo, mi polo a tierra y me han permitido llegar a esta etapa. A mi padre, aunque no estes conmigo, sigues siendo el motor de mi vida. Finalmente, a mis hermanos de vida Javier y Ana, quienes han sido mis confidentes, apoyo y parte esencial de mi vida.

## Resumen

El Dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD<sup>+</sup>/NADH) es una de las principales coenzimas en numerosos procesos de óxido-reducción celular, la cual se encuentra adicionalmente involucrada en la reparación del ADN, señalización celular, apoptosis, entre otras. La formación del NAD<sup>+</sup> se da a partir del Mononucleótido de Nicotinamida (NMN) o el Mononucleótido del Ácido Nicotínico (NaMN) y Adenosín trifosfato (ATP); mediante la actividad catalítica de la Nicotinamida Mononucleótido Adenililtransferasa (NMNAT E.C. 2.7.7.1), presente en las dos rutas de biosíntesis del dinucleótido (Ruta *de novo* y de salvamento) [1][2].

Los parásitos protozoarios son causantes de enfermedades de alta incidencia en la salud pública, afectando a millones de personas por año. Actualmente algunas de estas enfermedades carecen de tratamientos efectivos, por lo cual es necesario identificar blancos terapéuticos para el control de estas [3]. La búsqueda de blancos farmacológicos se plantea a partir de un conocimiento racional de la biología molecular del parásito. En el laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica (LIBBIQ) se ha estudiado el metabolismo del NAD<sup>+</sup> en parásitos intracelulares principalmente. El estudio de este proceso en parásitos extracelulares permitirá entender las relaciones parásito-hospedero y establecer los elementos relevantes de esta interacción [4]–[6].

En trabajos previos se ha encontrado una relación entre el número de enzimas de la familia NMNAT y la forma de vida parasitaria, caracterizada por la disminución de estas enzimas en organismos intracelulares con respecto a extracelulares. Por tanto, se realizó una aproximación experimental a la síntesis del NAD<sup>+</sup> en parásitos extracelulares empleando como modelo *Trichomonas vaginalis*, para ello se implementaron estrategias de clonación y expresión de proteínas recombinantes, evaluando la actividad enzimática de dos isoenzimas generadoras de NAD<sup>+</sup>. Con lo cual, se identificaron dos NMNATs en *T. vaginalis*, siendo esta la primera aproximación al metabolismo del NAD<sup>+</sup> de este

dinucleótido de este parasito. Igualmente, se empleó una aproximación bioinformática en la búsqueda de candidatos a transportadores del NAD<sup>+</sup> en parásitos extracelulares, con el propósito de establecer la relación síntesis/movilización del NAD<sup>+</sup> en estos organismos.

**Palabras clave: NAD<sup>+</sup>, parásitos extracelulares, NMNAT, Transportadores**



## Abstract

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup> / NADH) is one of the main coenzymes in numerous cell oxidation-reduction processes, which is additionally involved in DNA repair, cell signaling, apoptosis, among others. The formation of NAD<sup>+</sup> occurs from nicotinamide mononucleotide (NMN) or nicotinic acid (NAMN) and adenosine triphosphate (ATP); through the catalytic activity of the Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase (NMNAT E.C. 2.7.7.1), present in the two dinucleotide biosynthesis pathways (de novo and salvage pathways) [1][2].

Protozoan parasites are the cause of diseases with a high incidence in public health, affecting millions of people per year. Currently some of these diseases lack effective treatments, which is why it is necessary to identify therapeutic targets to control them. [3]. The search for pharmacological targets arises from a rational knowledge of the molecular biology of the parasite. In the Laboratory of Basic Research in Biochemistry (LIBBIQ) the metabolism of NAD<sup>+</sup> has been studied mainly in intracellular parasites. The study of this process in extracellular parasites will make it possible to understand the parasite-host relationships and establish the relevant elements of this interaction. [4]–[6].

In previous works, a relationship has been found between the number of enzymes of the NMNAT family and the parasitic way of life, characterized by the decrease of these enzymes in intracellular organisms with respect to extracellular ones. Therefore, an experimental approach to the synthesis of NAD<sup>+</sup> in extracellular parasites was carried out using *Trichomonas vaginalis* as a model, for this, cloning and expression strategies of recombinant proteins were implemented, evaluating the enzymatic activity of two NAD<sup>+</sup> generating isoenzymes. Thus, two NMNATs were identified in *T. vaginalis*, this being the first approach to the metabolism of NAD<sup>+</sup> of this dinucleotide of this parasite. Likewise, a bioinformatic approach was used in the search for candidates for NAD<sup>+</sup> transporters in

extracellular parasites, to establish the synthesis / mobilization relationship of NAD + in these organisms.

**Keywords: NAD<sup>+</sup>, extracellular parasites, NMNAT, Transporters**

# Contenido

	Pág.
1. Marco Teórico.....	19
1.1 Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina NAD <sup>+</sup> /NADH .....	19
1.1.1 Biosíntesis del NAD <sup>+</sup> .....	20
1.1.1.1 Ruta <i>de novo</i> .....	5
1.1.1.2 Ruta Preiss-Handler.....	5
1.1.1.3 Ruta de salvamento.....	6
1.1.2 Nicotinato/Nicotinamida Mononucleotido Adenililtransferasa (NMNAT).....	2
2	
1.1.3 Transportadores de NAD <sup>+</sup> .....	23
1.2 Protozoos.....	23
1.2.1 Protozoos parasitarios .....	23
1.2.1.1 Parásitos Intracelulares.....	23
1.2.1.2 Parásitos Extracelulares .....	24
1.2.1.1.1 <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	24
2. Antecedentes.....	25
3. Justificación .....	27
4. Objetivos.....	29
4.1 Objetivo General.....	29
4.2 Objetivos Específicos .....	29
5. Metodología .....	31
5.1 Aproximación bioinformática - experimental de NMNATs de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	31
5.1.1 Aproximación bioinformática .....	31
5.1.1.1 Análisis de estructura primaria de las TvNMNAT .....	31
5.1.2 Aproximación experimental .....	32
5.1.2.1 Estandarización de las condiciones de amplificación .....	32
5.1.2.2 Clonación del Vector Recombinante <i>pGEM-T/tvnmnat</i> y <i>pET SUMO/tvnmnat</i> .....	34
5.1.2.3 Preparación de células químicamente competentes.....	35
5.1.2.4 Purificación de Plásmidos Recombinantes.....	36
5.1.2.5 Verificación del Plásmido Recombinante.....	36
5.1.2.6 Transformación en cepa de expresión con el plásmido recombinante .....	37
5.1.2.7 Expresión de la proteína recombinante 6xHisTvNMNAT.....	37
5.1.2.8 Determinación de la solubilidad de las proteínas recombinantes 6xHisTvNMNAT.....	21
5.1.2.9 Inmunodetección de la proteína recombinante 6xHisTvNMNAT.....	21
5.1.2.10 Purificación de la proteína recombinante 6xHisTvNMNAT.....	22

5.1.2.11 Caracterización enzimática de la proteína recombinante 6xHisTvNMNAT.....	22
5.1.2.11.1 Ensayos enzimáticos acoplados .....	39
5.1.2.11.2 Ensayos enzimáticos directos.....	40
5.1.2.12 Producción de anticuerpos policlonales $\alpha$ -6xHis-SUMO-TvNMNAT-IgY en el modelo aviar.....	24
5.1.2.12.1 Obtención de anticuerpos policlonales presentes en suero. ....	42
5.1.2.12.2 Purificación de anticuerpos IgY presentes en sangría y yema de huevo.....	42
5.1.2.12.3 Evaluación y caracterización de anticuerpos policlonales $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT-IgY mediante ELISA indirecto.....	43
5.2 Análisis bioinformático de transportadores de la familia MCF en parásitos protozoarios extracelulares.....	45
5.2.1 Búsqueda de proteínas transportadoras y alineamientos .....	45
5.2.1.1 Búsqueda y análisis de los candidatos.....	46
5.2.1.2 Predicción y acoplamiento molecular de los candidatos a proteínas transportadoras de la familia MCF - Ndt .....	46
6. Resultados y discusión .....	47
6.1 Aproximación experimental de las NMNATs de <i>Trichomonas vaginalis</i> ....	47
6.1.1 Aproximación bioinformática .....	47
6.1.1.1 Análisis de la estructura primaria de los candidatos TvNMNAT .....	47
6.1.1.2 Análisis de la estructura secundaria y terciaria de los candidatos TvNMNAT .....	52
6.1.1.3 Acoplamiento molecular (Docking) de las TvNMNAT con sus sustratos.....	55
6.1.2 Aproximación experimental.....	58
6.1.2.1 Construcción del vector recombinante pGEMT- <i>tvnmnat</i> .....	58
6.1.2.2 Estimación <i>in silico</i> de la solubilidad de TvNMNAT .....	59
6.1.2.3 Construcción del vector recombinante pET-SUMO- <i>tvnmnat</i> .....	60
6.1.2.4 Expresión de las proteínas recombinantes 6xHis-SUMO-TvNMNATs .....	62
6.1.2.4 Purificación de las proteínas recombinantes 6xHis-SUMO-TvNMNAT .....	64
6.1.2.5 Caracterización enzimática de 6xHis-SUMO-TvNMNAT.....	71
6.1.2.6 Análisis de la estructura cuaternaria de las enzimas recombinantes 6xHis-SUMO-TvNMNAT .....	75
6.1.2.5 Producción de herramientas inmunológicas en el modelo aviar.....	81
6.2 Búsqueda de candidatos a proteínas transportadoras de NAD <sup>+</sup> en parásitos extracelulares empleando herramientas computacionales.....	89
6.2.1 Alineamientos múltiples de transportadores de NAD <sup>+</sup> de la familia MCF-Ndt. ....	89
6.2.2 Búsqueda y análisis a candidatos a transportadores de NAD <sup>+</sup> - Ndt.....	92
7. Conclusiones .....	104
7.1 Perspectivas.....	105

## Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Estructuras del NAD <sup>+</sup> y NADH. El NAD <sup>+</sup> es usado como coenzima y sustrato en diferentes procesos celulares [8].....	19
Figura 1-2. Biosíntesis del NAD <sup>+</sup> . .....	21
Figura 1-3. Rol principal de la NMNAT en la biosíntesis del NAD <sup>+</sup> . .....	22
Figura 5-1. Perfil térmico de PCR utilizado en la amplificación de las secuencias codificantes.. .....	33
Figura 5-2. Mapa de los vectores recombinantes construidos pGEM-T- <i>tvnmnat</i> y pET SUMO- <i>tvnmnat</i> .....	35
Figura 5-3. Ensayo enzimático acoplado con ADH. Generado en Biorender.....	40
Figura 5-4. Ensayo enzimático directo. Generado en Biorender. ....	41
Figura 6-1. Alineamiento múltiple de los candidatos a TvNMNAT y sus ortólogos humanos.. .....	49
Figura 6-2. Histograma de frecuencia de aminoácidos de TvNMNAT. ....	50
Figura 6-3. Predicción de posibles sitios de modificaciones postraduccionales de los candidatos a TvNMNAT.. .....	51
Figura 6-4. Modelamiento de los candidatos a TvNMNAT identificando los motivos de unión a ATP. ....	53
Figura 6-5. Superposición de los candidatos TvNMNAT con la isoforma HsNMNAT2 (PBD:1nup) .....	54
Figura 6-6. Acoplamiento molecular entre las proteínas TvNMNAT con los sustratos ATP, NMN y NaNM.....	56
Figura 6-7. Clonación de las secuencias candidato <i>tvnmnat1</i> y <i>tvnmnat2</i> en el vector pGEM T-Easy. ....	58
Figura 6-8. Clonación de las secuencias candidato <i>tvnmnat1</i> y <i>tvnmnat2</i> en el vector pET-SUMO.....	60
Figura 6-9. Tiempos de expresión de 6xHis-SUMO-TvNMNATs.....	63
Figura 6-10. Fraccionamiento celular de 6xHis-SUMO-TvNMNATs. 64	
Figura 6-11. Purificación de las proteínas recombinantes 6xHis-SUMO-TvNMNAT mediante IMAC. ....	65
Figura 6-12. Optimización de la purificación de las proteínas recombinantes 6xHis-SUMO-TvNMNAT . .....	66
Figura 6-13. Ensayo de actividad acoplado de las proteínas 6xHis-SUMO-TvNMNAT. ....	68

Figura 6-14. Confirmación de la actividad de las enzimas 6xHis-SUMO-TvNMNAT mediante ensayos directos por HPLC.....	69
Figura 6-15. Detección de NMNATs de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	70
Figura 6-16. Condiciones de almacenamiento de las proteínas 6xHis-SUMO-TvNMNAT. ....	72
Figura 6-17. Condiciones óptimas de actividad enzimática para las enzimas 6xHis-SUMO-TvNMNAT.....	73
Figura 6-18. Determinación de los parámetros cinéticos de la proteína 6xHis-SUMO-TvNMNAT.....	75
Figura 6-19. Movilidad electroforética de proteínas patrón y 6xHis-SUMO-TvNMNAT mediante geles PAGE.....	76
Figura 6-20. Determinación de los coeficientes de retardo (Kr) de los patrones proteicos según su migración relativa.....	77
Figura 6-21. Gráfico de Ferguson de los patrones proteicos.....	78
Figura 6-22. Identificación de coeficientes de retardo (Kr) para las bandas de las proteínas 6xHis-SUMO-TvNMNAT analizadas por PAGE.....	80
Figura 6-23. Caracterización de anticuerpos policlonales $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT-IgY. ....	82
Figura 6-24. Purificación de IgYs a partir de yema de huevo.....	84
Figura 6-25. Evaluación de $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT-IgY de yema de huevo. A).....	85
Figura 6-26. Evaluación de reconocimiento de las 6xHis-SUMO-TvNMNAT usando $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT-IgY. Inmunodetección, membrana de nitrocelulosa $\alpha$ -chicken fosfatasa alcalina 1:10000.....	87
Figura 6-27. Evaluación de reconocimiento cruzado de proteínas recombinantes TvNMNAT.....	88
Figura 6-28. Clasificación taxonómica del reino Protozoa.....	90
Figura 6-29. Alineamiento múltiple de transportadores de NAD <sup>+</sup> reportados.....	91
Figura 6-30. Alineamiento múltiple de los candidatos a transportadores de NAD <sup>+</sup> - Ndt. ....	96

## Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1 Concentraciones de NAD <sup>+</sup> /NADH en diferentes tipos celulares.[10] .....	20
Tabla 5-1. Características de los primers utilizados para la amplificación de TvNMNAT1 (Magenta) y TvNMNAT2 (Azul).....	33
Tabla 5-2. Esquema de inmunización de gallinas para la generación de anticuerpos policlonales IgY contra la proteína recombinante 6xHis-TvNMNAT. ....	42
Tabla 5-3. Controles empleados en ELISA indirecto de la titulación de los IgY contra TvNMNAT extraídos de yema. ....	44
Tabla 6-1. Características <i>In silico</i> de los candidatos TvNMNAT.....	48
Tabla 6-2. Predicción de la localización subcelular de los candidatos a TvNMNAT.. .....	50
Tabla 6-3. Predicción de función molecular de TvNMNAT. ....	54
Tabla 6-4. Puntuaciones de acoplamiento predichas e interacciones de sustratos con las TvNMNAT.....	57
Tabla 6-5. Predicción <i>in silico</i> de la solubilidad de las proteínas recombinantes TvNMNAT usando los programas SCRATCH, Protein-Sol y Soluprot.....	59
Tabla 6-6. Rendimiento de purificación de las proteínas recombinantes 6xHis-SUMO-TvNMNAT.. .....	67
Tabla 6-7. Parámetros cinéticos para las enzimas 6xHis-SUMO-TvNMNAT. Realizado .....	74
Tabla 6-8. Migración relativa (Rf) de los patrones proteicos usados en geles PAGE. ....	77
Tabla 6-9. Coeficientes de retardo (Kr) de los patrones moleculares usados en geles PAGE.....	78
Tabla 6-10. Determinación de los estados de oligomerización de las proteínas recombinantes 6xHis-SUMO-TvNMNAT usando el grafico de Ferguson. ....	81
Tabla 6-11. Predicción de epitopes de TvNMNAT1 y TvNMNAT2 por BepiPred 2.0. 87	87
Tabla 6-12. Transportadores MCF – Ndt reportados usados en los alineamientos múltiples.. .....	90
Tabla 6-13. Parásitos extracelulares con genoma disponible en la base de datos NCBI. Taxid: Base de datos taxonómica del organismo con genoma disponible..	92
Tabla 6-14. Candidatos a transportadores de NAD <sup>+</sup> (Familia MCF-Ndt). I. ....	93
Tabla 6-15. Características de los candidatos a transportadores de NAD <sup>+</sup> - Ndt.....	94
Tabla 6-16. Análisis de los candidatos a transportadores de NAD <sup>+</sup> Ndt de la familia MCF. ....	98





# Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Termino
6xHis	Etiqueta de polihistinas
aa	Aminoácidos
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico) sal de diamonio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albumina de suero bovino
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EtOH	Etanol
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Agua desionizada
IgY	Inmunoglobulinas Y
IMAC	Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilo Dalton
Kr	Coeficiente de retardo
LB	Medio Luria Bertani
MCF	Familia de transportadores mitocondriales

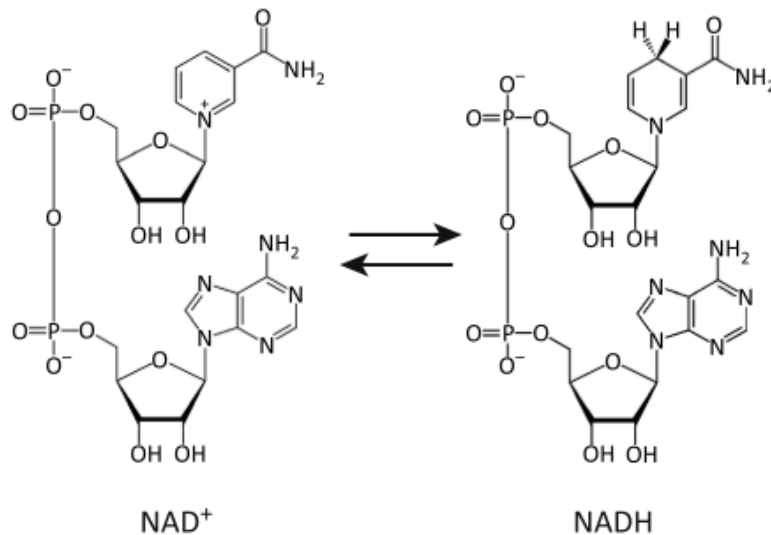
MW	Peso molecular
NaAD	Dinucleótido del ácido nicotínico
NAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NaMN	Mononucleótido del ácido nicotínico
NMN	Mononucleótido de nicotinamida
NMNAT	Nicotinato / Nicotinamida mononucleótido adeniltransferasa
OD	Densidad óptica
PAGE	Geles nativos de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
RMSD	Raíz de la desviación cuadrática media
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SUMO	Proteína similar a la ubiquitina
TBE	Buffer Tris-Borato-EDTA
TBS-T	Buffer de solución salina – Tris – Tween20
<i>T. vaginalis</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
WB	Western blot

# 1. Marco Teórico

## 1.1 Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina NAD<sup>+</sup>/NADH

El dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD<sup>+</sup>/NADH) es una de las biomoléculas más importantes en la célula, debido a que es requerida en más de 500 reacciones enzimáticas siendo clave para el metabolismo celular [7]. El NAD<sup>+</sup> está conformado por el nucleótido de nicotinamida y el nucleótido de adenina unido por un enlace fosfoanhidro (Figura 1-1). Es utilizado como coenzima de transferencia de iones hidruros por múltiples oxidoreductasas y es el sustrato utilizado por sirtuinas, poli ADP ribosa polimerasas (ADPr), mono ADPr transferasas y ADPr ciclasa/sintasas, asociadas con procesos de reparación del ADN, transporte de calcio, resistencia al estrés, señalización endocrina, envejecimiento celular en algunos organismos, entre otras [8].

**Figura 1-1.** Estructuras del NAD<sup>+</sup> y NADH. El NAD<sup>+</sup> es usado como coenzima y sustrato en diferentes procesos celulares [8].



En la célula, el equilibrio NAD<sup>+</sup> /NADH es importante debido a los múltiples procesos en los que se encuentra involucrada esta coenzima, razón por la que la concentración de NAD<sup>+</sup> y NADH varía dependiendo del tipo de célula (Tabla 1-1). A razón de lo anterior, para mantener las concentraciones de este cofactor se han identificado diferentes rutas de biosíntesis y transporte del dinucleótido, las cuales determinan los niveles de NAD<sup>+</sup> /NADH intracelular y con ello el funcionamiento de la célula[9][10].

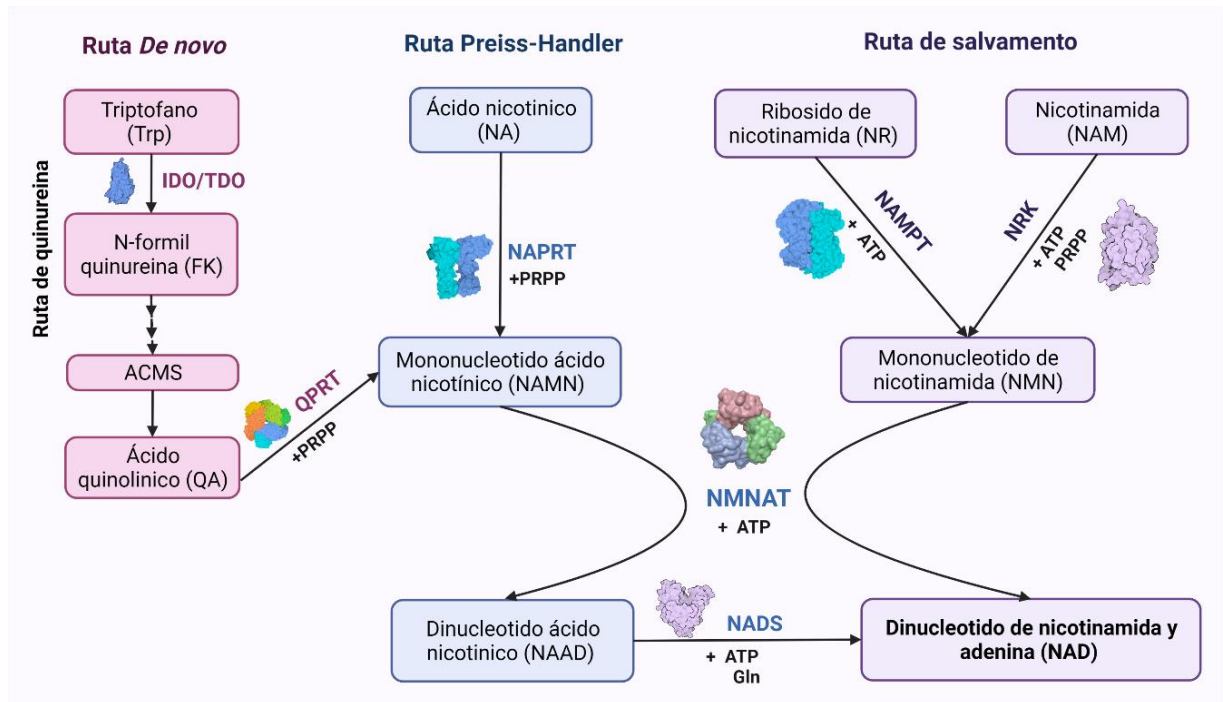
**Tabla 1-1** Concentraciones de NAD<sup>+</sup>/NADH en diferentes tipos celulares.[10]

	<b>NAD<sup>+</sup></b>	<b>NADH</b>
Células HEK-293 (μM)	104.65 ± 13.35	9.30 ± 2.07
Glóbulos rojos humanos (μM)	25.40 ± 3.88	3.18 ± 0.22
Musculo esquelético (nmol/g)	226.8 ± 4.3	45.2 ± 3.1

### 1.1.1 Biosíntesis del NAD<sup>+</sup>

La biosíntesis del NAD<sup>+</sup> contribuye al soporte y equilibrio de las funciones celulares en procesos metabólicos como glucolisis, ciclo de ácidos tricarboxílicos o β- oxidación y al ser sustrato de múltiples enzimas. En organismos eucariotas y procariotas, la síntesis del NAD<sup>+</sup> emplea 3 diferentes rutas (Figura 1-2): la ruta *de novo*, cuyos precursores son aminoácidos; la ruta de Preiss-Handler, a partir del ácido nicotínico, y la ruta de salvamento, en la cual son usados biomoléculas preformadas como la nicotinamida o el nicotinato ribosido [11], [12]

**Figura 1-2. Biosíntesis del NAD<sup>+</sup>.** Ruta *de novo* (Magenta), Preiss-Handler (Azul) y Salvamento (Violeta) [13]. Generado en Biorender.



### 1.1.1.1 Ruta *de novo*

La ruta *de novo* parte de los aminoácidos triptófano (Trp) y ácido aspártico (Asp) en eucariotas y en algunas bacterias y plantas respectivamente. Posteriormente, se produce ácido quinolínico (QA). El QA, mediante la transferencia de un grupo fosforibosa, se convertirá en el ácido nicotínico mononucleotido (NaMN), reaccionando este con un grupo adenilato procedente del ATP, donde esta reacción es catalizada con la enzima NMNAT, generando de esta forma el ácido nicotínico dinucleótido adenina (NaAD), la síntesis finaliza con la transferencia de un grupo amino de la glutamina hacia NaAD, formando NAD.[14]

### 1.1.1.2 Ruta Preiss-Handler

La ruta Preiss-Handler permite reciclar el ácido nicotínico (Na) conectándolo con la ruta *de novo*. El Na es convertido en el intermediario NaMN mediante la nicotinato fosforribosiltransferasa (Npt).[15]

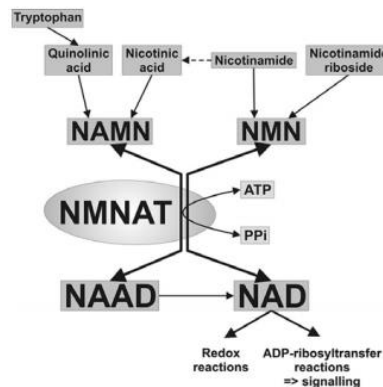
### 1.1.1.3 Ruta de salvamento

La ruta de salvamento se genera reciclando productos de degradación del NAD<sup>+</sup> como la nicotinamida (Nam) o la nicotinamida ribosido (NaR), los cuales pueden obtenerse mediante la ingesta de alimentos (Vitamina B3) o por productos de reacciones catabólicas. La nicotinamida (Nam) sufre procesos de ribosilación para obtener NaR; estos precursores son fosforilados, transformándose de esta manera en mononucleotido de nicotinamida (NMN). Posteriormente, el NMN reacciona con ATP, mediante la NMNAT produciéndose NAD<sup>+</sup> [11], [15].

## 1.1.2 NICOTINATO/NICOTINAMIDA MONONUCLEOTIDO ADENILILTRANSFERASA (NMNAT)

La enzima nicotinato/nicotinamida mononucleotido adenililtransferasa (NMNAT) es esencial en la producción del NAD<sup>+</sup>; esta es usada en todas las rutas de biosíntesis y clasificada como nucleotidililtransferasa (E.C:2.7.7.1). Son proteínas globulares relativamente pequeñas (20 a 50 kDa), las cuales están presentes en todos los dominios de la vida. Las NMNAT presentan un plegamiento tipo Rossmann, una estructura super secundaria de unión a nucleótidos, compuesto por una serie de láminas betas y hélices alfa alternadas. Algunas NMNAT's identificadas presentan unión en homo-oligomeros de 2 a 6 subunidades [16], [17]. La NMNAT cataliza la producción de NAD<sup>+</sup> a partir de NMN y ATP. Adicionalmente, cataliza la conversión metabólica de fármacos como la tiozofurina y el ribosido de benzamida a formas activas [11].

**Figura 1-3. Rol principal de la NMNAT en la biosíntesis del NAD<sup>+</sup>.** La NMNAT cataliza la síntesis del NAD<sup>+</sup> y su forma desaminada NAAD, a partir de NMN y NAMN con ATP. Estos precursores proceden de fuentes dietéticas o de la degradación del NAD<sup>+</sup> [16].



### 1.1.3 TRANSPORTADORES DE NAD<sup>+</sup>

Aunque se han identificado varios procesos biosintéticos del NAD<sup>+</sup> en organelos celulares, tales como en mitocondria, núcleo y asociación a Golgi, el transporte de este metabolito ha sido verificado experimentalmente, mediante la identificación y caracterización de proteínas transportadoras del dinucleotido [18][19]. Existen dos grupos de familias de proteínas transportadoras: *Nucleotide transporters* (NTT) y *Mitochondrial carrier family* (MCF). Las NTT son una familia de transportadores cuya función se basa en la captación de nucleótidos y ATP, que han sido caracterizadas principalmente en parásitos con genomas reducidos y en organelos endosimbióticos como plastidios[20]. Las MCF que permiten el paso de compuestos hidrofóbicos a través de la membrana mitocondrial interna son proteínas de bajo peso molecular. Las moléculas transportadas son variables en tamaño y estructura desde H<sup>+</sup> hasta NAD<sup>+</sup>[21].

## 1.2 PROTOZOOS

Los protozoarios son un grupo de eucariotas basales, poseen un núcleo definido y órganos celulares; adicionalmente presentan movilidad y son heterótrofos. El tamaño de estos organismos es variable; pueden medir desde micras hasta milímetros. Los protozoos parasitarios poseen un tamaño pequeño, mientras que las especies de vida libre son más grandes. Su reproducción es asexual, dividiéndose por fisión binaria simple o fisión binaria múltiple; existen casos en los que la reproducción asexual se ve complementada por un tipo de reproducción sexual o fusión temporal del espécimen, permitiendo de esta forma un intercambio de material genético [22], [23].

### 1.2.1 Protozoos parasitarios

#### 1.2.1.1 Parásitos Intracelulares

Los parásitos intracelulares son organismos cuya característica principal es la invasión y la multiplicación dentro de la célula del huésped, provocando de esta forma enfermedades crónicas. Algunas de estas enfermedades son la Leishmaniasis y la

enfermedad de Chagas causadas por *Leishmania spp* y *Trypanosoma cruzi* respectivamente[24].

### 1.2.1.2 Parásitos Extracelulares

Los parásitos extracelulares invaden los tejidos exteriores tales como mucosas o epitelios, absorbiendo los nutrientes del medio y dañando los tejidos a su alrededor, generando así enfermedades agudas. Entre las enfermedades más representativas se encuentra la tricomoniasis y la giardiasis, generadas por *Trichomonas vaginalis* y *Giardia duodenalis* respectivamente[24].

#### 1.2.1.2.1 *Trichomonas vaginalis*

*Trichomonas vaginalis* es un parásito extracelular causante de la tricomoniasis, la enfermedad de transmisión sexual no viral (ETS) más ampliamente distribuida en el planeta, con aproximadamente 170 millones de casos al año. La *T. vaginalis* infecta el tracto urogenital de hombres y mujeres entre 15 a 50 años. Este parásito puede causar otras patologías como vaginitis, cervicitis y uretritis y en los hombres síndrome genito-urinario. Este parásito puede ser un cofactor del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), por lo cual el control del parásito es clave para disminuir riesgos de ETS mayores[25]. El parásito puede presentar endosimbiosis con *Mycoplasma hominis*, ocasionando con esta interacción un aumento en la tasa de crecimiento y la producción de ATP del parásito; adicionalmente *M. hominis* contribuye en los procesos inflamatorios[26].



## 2. Antecedentes

En la producción de energía a nivel celular, los transportadores de electrones tienen un papel clave, uno de los más relevantes es el Dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD<sup>+</sup>/NADH). Este nucleótido es una coenzima de transferencia de hidruros y un sustrato en múltiples reacciones celulares como modificaciones postraduccionales, reparación del ADN, entre otros. En la obtención del NAD<sup>+</sup>, las rutas *de novo*, Press-Handler y salvamento convergen en la enzima NMNAT, la cual es esencial para la regulación de las concentraciones y generación de NAD<sup>+</sup>.

La NMNAT ha sido encontrada en eucariotas y procariotas; en el hombre se identificaron 3 isoenzimas, localizadas en núcleo (NMNAT1), en aparato de Golgi (NMNAT2) y en la mitocondria (NMNAT3). Estas isoenzimas están relacionadas con diferentes procesos en los organelos mencionados, por ejemplo, la NMNAT1 humana está implicada en la reparación del ADN.

En *Escherichia coli* se identificaron 2 isoenzimas de la NMNAT, distinguidas por sus preferencias en los precursores de la biosíntesis del NAD<sup>+</sup>. La NadD-*E.coli* es un monómero de 25 kDa, presenta una actividad preferencial para NaMN. La NadR-*E.coli* se agrega en tetrámero de subunidades de 45 kDa y se considera altamente específica para el NMN[27].

El metabolismo del NAD<sup>+</sup> en protozoos ha sido poco estudiado. En el grupo LIBBIQ de la Universidad Nacional de Colombia se han identificado diferentes NMNAT en estos organismos: tres en parásitos intracelulares, LbNMNAT de *Leishmania braziliensis* [6], TcNMNAT en *Trypanosoma cruzi* [28] y PfNMNAT en *Plasmodium falciparum* [29], y dos en parásitos extracelulares *Giardia lamblia*, GINMNATa y GINMNATb. A estas isoenzimas se les realizaron estudios de actividad enzimática con el mononucleótido de nicotinamida (NMN) y el ácido nicotínico (NAMN), siendo positiva su actividad *in vitro*, mediante el uso de su respectiva proteína recombinante [30]. Adicionalmente, en un

trabajo bioinformático, se analizaron protozoarios de vida libre y parasitarios, donde fueron encontrados 16 nuevos candidatos a NMNAT; los protozoos de vida libre y extracelulares presentaron 2 o más NMNAT y los parásitos intracelulares una de estas enzimas.

Con relación a las proteínas transportadoras de NAD<sup>+</sup>, se han identificado varias proteínas en *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* y *Homo sapiens* e igualmente en bacterias como Chlamydia. En protozoarios, los transportadores de NAD<sup>+</sup> han sido poco estudiados. En el laboratorio de LIBBIQ a la fecha, se estudian varios candidatos a proteínas transportadoras de NAD<sup>+</sup> en los parásitos intracelulares *Leishmania braziliensis* y *Trypanosoma cruzi* [18], [19], [21], [31].

### 3. Justificación

Los protozoos parasitarios son organismos causantes de enfermedades de alta incidencia en la salud pública. Los tratamientos usados contra estas parasitemias no son eficientes debido a los efectos secundarios que presentan y a la resistencia generada a los mismos, ante lo cual es necesario identificar nuevos blancos farmacológicos para el desarrollo de estrategias más efectivas. El metabolismo del NAD<sup>+</sup> se plantea como una diana promisoría para la búsqueda de dichos blancos, debido a su relevancia a nivel celular.

Considerando los antecedentes planteados acerca del metabolismo del NAD<sup>+</sup> en parásitos extracelulares, se generan los siguientes interrogantes:

- ¿Tienen los parásitos extracelulares varias formas de NMNAT?
- ¿Hay una relación entre el parasitismo y el número de NMNAT?
- ¿Existen diferencias estructurales y funcionales de la proteína del parásito con relación a sus ortólogas humanas?
- ¿Existen transportadores del NAD<sup>+</sup> en protozoos extracelulares?

Con base en lo anterior y en pro de generar nuevo conocimiento acerca de los mecanismos energéticos de parásitos extracelulares, se plantea esta investigación, en se estudiará la NMNAT de *Trichomonas vaginalis* causante de la enfermedad de transmisión sexual (ETS) no viral más grande a nivel mundial como modelo de parásito extracelular. Adicionalmente, en una segunda parte, se realizará un acercamiento bioinformático a los transportadores del dinucleótido de parásitos protozoarios extracelulares.



## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo General

- Estudiar los procesos biosintéticos y de transporte del  $\text{NAD}^+$  en parásitos extracelulares.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Desarrollar un acercamiento bioinformático - experimental al estudio de la NMNAT de *Trichomonas vaginalis*, a partir de la clonación y expresión de la proteína recombinante.
- Caracterizar la NMNAT de *Trichomonas vaginalis*, mediante análisis de su actividad enzimática.
- Determinar estructuralmente la conformación oligomérica de la NMNAT de *Trichomonas vaginalis*
- Realizar un acercamiento bioinformático en la búsqueda de posibles transportadores del  $\text{NAD}^+$  en protozoos extracelulares.



## 5. Metodología

### 5.1 Aproximación bioinformática - experimental de NMNATs de *Trichomonas vaginalis*

La siguiente metodología se realizó con el propósito de cumplir los objetivos planteados.

- Desarrollar un acercamiento bioinformático - experimental al estudio de la NMNAT de *Trichomonas vaginalis*, a partir de la clonación y expresión de la proteína recombinante.
- Caracterizar la NMNAT de *Trichomonas vaginalis*, mediante análisis de su actividad enzimática.
- Determinar estructuralmente la conformación oligomérica de la NMNAT de *Trichomonas vaginalis*

#### 5.1.1 Aproximación bioinformática

A partir de las secuencias NMNAT de *Trichomonas vaginalis* identificadas en un trabajo previo[32]. Se realizó un análisis *in silico* como se describe a continuación:

##### 5.1.1.1 Análisis de estructura primaria de las TvNMNAT

Las secuencias proteicas de los candidatos fueron usadas para determinar el peso molecular, calcular su punto isoelectrico con la herramienta ProtParam [33]. La composición de aminoácidos y alineamiento de secuencias múltiples con las NMNAT humanas y de parásitos protozoarios, se realizó en el programa CLC Main Workbench 21.0.3 [34]. La localización subcelular de estas enzimas, se evaluó mediante los servidores DeepLoc-1.0, Euk-mPLoc 2,0 , iLoc-Animal y COFACTOR [35]–[38]. Las modificaciones postraduccionales evaluadas fueron; fosforilación (NetPhos 3.1), acetilación (NetAcet-1.0) y palmitoilación (GPS Palm). Estos resultados fueron generados en la interfase GPS5 [39]–[42].

### **5.1.1.2 Análisis de estructura secundaria y terciaria de las TvNMNAT**

La estructura secundaria de las dos proteínas candidatas se evaluó usando el programa PSIPRED identificando las hélices  $\alpha$ , laminas  $\beta$  y random coil [43]. El modelamiento de la estructura terciaria se realizó en el servidor I-TASSER, los modelos fueron analizados por los programas Rampage y Swiss-Model y mediante el servidor MofRefiner se realizó el refinamiento estructural de los candidatos [44], [45]. La superposición de la estructura terciaria de las proteínas candidatas con sus ortólogas humanas se realizó usando USF-Chimera [46].

### **5.1.1.3 Acoplamiento molecular (Docking) de las TvNMNAT con sus sustratos.**

Para la realización de los acoplamientos moleculares, fueron descargados los ligandos NMN, NaMN y ATP desde la base de datos PubChem [47] y la optimización de los sustratos fue generada con Avogadro[48]. Usando Autodock-Tools fueron generados los archivos para las proteínas y ligandos y fue construida una cuadrícula de interacción. Mediante Autodock Vina se calcularon las energías de unión y los análisis de las interacciones se realizaron usando LigPlot+[49], [50].

## **5.1.2 Aproximación experimental**

### **5.1.2.1 Estandarización de las condiciones de amplificación**

El ADN genómico de *Trichomonas vaginalis* fue donado por la Dra. Patricia Cuervo del Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (Brasil). Teniendo en cuenta los dos candidatos obtenidos de la NMNAT de *T. vaginalis* en trabajos anteriores (candidato 1: XP\_001581422.1, candidato 2: XP\_001584530.1) se realizó el diseño de primers con la herramienta Primer3 Plus y Thermo Fisher, en donde se diseñaron dos primers directos para ser usado en vectores TOPO y TA (Tabla 5-1) [51]. La especificidad de los primers diseñados fue comprobada mediante un análisis con BLAST usando como partida al genoma del parásito.

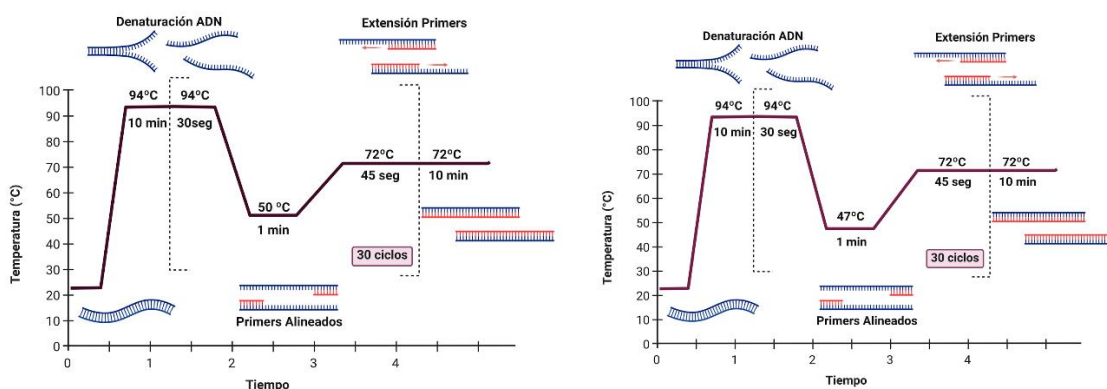


**Tabla 5-1. Características de los primers utilizados para la amplificación de TvNMNAT1 (Magenta) y TvNMNAT2 (Azul).**

Candidato	Primer	Secuencia 5' – 3'	% GC
TvNMNAT 1	TvNMNATd	CAC CAT GTC TAA GAA GTG CGT TCT TGC G	44
	TvNMNAT1pD-TA	ATG TCT AAG AAG TGC GTT CTT G	41
	TvNMNATr	TTT GCC TAA TAT GTT CGG TCT TAT T	33
TvNMNAT 2	STvNMNAT	CAC CAT GAC ATC TGA AGA AAT AGT T	36
	TvNMNAT2pD-TA	ATG ACA TCT GAA GAA ATA GTT TTA G	28
	AsTvNMNAT	TTA GTC TTT ATA GTA GTT ATT CTT AGC	26

Para la estandarización de las condiciones de amplificación se empleó: 50 ng de ADN plantilla, Buffer de amplificación 1 X (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.2), MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTPs 0.2 mM, Primers 0.4 μM, *Taq* polimerasa 1 U en H<sub>2</sub>O<sub>(dd)</sub> a un volumen final de 15 μL empleando el termociclador Veriti 96-Well [52], bajo estas condiciones fueron evaluadas las temperaturas de alineación para cada una de las parejas de primers diseñadas determinando así el mejor perfil térmico (Figura 5-1). Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis de agarosa al 1% en TBE 0.5X y visualizado por tinción en bromuro de etidio. Estas condiciones de amplificación usando *Taq* polimerasa fueron utilizadas para la amplificación de los genes de interés para su ligación en el vector pET-SUMO.

**Figura 5-1. Perfil térmico de PCR utilizado en la amplificación de las secuencias codificantes. (a) tvnmnat1 (b) tvnmnat2. Generado en Biorender.**



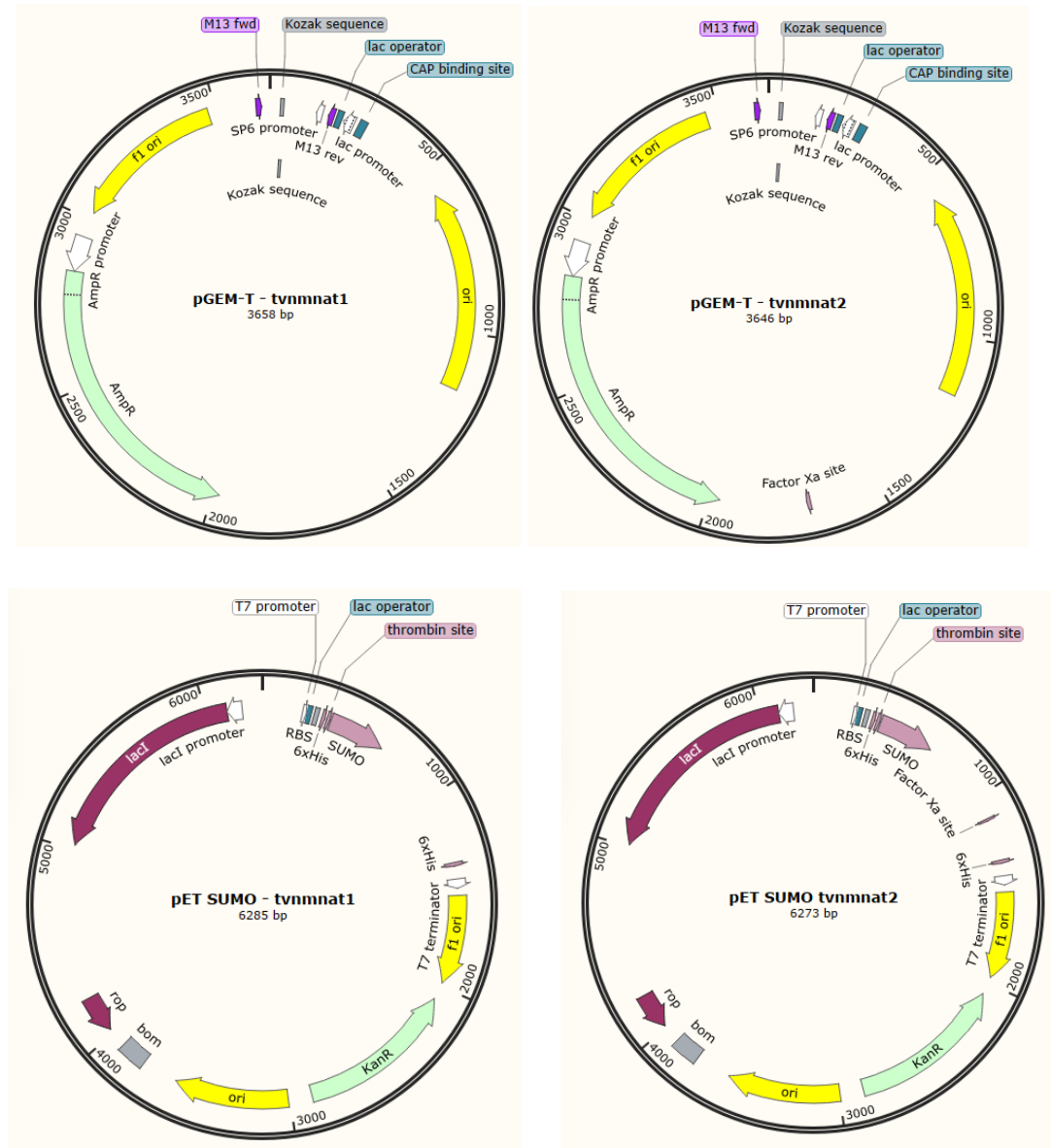
### 5.1.2.2 Clonación del Vector Recombinante *pGEM-T/tvnmnat* y *pET SUMO/tvnmnat*

La ligación en los vectores pGEM-T Easy (Promega) y pET SUMO (Thermo Fisher) se realizó usando una relación 1:3 (vector:inserto), 1 µL vector, 1 µL Buffer de ligación 10X y 1 µL T4 ADN Ligasa, la mezcla de reacción se incubó a 16°C por una hora y posteriormente, a 4°C overnight [53], [54].

El plásmido recombinante (*pGEM-T/tvnmnat* y *pET-SUMO/tvnmnat*) se transformó en células químicamente competentes *E. coli* TOP10 (cepa de mantenimiento) por choque térmico (Figura 5-2). Para ello se tomaron 50 µL de células químicamente competentes *E. coli* TOP10 con 2 µL de producto de ligación, la incubación se realizó por 30 minutos en baño de hielo, posteriormente las células se sometieron a 42 °C/30 segundos y colocadas inmediatamente después por 5 minutos sobre hielo. La incubación fue realizada durante una hora a 37°C para recuperación con 250 µL de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM y glucosa 20 mM). Las células recuperadas se platearon en cajas de Petri con LB-Agar (bactotripton 1% p/v, cloruro de sodio 1% p/v y extracto de levadura 0.5% p/v a pH 7.0) con ampicilina 100 µg/mL (*pGEM-T*) y 50 µg/mL (*pET-SUMO*) e incubadas toda la noche a 37°C.

El rastreo de los clones transformados se hizo mediante PCR con las condiciones estandarizadas anteriormente utilizando como plantilla la colonia transformada, resuspendida en 20 µL de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> y posteriormente lisada a 92°C/10 minutos en baño María. Los resultados se visualizaron en electroforesis de agarosa al 1 % en TBE 0.5 X a 100 V mediante tinción con bromuro de etidio.

**Figura 5-2. Mapa de los vectores recombinantes construidos pGEM-T-*tvnmnat* y pET SUMO-*tvnmnat*.** A) pGEM-T – *tvnmnat1*(izquierda), pGEM-T – *tvnmnat2* (derecha). B) pETSUMO- *tvnmnat1* (izquierda), pETSUMO- *tvnmnat2* (derecha). Visualizados en SnapGene [55].



### 5.1.2.3 Preparación de células químicamente competentes

Para realizar la transformación de los plásmidos recombinantes en células *E. coli* se prepararon células químicamente competentes *E. coli* TOP10 y BL21 (D3) como se describe a continuación. Se realizó un inóculo *E. coli* TOP10 y BL21 (D3) en 10 mL de LB, incubadas a 37°C toda la noche. Posteriormente, se hizo una dilución 1:50 del inóculo anterior en 50 mL de LB, incubando a 37°C hasta una densidad óptica (OD

600nm= 0.3 – 0.4). El cultivo bacteriano fue centrifugado a 4000 rpm /10 min a 4°C, descartando el sobrenadante y el pellet bacteriano obtenido se resuspendió en 4 mL CaCl<sub>2</sub> 100 mM (estéril, frío y fresco) e incubo 10 min con agitación constante, el procedimiento anterior se repitió. A continuación, se centrifugó a 4000 rpm /10 min a 4°C, descartando el sobrenadante y resuspendiendo las células en 1.750 mL CaCl<sub>2</sub> 100 mM.

Finalmente, fueron elaboradas alícuotas de 50 µL de células químicamente competentes, utilizadas en los procesos de transformación. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, todo el proceso mantuvo en baño de hielo y en condiciones de esterilidad.

#### **5.1.2.4 Purificación de Plásmidos Recombinantes**

Las colonias recombinantes para pGEM-T/*tvnmnat* y pET-SUMO/ *tvnmnat* se inocularon en medio LB líquido con ampicilina 100 µg/mL y kanamicina 50 µg/mL respectivamente e incubadas a 37°C toda la noche. Luego, se realizó el método de lisis alcalina para extracción de plásmido, en el cual se centrifugo el inóculo a 6000 rpm por 10 minutos, el pellet resultante se resuspendió en 300 µL solución isotónica (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 2.5 mM pH 8.0) e incubado por 5 minutos a 4°C; posteriormente, se adiciono 300 µL de solución de lisis (NaOH 0.2 M, dodecilsulfato sódico SDS 1% p/v), mezclándose esta solución por inversión e incubándose a 4°C/5 minutos, transcurrido este tiempo se agregaron 300 µL de solución de neutralización (acetato de potasio 3 M pH 4.8), se centrifugo a 12000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante resultante fue transferido a un eppendorf con 1 µL RNasa (10 ng/mL), incubando a 37°C/30 minutos y centrifugando a 12000 rpm /10 minutos, obteniendo la fase acuosa (sobrenadante) a la cual se le agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto frio y 1/10 de acetato de potasio frio 3 M, esta solución se precipito a -20°C por una hora. Finalmente, fue centrifugado a 12000 rpm /10 min, eliminando el sobrenadante y realizando dos lavados más al precipitado con 1 mL de etanol 70% frio, evaporando el etanol excedente a 37°C por 10 minutos. El pellet se resuspendió en 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>(dd)</sub> [56]. El plásmido recombinante fue analizado por electroforesis de agarosa al 0.8 % en TBE 0.5X y visualizado por tinción en bromuro de etidio.

#### **5.1.2.5 Verificación del Plásmido Recombinante**

Con el fin de identificar los plásmidos recombinantes (pGEM-T/*tvnmnat* y pET-SUMO/*tvnmnat*) se realizó una PCR y digestión enzimática. Las condiciones de PCR

utilizadas se encuentran descritas en el numeral 5.1.2.1, donde como control positivo se utilizó ADN genómico 1  $\mu$ L de *T. vaginalis* y como control negativo 1  $\mu$ L H<sub>2</sub>O.

#### **5.1.2.6 Transformación en cepa de expresión con el plásmido recombinante**

Los plásmidos recombinantes previamente obtenidos por el método lisis alcalina en cepas de *E. coli* de mantenimiento, fueron transferidos a cepas *E. coli* de expresión BL21(D3), como se describió en el numeral 5.1.2.3.

#### **5.1.2.7 Expresión de la proteína recombinante 6xHisTvNMNAT**

Con los clones transformados, se realizó un inóculo en 10 mL LB, glucosa 1% (p/v) y kanamicina (50  $\mu$ g/mL) y se incubaron a 37 °C toda la noche. A continuación, fue generada una dilución 1:50 del inóculo anterior con 20 mL LB, glucosa 1 % y kanamicina (50  $\mu$ g/mL), incubando a 37°C hasta una densidad óptica (OD 600nm= 0.6). La inducción se realizó con isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5 mM, con una incubación a 37 °C en agitación constante. Obteniendo muestras de tiempos de inducción de 2, 4, 6 horas y toda la noche. La recolección de las bacterias se llevó a cabo mediante centrifugación a 6000 rpm /15 min a 4 °C, descartando posteriormente el sobrenadante y obteniendo el peso húmedo del pellet bacteriano. El monitoreo de la inducción se realizó mediante SDS-PAGE utilizando un gel concentrador de 3.9 %T y un gel separador de 12 %T, donde se tomaron células BL21(D3) no transformadas, no inducidas e inducidas, las cuales se resuspendieron en Buffer de carga 1X (Tris 0,083 M, SDS 1,74% (p/v), Glicerol 5% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 5,5% (v/v) y azul de bromofenol 0,002% (p/v)), luego se trataron las muestras a 94°C / 10 minutos y se sembraron cada una de las muestras. El gel fue corrido con buffer de electroforesis 1X (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v)) a 100 V y con tinción con azul de Coomassie-R250[56].

#### **5.1.2.8 Determinación de la solubilidad de las proteínas recombinantes 6xHisTvNMNAT**

Para determinar la solubilidad de las proteínas recombinantes, se tomaron las células provenientes del numeral anterior y se centrifugaron a 6000 rpm/15 min a 4°C. Los pellets celulares se resuspendieron en buffer de lisis (50 mM Fosfato de potasio, pH 7.8, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% Glicerol, 0,5% TritonX-100, 10 mM Imidazol) usando 5

mL / gramo de pellet húmedo celular, 1 mg/mL lisozima y 1:400 Inhibidor de proteasas (relación volumétrica inhibidor: extracto) (Promega) [57]. Esta mezcla fue incubada durante 1 hora a 4°C con agitación constante. Las muestras fueron sometidas a sonicación (50% amplitud, pulsos de 15 s y reposo de 45 s para un total de 3 min) a baño de hielo a 4°C y centrifugadas a 12000 rpm /20 min a 4°C, obteniendo así las fracciones solubles e insolubles. Estas fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE en geles discontinuos al 12% T.

#### **5.1.2.9 Inmunodetección de la proteína recombinante 6xHisTvNMNAT**

Las fracciones totales, soluble e insoluble evaluadas fueron separadas mediante SDS-PAGE en geles discontinuos y transferidos a membranas de nitrocelulosa (Biorad) en buffer de transferencia (0,2 M glicina, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 10% metanol (v/v)) usando una corriente de 200 mA / 2 horas. La transferencia fue analizada por tinción de Ponceau sobre la membrana, bloqueada por 2 h con solución de leche descremada 5% (p/v) en TBST (150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.1% Tween-20 (v/v)). La inmunodetección de la proteína TvNMNAT fue realizada usando anticuerpo primario anti-6xHis (1:5000) (Abcam), anticuerpo secundario anti-raton conjugado a fosfatasa (1:10000) (Sigma) y los sustratos de revelado nitro-azul de tetrazolio (NBT) (50 mg/mL) y 5-Bromo-4-Cloro-3'-indoilfosfato (BCIP) (50 mg/mL) (Promega) en buffer sustrato (150 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 9.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>). Durante los cambios de anticuerpos fueron realizados tres lavados con TBST de 10 min cada uno [58].

#### **5.1.2.10 Purificación de la proteína recombinante 6xHisTvNMNAT**

Las fracciones solubles enriquecidas con la proteína recombinante 6xHis TvNMNAT fueron incubadas con la resina Cobalt Agarose Beads High Density previamente equilibrada con el buffer de unión (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% Glicerol, 0,5% TritonX-100, 10 mM Imidazol) durante una hora a 4°C con agitación constante. La anterior mezcla fue centrifugada a 4000 rpm/5 min a 4°C, separando el sobrenadante con las proteínas no unidas. A continuación, se realizó un gradiente discontinuo 20, 30, 50, 75, 150, 300 y 500 mM de Imidazol con el buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% Glicerol, 0,5% TritonX-100) en pro de estandarizar las condiciones de elución de las proteínas recombinantes [59].

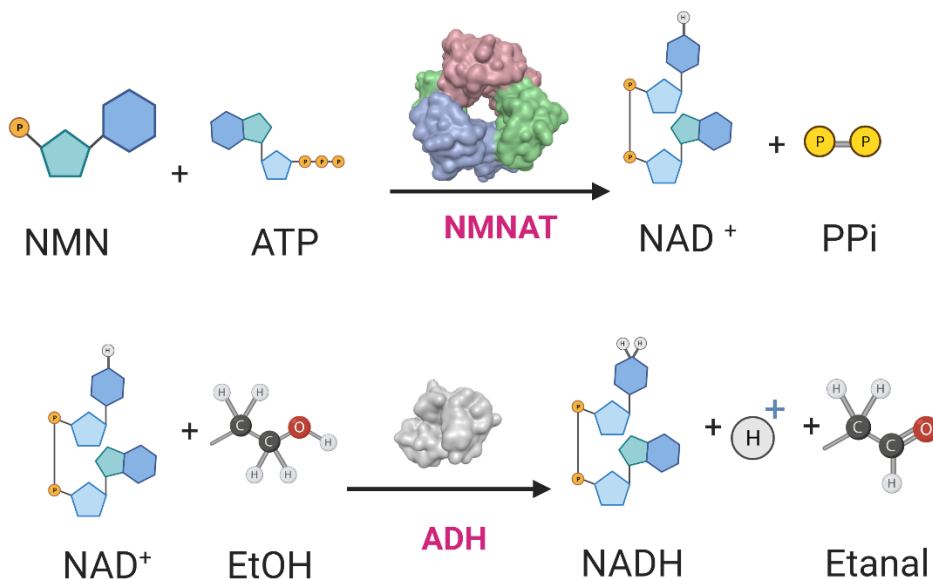
Posteriormente, la fracción soluble se dializó empleando una membrana MWCO (Molecular Weight Cut-Off) de 10kDa en 500 mL de buffer fosfatos (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5, 300 mM NaCl) durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Al día siguiente, fue realizado un cambio de buffer fosfatos e incubado por 3 horas. Las muestras dializadas fueron suplementadas con glicerol 10% y almacenadas a -20°C. Los pasos de purificación fueron analizados por SDS-PAGE en geles discontinuos y western blot y los eluidos se cuantificaron mediante el método de Bradford.

#### **5.1.2.11 Caracterización enzimática de la proteína recombinante 6xHisTvNMNAT**

Para comprobar la identidad de las proteínas TvNMNAT, fue evaluada su actividad de biosíntesis mediante el desarrollo de ensayos enzimáticos directos e indirectos.

##### **5.1.2.11.1 Ensayos enzimáticos acoplados**

La actividad enzimática de las proteínas recombinantes 6xHis-TvNMNAT se determinó mediante ensayos enzimáticos acoplados usando la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (E.C: 1.1.1.1), en donde se realizaron monitoreos de aumento de la absorbancia a 340 nm, monitoreando la producción de NAD<sup>+</sup> a través de la reducción del NADH (Figura 5-3) [60], [61]. La mezcla de reacción se realizó con 40 mM Etanol, 25 mM HEPES/KOH pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 mM ATP (Sigma), 1.25mM NMN (Sigma) y 2 UI ADH (Sigma), la cual se incubo a temperatura ambiente durante 5 min con agitación constante. La reacción se inició adicionando 300 y 250 µg de TvNMNAT1 y TvNMNAT2 respectivamente, registrando valores de absorbancia a 340 nm por 20 min. Fue utilizado como control positivo de reacción en los ensayos, la NMNAT purificada de *Leishmania braziliensis* [6].

**Figura 5-3. Ensayo enzimático acoplado con ADH.** Generado en Biorender.

#### 5.1.2.11.2 Ensayos enzimáticos directos

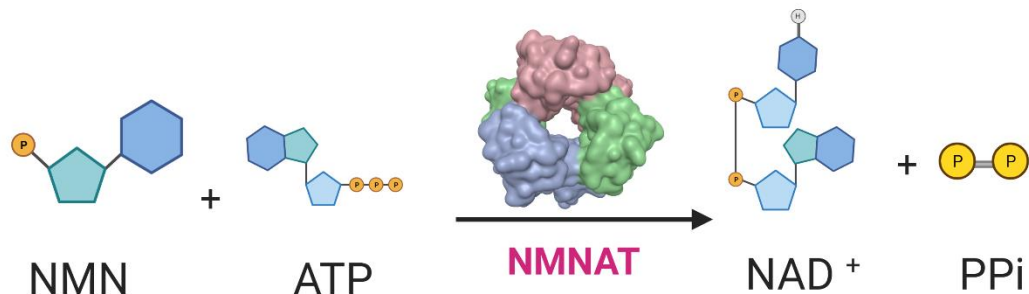
La biosíntesis de NAD<sup>+</sup> también fue analizada mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC). El ensayo de actividad consiste en la formación del NAD<sup>+</sup> mediante la transferencia del ATP al NMN, como se observa en la Figura 5-4. Para lo cual, se mezclaron 25 mM HEPES/KOH pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 mM ATP (Sigma) y 1.25mM NMN (Sigma). La reacción se inició con la adición de 20 y 10 µg de las enzimas recombinantes TvNMNAT1 y TvNMNAT2, incubadas a 37°C durante 20 min. La reacción fue interrumpida por adición de 50 µL 1,2 M HClO<sub>4</sub> incubando a 4°C / 10 min, luego fue centrifugado a 12000 g / 3 min y se neutralizó con 20 µL mM CaCO<sub>3</sub> incubando a 4°C / 10 min y centrifugado a 12000 g / 3 min, fue tomado el sobrenadante.

La cromatografía RP-HPLC fue realizada en la columna C18 100Å de 100 x 4,6 mm, con tamaño de partícula de 5 µm (Phenomenex) en el cromatógrafo Agilent 1260. Fue utilizado un gradiente de elución isocrático utilizando Buffer A ( 0.1 mM fosfato de potasio, pH 6.0) y Buffer B (99,8% v/v Metanol) manejándose de la siguiente manera: 7 min Buffer A (100%), 2 min Buffer B (30%), 4 min Buffer B (60%), 2 min Buffer B (30%), 2 min Buffer A (100%). El flujo de separación fue 1,5 mL/min a temperatura ambiente, en donde se inyectaron 10 µL de muestra y la detección de las moléculas se realizó a 254



nm. Con el propósito de realizar análisis cuantitativos, se inyectaron los sustratos (NMN, ATP y NAD<sup>+</sup>).

**Figura 5-4. Ensayo enzimático directo.** Generado en Biorender.



Este tipo de ensayo se empleó para determinar las condiciones óptimas de pH y temperatura para las TvNMNAT.

#### 5.1.2.12 Producción de anticuerpos policlonales $\alpha$ -6xHis-SUMO-TvNMNAT-IgY en el modelo aviar

Las proteínas recombinantes 6xHis-SUMO-TvNMNAT purificadas se utilizaron para inmunizar gallinas de la raza Hy-Line Brown de 100 semanas bajo condiciones de mantenimiento estándar para el trabajo animal, siendo mantenidas en el centro de producción avícola de la Facultad de medicina veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Adicional a los individuos inmunizados, se inoculó con PBS 1X un individuo control para monitorear el proceso. Las condiciones de inmunización en el modelo aviar usadas han sido reportadas en la literatura y estandarizadas en el laboratorio de investigaciones básicas en bioquímica - LIBBIQ. La primera inmunización se realizó usando 150  $\mu$ g de antígeno con adyuvante de Freund completo en relación 1:1 (Antígeno:Adyuvante) homogenizado mediante vortex e inyectado por vía intramuscular (Día 0). Fueron realizados tres refuerzos posteriores a los 15 días y luego con intervalos de 8 días con antígeno y adyuvante incompleto en relación (1:1) con volúmenes de inyección de 300  $\mu$ L. Fueron recolectados los huevos durante todo el periodo de inmunización junto con las muestras de sangre periféricas, extraídas posterior a cada inmunización para monitorear el proceso [62].

**Tabla 5-2. Esquema de inmunización de gallinas para la generación de anticuerpos policlonales IgY contra la proteína recombinante 6xHis-TvNMNAT. C: Adyuvante completo. I: Adyuvante incompleto.**

		6xHis-TvNMNAT				Control			
Dia		0	15	23	30	0	15	23	30
<b>Adyuvante</b>		C	I	I	I	C	I	I	I
<b>de Freund</b>	( $\mu$ L)	150	150	150	150	150	150	150	150
<b>Antígeno</b>	( $\mu$ g)	150	150	150	150	-	-	-	-
	( $\mu$ L)	150	150	150	150	-	-	-	-
<b>PBS 1X (<math>\mu</math>L)</b>		-	-	-	-	150	150	150	150



#### 5.1.2.12.1 Obtención de anticuerpos policlonales presentes en suero.

Con la finalidad de obtener los anticuerpos presentes en suero, a las sangrías recolectadas se les dejó coagular durante 30min a 37°C y luego mediante centrifugación (12000 rpm durante 20 min a 4°C) fue separado el suero, el cual fue suplementado con Glicerol al 20% y almacenadas a -20°C. Con el fin de determinar el nivel de reconocimiento de los anticuerpos presentes en suero se realizó un western blot, teniendo en cuenta la concentración de anticuerpo producido ( $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT-IgY) realizando diluciones en TBST y adicionalmente, la concentración de antígeno (6xHis-SUMO-TvNMNAT) a reconocer. Como anticuerpo secundario fue utilizado  $\alpha$ Chicken-Donkey producido en burro (Gallus Immunitech inc.).

#### 5.1.2.12.2 Purificación de anticuerpos IgY presentes en sangre y yema de huevo.

Con el fin de purificar los  $\alpha$ -6xHis-SUMO-TvNMNAT-IgY presentes en suero, fue utilizado el método de afinidad a antígeno; para lo cual, la proteína recombinante antigénica purificada (250  $\mu$ g) fue separada mediante SDS-PAGE, transfiriéndola posteriormente a una membrana de nitrocelulosa (200mA por 2h). La banda con la proteína de interés fue visualizada mediante Rojo de Ponceau y cortada (~37 kDa), se realizó un pre-eluido con glicina 100mM pH 2.5 por 10min en agitación constante. Seguido, la membrana fue lavada con TBST 0,2% durante 10min y bloqueada con TBST 0,2% - leche 5% por 1h, se retiró el exceso de leche mediante 3 lavados de 10min con TBST 0,2%. Posteriormente,

fue cortada en cuadros de 2x2mm y se incubo toda la noche (O/N) en agitación constante con 500uL de suero. Anticuerpos no unidos o suero remanente, fueron retirados mediante pipeteo y conservados a -20°C. Se realizaron lavados con TBS T 0,2% siendo monitoreados por espectrofotometría hasta alcanzar una absorbancia a 280nm menor a 0,1. Finalmente, la elución de los anticuerpos se realizó con 150uL de glicina 100mM pH 2.5 interactuando con la membrana durante 10min en agitación constante; los eluidos fueron neutralizados con 15uL de Tris HCl 2M pH 8.5 y almacenados a -20°C, se cuantificaron mediante espectrofotometría a 280nm.

Por otro lado, la extracción de los anticuerpos  $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT-IgY presentes en yema de huevo, se realizó mediante su precipitación en gradientes crecientes de polietilenglicol (PEG-6000). Para lo cual, las yemas fueron separadas de la clara cuidadosamente y solubilizadas en 2 volúmenes de Buffer PBS 1X pH 7,4, fue tomada una alícuota de 1mL de cada huevo para la evaluación preliminar de todas las muestras. A continuación, fueron realizado el gradiente (3.4, 8.5 y 12%) permitiendo obtener las inmunoglobulinas enriquecidas; En la primera precipitación, se obtuvo la fase intermedia (eliminando lípidos), en la segunda el sobrenadante y en la tercera el pellet (siendo resuspendido en 1mL de PBS 1X, para todos los casos las muestras se dejaron en agitación a 4°C durante 10min y fueron centrifugadas a 14000 rpm por 20min. El precipitado obtenido a un porcentaje de saturación del 12% fue resuspendido en 400  $\mu$ L de PBS 1X, cuantificado por espectrofotometría a 280 nm empleando celda de cuarzo y titulado mediante ensayo de ELISA indirecto para determinar contenido de IgY's específicas contra el antígeno. El proceso fue monitoreado por SDS-PAGE 10% [62].

#### **5.1.2.12.3 Evaluación y caracterización de anticuerpos policlonales $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT-IgY mediante ELISA indirecto.**

Los anticuerpos policlonales  $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT purificados a partir de suero, fueron evaluados mediante ensayos de western blot teniendo en cuenta concentraciones del anticuerpo producido (realizando diluciones en TBST) junto con la concentración de antígeno (6xHis-SUMO-TvNMNAT) a reconocer.

Por otro lado, con respecto a los  $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT extraídos de yema de huevo, se realizó una titulación mediante un ensayo de ELISA indirecto en placas de 96 pozos.

Para esto el antígeno (6xHis-SUMO-TvNMNAT) fue preparado en buffer carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ ) pH 9,6 a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sembrando 100  $\mu\text{L}$  por pozo, esto fue incubado por 1 hora a 37°C y overnight a 4°C (cubriendo la placa con papel vinipel y aluminio). Al día siguiente, se realizó el bloqueo adicionando 200  $\mu\text{L}$  de PBS 1X - Leche 5% durante 2 horas a 37°C; A continuación, se generó la interacción con el anticuerpo primario  $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT en una dilución 1:1000 por 1 hora a 37°C y los correspondientes controles (Tabla 5-3). Entre cada cambio de anticuerpo y sustrato, la placa fue lavada por aspersion abundantemente con PBS 1X por lo menos 3 veces. Posteriormente fueron agregados 100  $\mu\text{L}$  del anticuerpo secundario  $\alpha$ IgY-HRP (Sigma) en una dilución 1:10000 preparado en PBS 1X, incubando 2 horas a 37°C. El revelado de la placa se realizó con 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS - Sigma) y peróxido de hidrógeno 4% en buffer citrato-fosfato 100mM pH 5 incubando 1h a 37°C, la reacción se detuvo con 20  $\mu\text{L}$  de SDS 1%. Finalmente, se realizó la lectura de la placa a 405 nm.

**Tabla 5-3. Controles empleados en ELISA indirecto de la titulación de los IgY contra TvNMNAT extraídos de yema.** Ab: Anticuerpo

No	Tipo de control	Antígeno	Ab-1 <sup>rio</sup>	Ab-2 <sup>rio</sup>
1	Negativo	BSA	$\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT	$\alpha$ IgY-HRP
2	Negativo	6xHis-SUMO-TvNMNAT	$\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT	PBS 1X
3	Negativo	6xHis-SUMO-TvNMNAT	PBS 1X	$\alpha$ IgY-HRP
4	Negativo	$\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT	PBS 1X	PBS 1X
5	Negativo	PBS 1X	PBS 1X	PBS 1X
6	Positivo	$\alpha$ IgY-HRP (1:4000)	PBS 1X	$\alpha$ IgY-HRP

### **5.1.2.13 Análisis de la estructura cuaternaria de la proteína recombinante 6xHis – SUMO- TvNMNAT**

La determinación de la conformación oligomérica de las enzimas recombinantes 6xHis-SUMO-TvNMNAT, se realizó usando la estrategia de geles nativos de poliacrilamida (PAGE) para la construcción de gráficos de Ferguson.

Teniendo en cuenta los métodos descritos y estandarizados, se usaron 15 µg de proteína purificada TvNMNAT y 15 µg de proteínas con estructura cuaternaria descrita (lisozima, ovoalbúmina y BSA) a modo de patrones moleculares. En la construcción de los gráficos de Ferguson, se realizaron 4 geles nativos (PAGE) paralelos con diferentes concentraciones de acrilamida (8, 9, 10 y 12%), a los que se les determinó la migración relativa de cada proteína (Rf). Con los datos obtenidos fueron determinados coeficientes de migración (Kf) y con los pesos moleculares de los diferentes oligómeros, se realizaron las gráficas de Ferguson ( -Log Kf vs Log MW) a partir de las cuales se estimó el peso molecular de la proteína recombinante (6xHis-SUMO-TvNMNAT), empleando las ecuaciones generadas en los gráficos [63]–[66].

## **5.2 Análisis bioinformático de transportadores de la familia MCF en parásitos protozoarios extracelulares**

Con el fin de realizar un acercamiento bioinformático en la búsqueda de posibles transportadores del NAD<sup>+</sup> en protozoos extracelulares. Se planteó la siguiente estrategia metodológica.

### **5.2.1 Búsqueda de proteínas transportadoras y alineamientos**

Según la clasificación taxonómica, se buscaron los parásitos extracelulares representativos dentro de cada phyla protozoa [67]. A partir de los prospectos seleccionados, se realizó una búsqueda de la secuencia de ADN y proteínas transportadoras de NAD<sup>+</sup> en las bases de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), a continuación fueron generados diferentes alineamientos de secuencias proteicas de Transportadores de NAD<sup>+</sup> usando el programa CLC Main Workbench, CLUSTAL-W y T-Coffee [68]–[70].

### **5.2.1.1 Búsqueda y análisis de los candidatos**

Las secuencias consenso se utilizaron en la realización de alineamientos locales (Basic Local Alignment Search Tool - tBLASTn del NCBI) contra los genomas disponibles de parásitos extracelulares, buscando los candidatos a transportadores de NAD<sup>+</sup> de los organismos inicialmente seleccionados. Los candidatos encontrados, se analizaron mediante el predictor de dominios del NCBI y alineamiento múltiple mediante los programas CLC Main Workbench y CLUSTAL-W [68][71]. Adicionalmente, se predijo la localización subcelular de los candidatos a Ndt mediante el servidor DeepLoc-1.0 [35]

### **5.2.1.2 Predicción y acoplamiento molecular de los candidatos a proteínas transportadoras de la familia MCF - Ndt**

Se realizó un modelamiento de estructura terciaria de los candidatos Ndt en el software Robetta, su evaluación se realizó en los programas Ramachandran page y Swiss-model, la optimización de la estructura fue realizada con ModRefiner [44], [72]–[74]. Con las estructuras terciarias de los transportadores de NAD<sup>+</sup> previamente descritos se realizó una superposición con los candidatos usando el programa USFC-Chimera [46]. Para la realización de acoplamientos moleculares se descargó el NAD<sup>+</sup> en la base de datos PubChem [47], optimizándose su estructura con Avogadro[48]. Mediante Autodock-Tools fueron generados los archivos de acoplamiento para las proteínas y el ligando, y se construyó una cuadrícula según la predicción del bolsillo catalítico determinado por el programa DoGSiteScorer [75]. Mediante Autodock Vina se calcularon las energías de unión y los análisis de las interacciones se realizaron usando LigPlot+[49], [50]

## 6. Resultados y discusión

Los resultados y discusiones se presentan según los objetivos propuestos y metodología planteada anteriormente, como se describe a continuación en 2 capítulos.

### 6.1 Aproximación experimental de las NMNATs de *Trichomonas vaginalis*

Con el propósito de cumplir los objetivos “Desarrollar un acercamiento experimental al estudio de la NMNAT de *Trichomonas vaginalis*, a partir de la clonación y expresión de la proteína recombinante”, “Caracterizar la NMNAT de *Trichomonas vaginalis*, mediante análisis de su actividad enzimática” y “Determinar estructuralmente la conformación oligomérica de la NMNAT de *Trichomonas vaginalis*” se realizó la aproximación experimental de dos candidatos a NMNAT en el parásito extracelular *T. vaginalis* identificado en un trabajo previo permitiendo comprender un poco más acerca de los procesos metabólicos de este organismo. Igualmente se realizó la actualización *in silico* de los candidatos a NMNAT.

#### 6.1.1 Aproximación bioinformática

Los candidatos a NMNAT de *Trichomonas vaginalis* fueron identificados en un estudio previo en el LIBBIQ, por lo que a continuación se presenta la actualización bioinformática, señalando las características relevantes de estas isoenzimas [32].

##### 6.1.1.1 Análisis de la estructura primaria de los candidatos TvNMNAT

En la Tabla 6-1 se presentan los códigos de acceso de la NCBI, correspondiente a los candidatos de *T. vaginalis*. En este trabajo, los candidatos se denominaran TvNMNAT1 (XM\_001581372.1) y TvNMNAT2 (XM\_001584480.1) con secuencias de 642 y 630 pb que codifican para isoenzimas de 213 y 209 aa respectivamente, estas proteínas candidato están en el rango característico de esta familia de citidililtransferasas ( 20 – 50 kDa) [16].

*T. vaginalis* aunque es organismo eucariota basal presenta spliceosoma y han sido reportada la presencia de intrones en algunos de sus genes. Cuando se analizan las secuencias génicas de estos candidatos ningún intrón fue identificado, siendo relevante

para los posteriores análisis experimentales [76]. La secuenciación del genoma de *vaginalis* se realizó en 2007 y a la fecha no existe actualización de estos datos, por lo que no es posible identificar en cuál de los 6 cromosomas se encuentran los genes de interés (Tabla 6-1) [77].

**Tabla 6-1. Características *In silico* de los candidatos TvNMNAT.**

	<b>TvNMNAT1</b>	<b>TvNMNAT2</b>
	TVAG_110480 hypothetical protein	TVAG_072070 Cytidylyltransferase family protein
<b>mRNA ID</b>	XM_001581372.1	XM_001584480.1
<b>Prot ID</b>	XP_001581422.1	XP_001584530.1
<b>Tamaño del gen (pb)</b>	642	630
<b>Tamaño de la proteína (aa)</b>	213	209
<b>Peso molecular (kDa)</b>	23.754	23.31
<b>Punto isoeléctrico</b>	5,98	6,42
<b>Exon/Intron</b>	1/0	1/0
<b>Cromosoma</b>	No registrado	No registrado

Mediante análisis bioinformáticos a nivel de estructura primaria, las dos isoenzimas TvNMNAT1 y TvNMNAT2 contienen los dos motivos de unión a ATP [GxFxPx[H/T]xxH] y [SSTxxR] altamente conservados, identificando que el primer motivo (GSFNPTNGH) es idéntico en las dos secuencias y el segundo motivo (SST[F/L]VR) tienen una diferencia en la posición del 4° aminoácido del motivo.

Debido al papel esencial de las NMNAT en el metabolismo energético, se realizó una comparación de la estructura primaria de los candidatos TvNMNAT con sus ortólogos humanos con el propósito de postular a estas enzimas como dianas terapéuticas. Se observó que las HsNMNAT 1 y 2 presentan una secuencia de aminoácidos adicional, posterior al primer motivo de unión a ATP, lo cual se ha asociado con la actividad chaperona en estas proteínas [78].



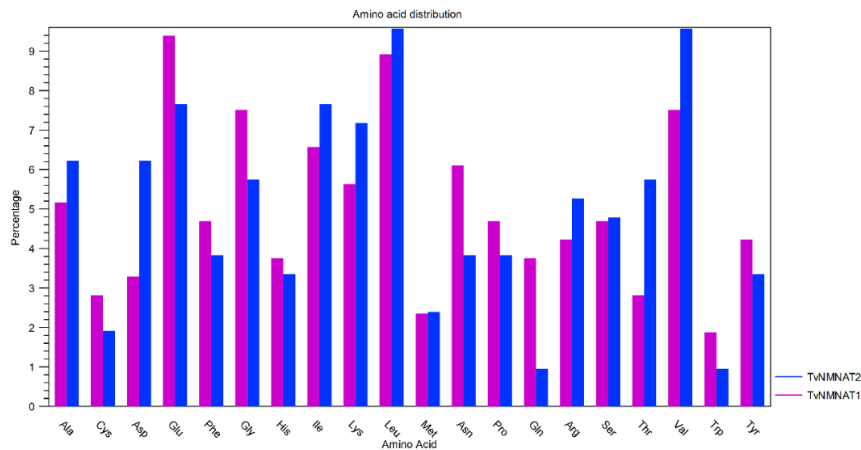
Adicionalmente, se destaca la presencia en las HsNMNAT y TvNMNAT de dos regiones cortas cerca a los sitios activos [ARD] y [CGAD] y los aminoácidos W, I y R hacia la región carboxi-terminal, que se encuentran conservados, posiblemente involucrados en la interacción con los sustratos. En la región amino-terminal se observa la mayor variabilidad entre estas isoenzimas (Figura 6-1). Por otra parte, en alineamientos con NMNAT de otros parásitos se observó variaciones de las secuencias proteicas entre estas isoenzimas fuera de los motivos de unión a ATP y la presencia hacia la región carboxi-terminal de 5 aminoácidos altamente conservados (R, G, D, W, R) (Anexo B).

**Figura 6-1. Alineamiento múltiple de los candidatos a TvNMNAT y sus ortólogos humanos.** Secuencias altamente conservadas en las NMNAT, sitios de unión a ATP (rojo) y regiones conservadas (azul) usando el programa CLC Main Workbench 21.0.3.



De otro lado, estas transferasas presentan un alto porcentaje de leucina (Leu), ácido glutámico (Glu) y valina (Val) siendo estos aminoácidos esenciales para la conformación de hélices alfa y laminas beta. Junto con ello los altos contenidos de Val, Ile y Phe, estos aminoácidos son característicos de proteínas con conformaciones  $\alpha/\beta$  como la familia NMNAT (Tabla 6-2) [79].

**Figura 6-2. Histograma de frecuencia de aminoácidos de TvNMNAT.** Porcentaje de aminoácidos de TvNMNAT1 (Azul) y TvNMNAT2 (Rosado) generado por CLC Main Workbench 21.0.3



La localización subcelular de estas nucleotildiltransferasas ha sido reportada en diferentes compartimientos como núcleo, mitocondria, citoplasma y acoplamiento con Golgi [80]. Al realizar una aproximación con diferentes servidores de localización, se obtienen resultados poco concluyentes ubicando a las TvNMNAT en mitocondria, citoplasma, núcleo o hidrogenosoma (Tabla 6-2). Por tanto, es necesario realizar aproximaciones experimentales como fraccionamiento subcelular o inmunolocalización para definir la ubicación de estas proteínas y su asociación con diferentes procesos metabólicos.

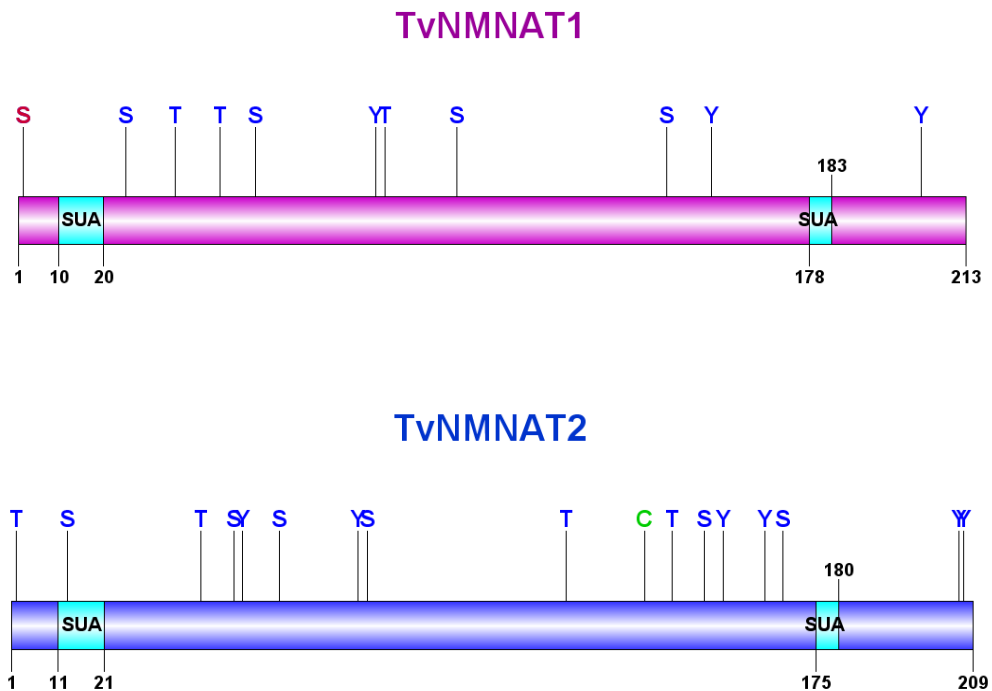
**Tabla 6-2. Predicción de la localización subcelular de los candidatos a TvNMNAT.** Uso de diferentes servidores DeepLoc-1.0, Euk-mPLOC 2.0, iLoc-Animal y COFACTOR.

	<b>TvNMNAT1</b>	<b>TvNMNAT2</b>
DeepLoc-1.0	Mitocondria (0,4854) Citoplasma (0,4085)	Mitocondria (0,502) Citoplasma (0,4145)
Euk-mPLOC 2.0	Núcleo	Citoplasma - núcleo
iLoc-Animal	Núcleo	Citoplasma - núcleo
COFACTOR	Hidrogenosoma (1.00) Citoplasma (0.67) Núcleo (0,57)	Hidrogenosoma (1.00) Citoplasma (0.72) Núcleo (0,56)

Las modificaciones postraduccionales en las NMNAT han sido identificadas permitiendo regular la actividad enzimática y con ello la activación - desactivación proteica o generar interacciones con otras proteínas. Fueron analizadas *in silico* las posibles modificaciones postraduccionales de estas isoenzimas, en donde la TvNMNAT1 presenta 11 posibles sitios de fosforilación (5 serinas, 3 tirosinas y 3 treoninas) donde se resalta la fosforilación

de Thr-36, Ser-99, Tyr-156 y Ser-196 y TvNMNAT2 presentó en 11 posibles sitios de fosforilación (6 serinas, 6 tirosinas y 4 treoninas) con blancos de alta incidencia de Tyr-76 y Tyr-155 con los valores más altos de *Score*. Adicionalmente, se ha observado que la HsNMNAT-2 asociada a Golgi presenta palmitoilación en residuos de cisteína, siendo esta esencial para realizar anclaje a las membranas intracelulares. Esta posible acilación se detectó mediante el programa GPS Palm en la TvNMNAT2 en la Cys-138, lo cual podría explicar una posible regulación y asociación con Golgi [78]. En las predicciones de acetilaciones, se identifica que TvNMNAT1 presenta una acetilación en Ser-2, posiblemente relacionada con estabilidad de complejos oligoméricos y en procesos de degradación. En las NMNAT de *S. cerevisiae* se ha determinado que las dos isoformas de este organismo pueden acetilarse y asociarse para formar tetrámeros (Figura 6-3) [81].

**Figura 6-3. Predicción de posibles sitios de modificaciones postraduccionales de los candidatos a TvNMNAT.** (A) TvNMNAT1 (B) TvNMNAT2. Azul: Fosforilaciones (NetPhos 3.1). Morado: Acetilaciones (NetAcet 1.0). Verde: Palmitoilaciones (GPS Palm). SUA: Sitio de unión a ATP. Realizado en el programa GPS5.0.

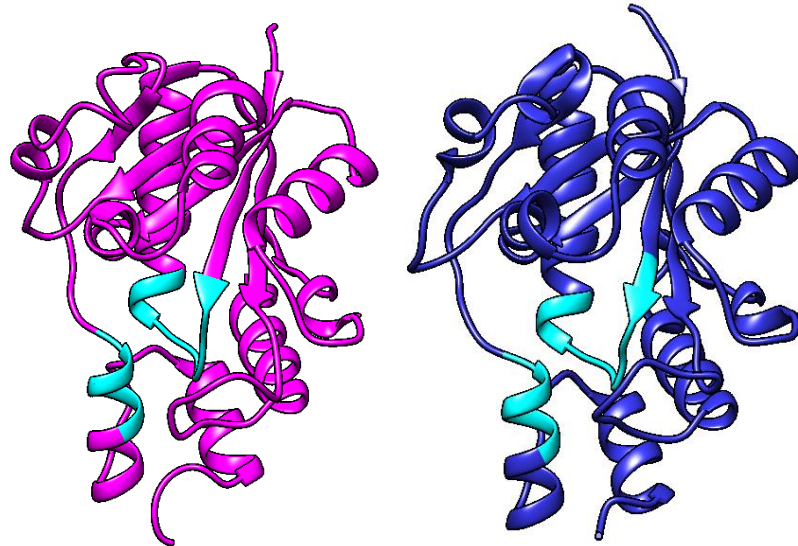


### 6.1.1.2 Análisis de la estructura secundaria y terciaria de los candidatos TvNMNAT

La estructura secundaria de las proteínas candidato fue analizada mediante el servidor PSIPRED, donde se determinaron las disposiciones e interacciones a nivel espacial. La estructura secundaria del candidato TvNMNAT1 está conformada por 9 hélices  $\alpha$  (38,96%) y 6 láminas  $\beta$  (13,61%), en donde los sitios de unión ATP se ubican en la primera y octava hélice  $\alpha$ . El candidato TvNMNAT2 presenta 7 hélices  $\alpha$  (13,39%) y 5 láminas  $\beta$  (52,17%) y los motivos de unión a ATP se encuentran en la primera y sexta hélice  $\alpha$  [82]. Adicionalmente, TvNMNAT1 contiene dos hélices  $\alpha$  y una lámina  $\beta$  más que TvNMNAT2. Estas diferencias estructurales son esenciales para comprender los procesos de catálisis, regulación y localización subcelular, como en el caso de otras isoenzimas humanas donde sus características estructurales están asociadas con afinidad por sustratos y otras funciones como chaperonas.

A nivel de estructura terciaria, estos candidatos se modelaron mediante el servidor I-TASSER generando un modelo por homología. Las dos proteínas TvNMNAT modeladas se caracterizan por presentar el plegamiento tipo Rossmann  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ , motivo canónico de las proteínas de unión a nucleótidos como la familia citidiltransferasas, la cual presenta las láminas betas en el centro de la enzima rodeadas por hélices alfas [17]. Debido a su interacción con el NAD<sup>+</sup>, el pliegue  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  es el más conservado debido a la interacción con los grupos fosfato del ATP, estructura esencial para la actividad catalítica de las enzimas [83]. Mediante el servidor MofRefiner se realizó el refinamiento estructural y la validación de los modelos mediante plot de Ramachandran, donde se presenta que el 99,45% y 97,861% de los aminoácidos están en regiones permitidas. Adicionalmente, se señalan los sitios de unión a ATP a nivel tridimensional, siendo estos próximos para los acoples moleculares con los sustratos como se observa en la Figura 6-4 [44], [84].

**Figura 6-4. Modelamiento de los candidatos a TvNMNAT identificando los motivos de unión a ATP.** TvNMNAT1(Magenta), TvNMNAT2(Azul) y Motivos de unión a ATP (Cyan). Generados por el servidor I-TASSER y refinados por MofRefiner. Visualizadas por el programa USFC-Chimera. Valores de los aminoácidos en las regiones permitidas generadas por el plot de Ramachandran.



<b>Aminoácidos en regiones permitidas</b>	184 99,45%	183 97,861%
---	---------------	----------------

Los análisis *in silico* permitieron determinar que estos candidatos TvNMNAT presentan la secuencia y estructura características de NMNATs por lo que para complementar esta caracterización, mediante COFACTOR se predijo la interacción con el ATP y actividad enzimática con NMN y NaMN, lo cual es relevante para comprender como podrían modular su función según la disponibilidad de su sustrato (Tabla 6-3). La comparación tridimensional de las TvNMNAT con sus ortólogos humanos es relevante en la búsqueda de blancos quimioterapéuticos. La HsNMNAT2 presenta mayor similitud estructural con las candidatas, esta enzima presenta como sustrato el NMN y su localización es citosólica con acoplamiento con golgi [80]. La superposición de la TvNMNAT1 con la HsNMNAT2 muestra un RMSD de 0,969 Å y con la TvNMNAT2 de 0,664 Å mostrando una alta similitud entre estas isoenzimas (Figura 6-5).

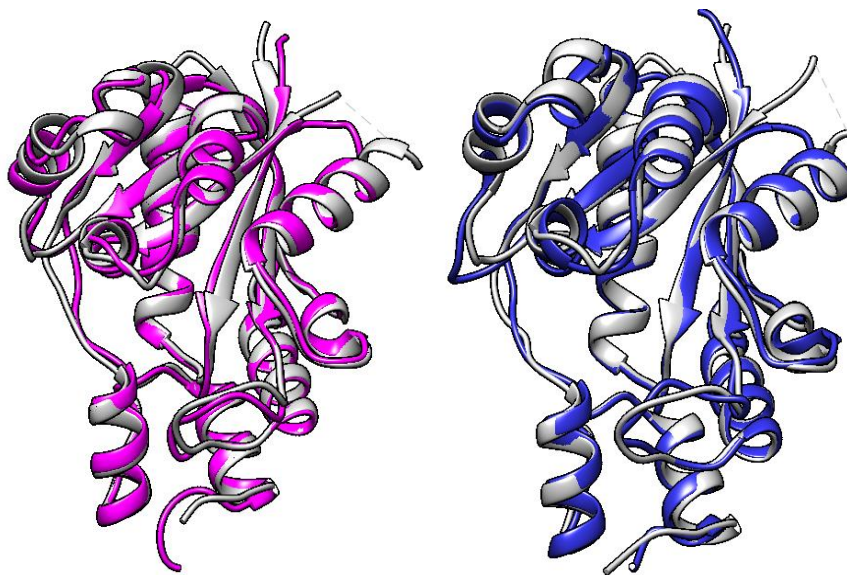
La comparación de las NMNAT humanas muestra regiones adicionales a comparación de las TvNMNAT, siendo las candidatas más compactas, pero con secuencias diferentes, siendo esencial para su uso a nivel de diagnóstico. Por tanto, se resalta que estas TvNMNAT mantienen la estructura esencial, por lo cual no podrían usarse como un

blanco quimioterapéutico a nivel estructural, pero es necesario analizar la actividad catalítica de estas enzimas, siendo este un posible blanco para tratamiento de la parasitemia generada por *T. vaginalis*.

**Tabla 6-3. Predicción de función molecular de TvNMNAT.** Generada por el servidor COFACTOR [38].

Función	TvNMNAT1	TvNMNAT2
Unión a ATP	1	1
Actividad nicotinamida-nucleótido Adenililtransferasa	1	0,99
Actividad nicotinato- nucleótido adenililtransferasa	0,96	0,96

**Figura 6-5. Superposición de los candidatos TvNMNAT con la isoforma HsNMNAT2 (PBD:1nup)** Candidato TvNMNAT1 (Izquierda-Magenta), Candidato TvNMNAT2 (Derecha- Azul) HsNMNAT2 (Gris). Generado por el servidor I-TASSER. Visualizadas con el programa USFC-Chimera. RMSD plantilla 1nup de 0.969 Å con 177 pares de átomos con TvNMNAT1 y 0,664 Å con 196 pares de átomos con la TvNMNAT2.



Teniendo en cuenta los anteriores resultados *in silico*, los candidatos a TvNMNAT se usaron para realizar una aproximación de la interacción con los sustratos que presentan estas proteínas.

### 6.1.1.3 Acoplamiento molecular (Docking) de las TvNMNAT con sus sustratos.

El acoplamiento molecular de las proteínas TvNMNAT se realizó con los sustratos ATP, NMN y NaMN en el programa Auto-Dock Vina. Los resultados generados muestran que las dos isoenzimas presentan la mayor afinidad por el ATP con valores de energía de unión de -7,9 y -7 kcal/mol, presentando interacción con el motivo de unión a ATP, para TvNMNAT1 Ser-12, His-20, Thr-17 y Ser-179 y TvNMNAT2 Ser-13, His-21, Ser-176 y Thr-177, estos residuos se encuentran involucrados en interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno (Figura 6-6). Los residuos de Histidina presentados tienen interacción con el grupo fosfato del ATP, como ha descrito para HsNMNAT asociado con el  $\beta$ -fosfato [85].

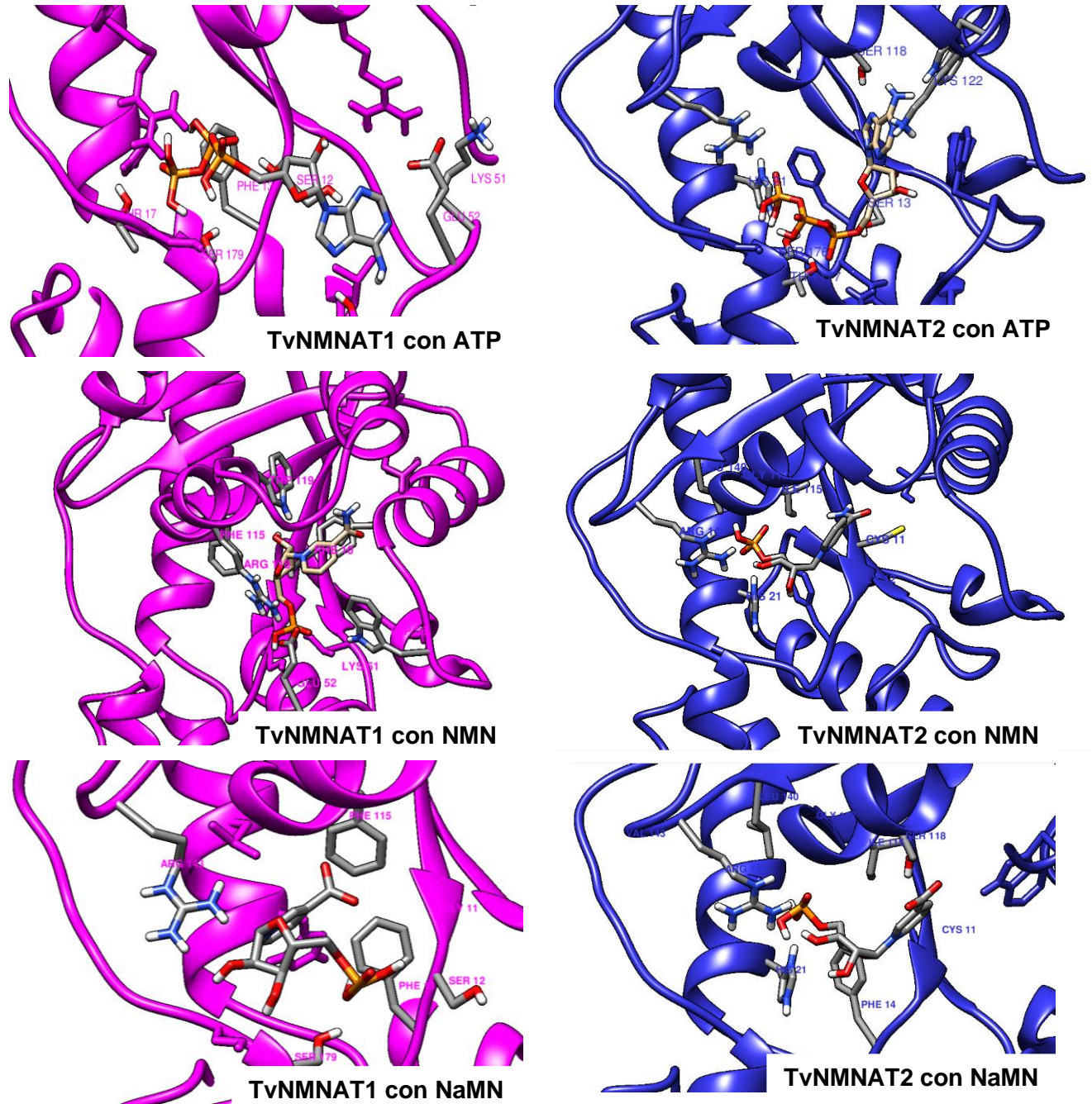
El NMN presenta energías de unión con la TvNMNAT1 de -6,7 kCal/mol y TvNMNAT2 de -6,8 kCal/mol, indicando interacción con este sustrato. En la HsNMNAT2 se ha reportado una fenilalanina del primer sitio de unión a ATP, asociada con el mononucleótido mediante el grupo amida de la cadena principal del aminoácido mediante una molécula de agua. En este acoplamiento molecular no se utilizaron moléculas de agua, lo cual pudo generar algunas diferencias con respecto a lo reportado por cristalografía HsNMNAT2, según nuestros resultados los residuos Phe-13 y Phe-14 respectivamente para cada TvNMNAT, podrían presentar interacciones hidrofóbicas con este sustrato [86].

El tercer sustrato evaluado fue NaMN, donde las energías de unión son de -6,5 y -6,4 kCal/mol, en la interacción con este sustrato se encuentran los aminoácidos Gly y Phe del primer motivo de unión a ATP junto con los residuos Arg-143 y Arg-142 respectivamente para cada una de las NMNAT candidatas, estos últimos son altamente conservados en los alineamientos múltiples con las HsNMNAT (Figura 6-1) y en los reportados de protozoos de vida libre y parasítica [32].

En la Tabla 6-4. **Puntuaciones de acoplamiento predichas e interacciones de sustratos con las TvNMNAT.** Docking molecular realizado con Auto-Dock Vina. Interacciones visualizadas por LigPlot+[49], [50]. son presentados diversos residuos que interactúan con los sustratos analizados. Se destaca que los residuos de los motivos de unión a ATP [GxFxPx[H/T]xxH] y [SSTxxR] se encuentran en cada uno de los acoplamientos generados, corroborando que estas secuencias altamente conservadas

son esenciales para la actividad catalítica de la enzima e interacción con diferentes moléculas.

**Figura 6-6. Acoplamiento molecular entre las proteínas TvNMNAT con los sustratos ATP, NMN y NaMN.** Acoplamiento molecular generado por Auto-Dock Vina. Visualizados con el programa USFC-Chimera.





**Tabla 6-4. Puntuaciones de acoplamiento predichas e interacciones de sustratos con las TvNMNAT.** Docking molecular realizado con Auto-Dock Vina. Interacciones visualizadas por LigPlot+[49], [50].

Candidato	Sustrato	Energía de unión (kCal/mol)	Residuos que interactúan	
			Puente de hidrógeno	Hidrofóbicas
TvNMNAT1	ATP	-7.9	Ser-12, Thr-17, Lys-51, Glu-52, Ser-54, Val-77, Ser-179	Gly-11, Ser-12, Phe-13, His-20, Lys-51, Glu-52, Ser-54, Leu-56, Phe-115, Val-177, Ser-179.
	NMN	-6.8	Glu-52, Val-91, Arg-118	Phe-13, Thr-46, Lys-51, Trp-88, Arg-90, Phe-115, Trp-119
	NaMN	-6.5	Ser-12, Arg-143, Ser-178	Met-9, Gly-11, Phe-13, Thr-17, Leu-23, Val-177, Phe-115, Ser-179
TvNMNAT2	ATP	-7.0	Ser-13, His-21, Ser-176, Thr-177, Ser-118, Lys-122, Trp-123	Gly-12, Ser-13, His-21, Ser-118, Ser-176, Thr-177.
	NMN	-6.7	His-21, Gly-112, Arg-142	Cys-11, Gly-12, Phe-14, Ala-24, Val-111, Ile-115, Leu-140.
	NaMN	-6,4	His-21, Gly-112, Ser-118, Arg-142.	Cys-11, Gly-12, Phe-14, Gly-112, Ile-115, Leu-140

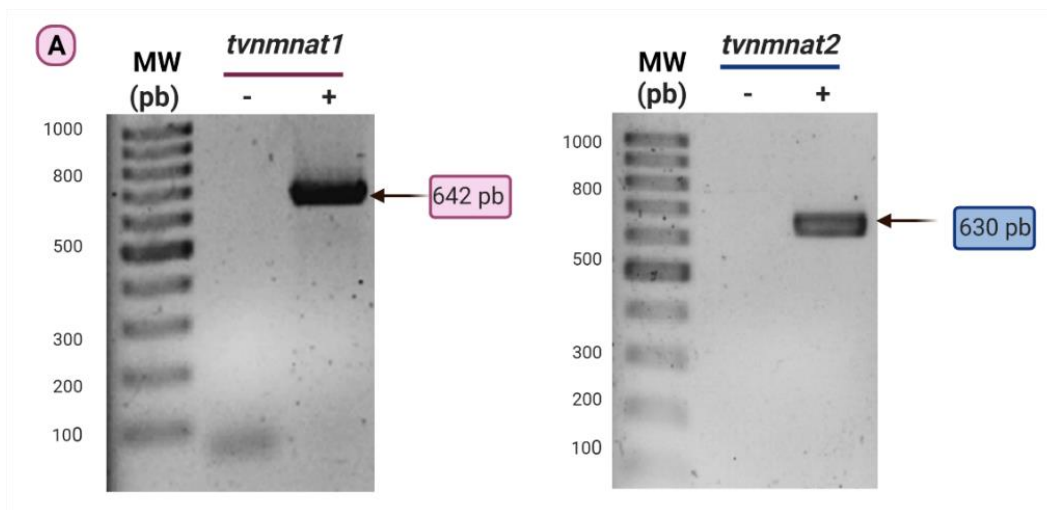
## 6.1.2 Aproximación experimental

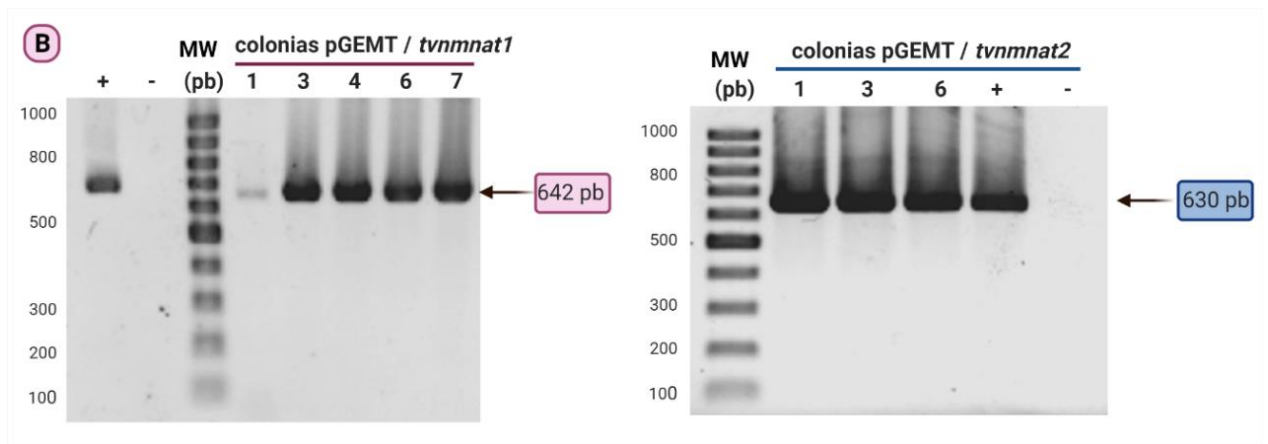
Con el propósito de comprender los procesos de biosíntesis del NAD<sup>+</sup> en parásitos extracelulares, se eligió modelo *Trichomonas vaginalis*. En este parásito, los candidatos a TvNMNAT1 y TvNMNAT2 evaluados *in silico* presentan las características típicas de las nucleotidiltransferasas. Con el fin de verificar la identidad de estas proteínas, se realizó una aproximación experimental de estas enzimas. Generando para ello proteínas recombinantes y evaluando su actividad enzimática. En los siguientes apartados, se presentan los resultados y análisis correspondientes.

### 6.1.2.1 Construcción del vector recombinante pGEMT-*tvnmnat*

Para la construcción de los vectores recombinantes se partió del genoma de *Trichomonas vaginalis* para la amplificación de las regiones codificantes *tvnmnat1* y *tvnmnat2* con los primers (Tabla 5-1), como se observa en la Figura 6-7-A correspondiente a los tamaños de 642 y 630 pb. Posteriormente, se realizó la clonación de los genes de interés en el vector de mantenimiento pGEMT-Easy, rastreando las colonias mediante PCR y finalmente se realizó la extracción del plásmido mediante lisis alcalina (Figura 6-7).

**Figura 6-7. Clonación de las secuencias candidato *tvnmnat1* y *tvnmnat2* en el vector pGEM T-Easy.** A) Amplificación de la secuencia codificante *tvnmnat1* y *tvnmnat2* mediante PCR a partir del ADNg *T. vaginalis*. B) Identificación de pGEMT/*tvnmnat1* y pGEMT/*tvnmnat2* mediante PCR de colonia. 2  $\mu$ L Marcador de peso 100 pb y 1 kb. Electroforesis de agarosa 1% (p/v) en 0.5 X TBE, se visualizó con bromuro de etidio.





### 6.1.2.2 Estimación *in silico* de la solubilidad de TvNMNAT

Las NMNATs son proteínas globulares que han sido expresadas en la fracción soluble para su análisis y caracterización enzimática. Teniendo en cuenta esta característica, se realizó una predicción bioinformática usando diferentes vectores y etiquetas como se muestra en la Tabla 6-5. Los resultados no son concluyentes para expresión de las TvNMNAT en diferentes vectores, debido a la divergencia de los servidores utilizados. Se resalta que la herramienta Soluprot, está diseñada para la predicción de proteínas solubles en el sistema heterólogo *E. coli*, considerando las limitaciones en la producción de diversas proteínas en este sistema. Se señala que la mayor solubilidad de las proteínas TvNMNAT se puede presentar por la adición de las etiquetas 6xHis y SUMO en la construcción de las proteínas recombinantes, por lo cual para este trabajo se seleccionó el vector pET SUMO para la expresión en *E. coli* [87], [88].

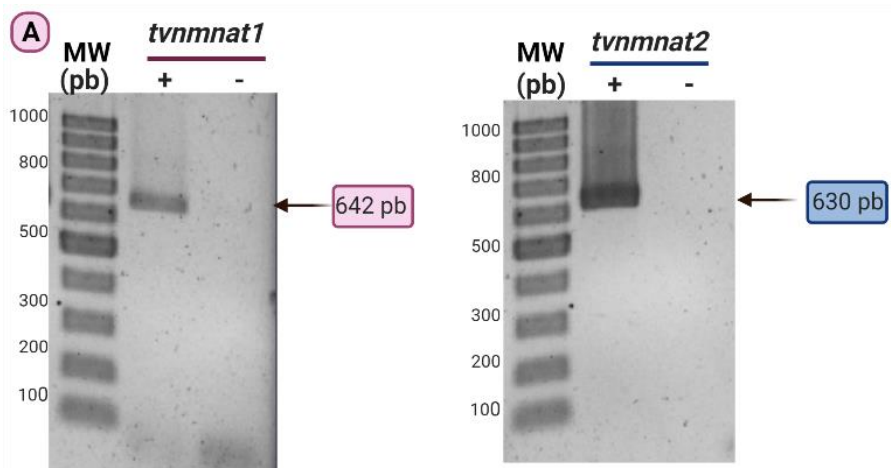
**Tabla 6-5. Predicción *in silico* de la solubilidad de las proteínas recombinantes TvNMNAT usando los programas SCRATCH, Protein-Sol y Soluprot.**

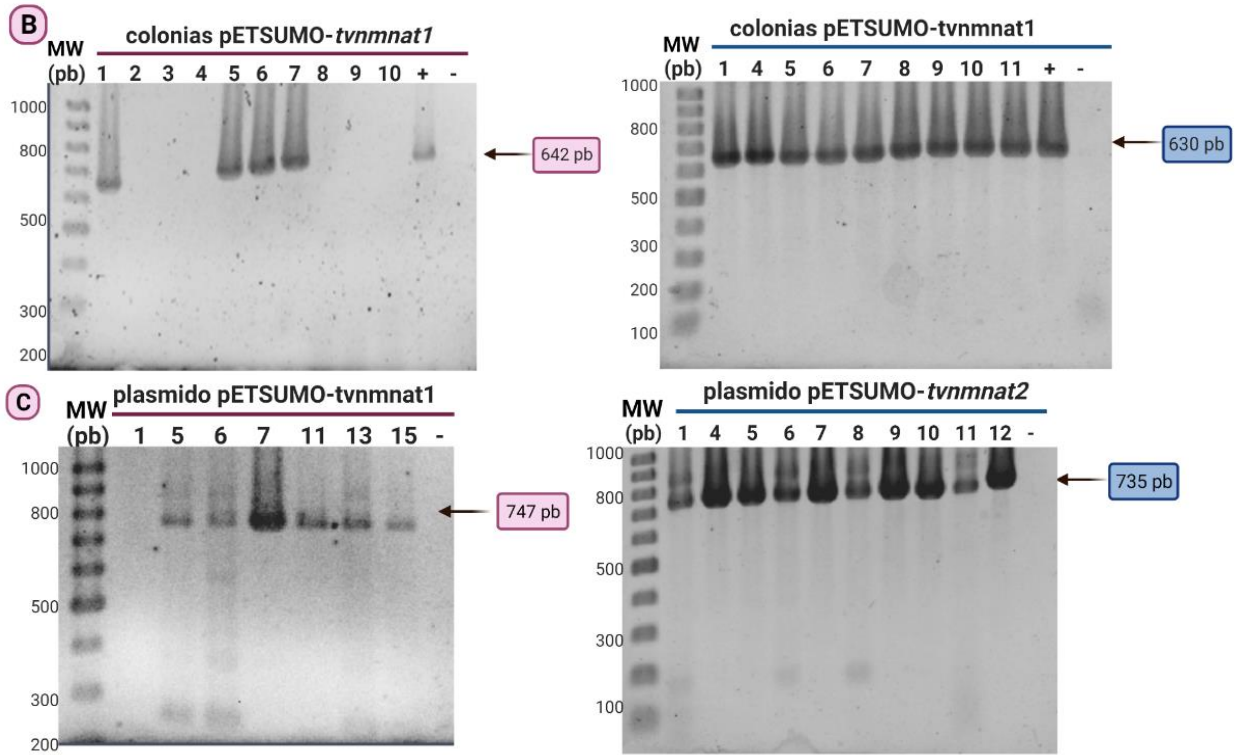
	SCRATCH	Protein-Sol	Soluprot
<b>TvNMNAT1</b>	Insoluble 0.624990	0,509	Soluble 0,568
<b>6xHis-TvNMNAT1 / pET100 D-TOPO</b>	Insoluble 0.687330	0,552	Soluble 0,544
<b>6xHis-SUMO-TvNMNAT1 pET-SUMO</b>	Insoluble 0.583559	0,525	Soluble 0,910
<b>TvNMNAT2</b>	Insoluble 0.699776	0,501	Insoluble 0,422
<b>6xHis-TvNMNAT2 pET100 D-TOPO</b>	Insoluble 0.638582	0,565	Insoluble 0,494
<b>6xHis-SUMO-TvNMNAT2 pET-SUMO</b>	Soluble 0.525642	0,583	Soluble 0,918

### 6.1.2.3 Construcción del vector recombinante pET-SUMO-*tvnmnat*

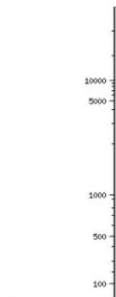
Teniendo en cuenta la disponibilidad del material genómico, fue utilizada como plantilla el vector pGEMT-*tvnmnat* para la amplificación de los insertos *tvnmnat1* y *tvnmnat2* (Figura 6-8-A), en donde se empleó *Taq* polimerasa en la amplificación con el propósito de adicionar una adenina en el extremo 3', necesario para la ligación en el vector TA pET-SUMO. El producto de ligación se transformó por choque térmico en células competentes *E. coli* TOP10. Los transformantes obtenidos (15 y 11 colonias) fueron evaluadas por PCR identificando 7 y 11 colonias positivas, respectivamente (Figura 6-8-B). El vector pETSUMO presenta el promotor T7, el cual está regulado por la polimerasa T7, generando un sistema eficiente con reducida autoinducción.

**Figura 6-8. Clonación de las secuencias candidato *tvnmnat1* y *tvnmnat2* en el vector pET-SUMO. A)** Amplificación de la secuencia codificante *tvnmnat1* y *tvnmnat2* a partir del vector pGEMT/ *tvnmnat* . **B)** Identificación de colonias pETSUMO/*tvnmnat1* y pETSUMO/*tvnmnat2* mediante PCR **C)** Evaluación de direccionalidad de los plásmidos pETSUMO-*tvnmnat* mediante PCR **D)** Identificación de pETSUMO/*tvnmnat1* por digestión *EcoRV* y pETSUMO/*tvnmnat2* por digestión con *EcoRI*.



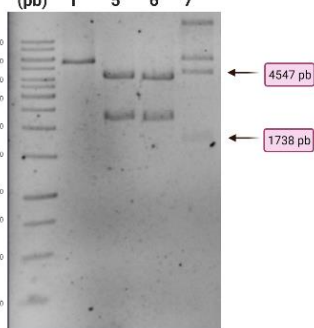


**D** Perfil de digestión pETSUMO-tvnmnat1 con EcoRV



#	Termina	Coordenadas	Longitud (pb)
1	EcoRV-EcoRV	760-5306	4547
2	EcoRV-EcoRV	5307-759	1738

**Digestión pETSUMO-tvnmnat1**

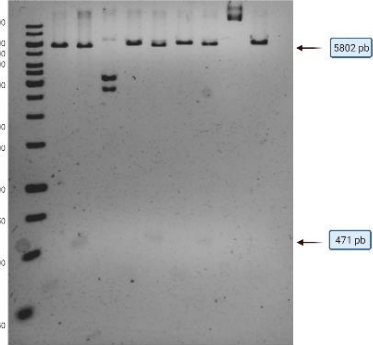


Perfil de digestión pETSUMO-tvnmnat2 con EcoRI



#	Termina	Coordenadas	Longitud (pb)
1	EcoRI-EcoRI	1043-571	5802
2	EcoRI-EcoRI	572-1042	471

**Digestión plasmido pETSUMO-tvnmnat2**



Obtenidos los plásmidos de las colonias positivas por lisis alcalina, se evaluó la direccionalidad del vector pET-SUMO, ya que se presentan variaciones en el sentido del gen de interés durante el proceso de ligación. De esta manera, la direccionalidad del vector fue evaluada mediante la amplificación de la región SUMO y el inserto, llevando a un aumento de 105 pb, permitiendo determinar que 6 colonias de *tvnmnat1* y 10 colonias de *tvnmnat2* de 747 y 735 pb, respectivamente presentan el inserto con la dirección correcta (Figura 6-8-C). Por otra parte, los plásmidos recombinantes fueron evaluados mediante digestión enzimática, empleando EcoRV con pETSUMO-*tvnmnat1*, observando que el plásmido 7 presenta el patrón de digestión de dos bandas de 1738 y 4547 pb. De otro lado, pETSUMO-*tvnmnat2* fue digerido con EcoRI, los plásmidos 1, 7 y 9 presentaron el patrón de corte de 471 y 5802 pb (Figura 6-8-D). Los resultados fueron consistentes con las predicciones de cortes de digestión realizadas en el servidor NEB-CUTTER con las secuencias de pETSUMO-*tvnmnat1* y pETSUMO-*tvnmnat2*, lo cual indica que los constructos generados presentan una identidad con lo predicho a nivel bioinformático.

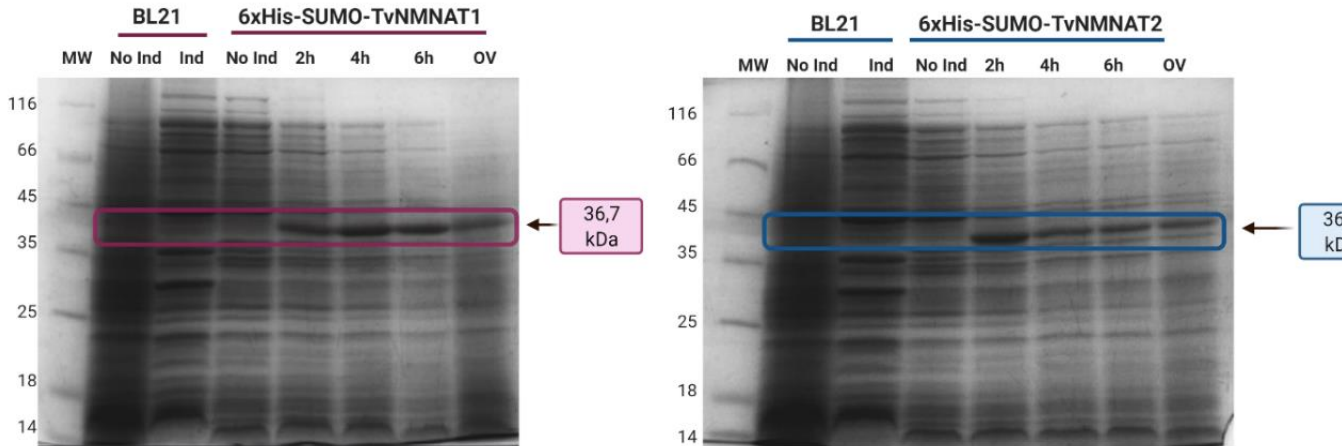
#### 6.1.2.4 Expresión de las proteínas recombinantes 6xHis-SUMO-TvNMNATs

La expresión de las 6xHis-SUMO-TvNMNATs se realizó empleando el sistema heterólogo *E.coli* BL21(D3). Las proteínas recombinantes obtenidas presentan una etiqueta de 6xHis y SUMO en el extremo N-terminal, que aumenta su tamaño en 13 kDa. Así, TvNMNAT1 y TvNMNAT2 que peso molecular de 23,7 y 23,3 kDa característico de estas enzimas y tendrán un peso esperado de 36,7 y 36,3 kDa respectivamente. La adición de las etiquetas en el extremo N-terminal se llevó a cabo considerando la mayor variabilidad de estas enzimas en esta región y la escasa interferencia con el sitio catalítico, como se ha verificado en otras NMNAT recombinantes expresadas previamente.

La expresión de las proteínas bajo diferentes condiciones de inducción permitió identificar bandas correspondientes a las proteínas esperadas de 36,7 kDa (TvNMNAT1) y 36,3 kDa (TvNMNAT2) en extractos proteicos totales a los diferentes tiempos de inducción, en relación con el control BL21 (D3) no transformado y con la cepa transformada sin inducir. En este escenario 6xHis-SUMO-TvNMNAT1 presenta una mayor expresión a las 4 horas de inducción y 6xHis-SUMO-TvNMNAT2 a las 2 horas (Figura 6-9). Estas diferencias de expresión pueden estar dadas por las secuencias proteicas de los dos candidatos, siendo

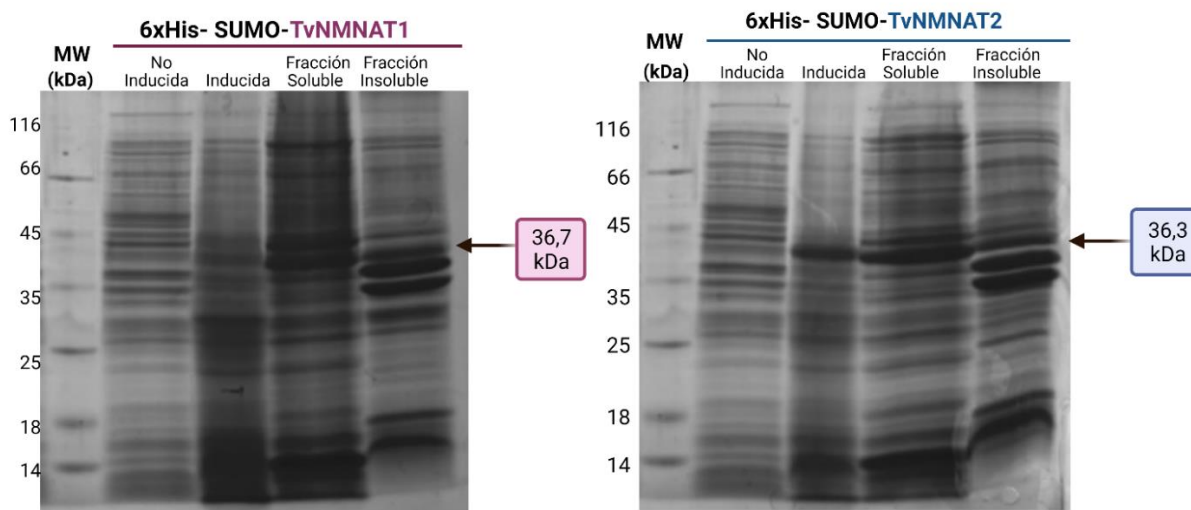
estas posiblemente susceptibles a proteasas que degradan las regiones N- o C-terminal llevando a la degradación proteolítica [89].

**Figura 6-9. Tiempos de expresión de 6xHis-SUMO-TvNMNATs.** Candidato TvNMNAT1 (Izquierda). Candidato TvNMNAT2 (Derecha). Tiempos de inducción 2, 4, 6 horas y overnight a 37°C, 0.5 mM IPTG, 1% glucosa. No ind: No inducidas, Ind: Inducidas, OV: Overnight. Marcador de peso de 14,4 – 116 kDa (Thermo Scientific) Electroforesis SDS-PAGE 12%, revelado en azul de Coomassie R-250.



Por medio de fraccionamiento celular, se determinó una mayor cantidad de las recombinantes en la fracción soluble a 4 horas (TvNMNAT1) y 2 horas (TvNMNAT2) de inducción, siendo este proceso promovido por la adición de la etiqueta SUMO, ubicada en el extremo N-terminal, debido a que SUMO promueve el adecuado plegamiento y la estabilidad estructural en la proteína de interés en contraste a proteínas que no presentan esta etiqueta (Figura 6-10). Por otra parte, en el sistema bacteriano *E. coli* se han generado los mejores niveles de expresión con proteínas fusionadas a la etiqueta SUMO, ya que no se procesa como en sistemas eucariotas por la ruptura de enlaces pépticos entre la proteína de interés y SUMO [90], [91]. De esta manera, el vector pET-SUMO es un sistema de expresión promisorio para las NMNAT, permitiendo obtener la mayor cantidad de proteína de interés en la fracción soluble para su posterior purificación y análisis enzimáticos considerando la baja solubilidad y por tanto rendimiento en NMNAT recombinantes obtenidas previamente en nuestro grupo [4]–[6].

**Figura 6-10. Fraccionamiento celular de 6xHis-SUMO-TvNMNATs.** Candidato TvNMNAT1 (Izquierda). Candidato TvNMNAT2 (Derecha). Inducción 4 h (TvNMNAT1) - 2 horas (TvNMNAT2) a 37°C, 0,5 mM IPTG, 1% glucosa . Marcador de peso de 14,4 – 116 kDa (Thermo Scientific) Electroforesis SDS-PAGE 12%, revelado en azul de Coomassie R-250.

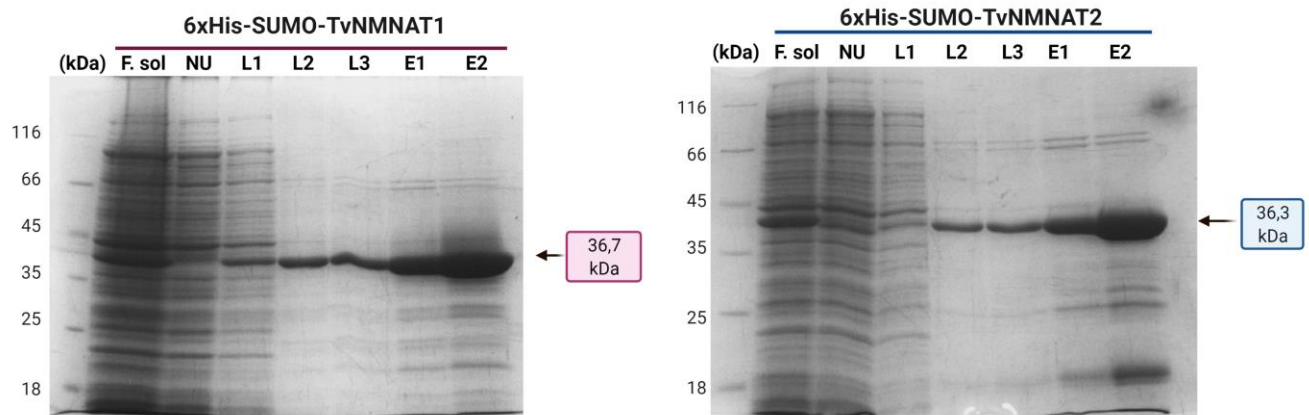


#### 6.1.2.4 Purificación de las proteínas recombinantes 6xHis-SUMO-TvNMNAT

Teniendo en cuenta la expresión mayoritaria de 6xHis-SUMO-TvNMNAT en la fracción soluble, se realizó la purificación mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC), a partir de esta fracción como se describe en el numeral 5.1.2.7. La etiqueta de polihistidinas media la interacción con la resina Cobalt Agarose Beads (Gold Bio) y permite una adecuada purificación. Se empleó esta resina de unión a cobalto, por generar menos interacciones inespecíficas en contraste con resinas de Níquel que han sido usadas para la purificación de otras NMNAT [6][59]. Las 6xHis-SUMO-TvNMNAT se purificaron de manera parcial, optimizando las condiciones de la IMAC previstas en el protocolo para evitar la pérdida de la proteína en los lavados, para lo cual se realizaron lavados con 10 mM y 25 mM de imidazol retirando proteínas no unidas a la resina y también con el propósito de minimizar la pérdida de la enzima de interés; la elución de las proteínas se realizó con 150 mM y 200 mM de imidazol (Figura 6-11).

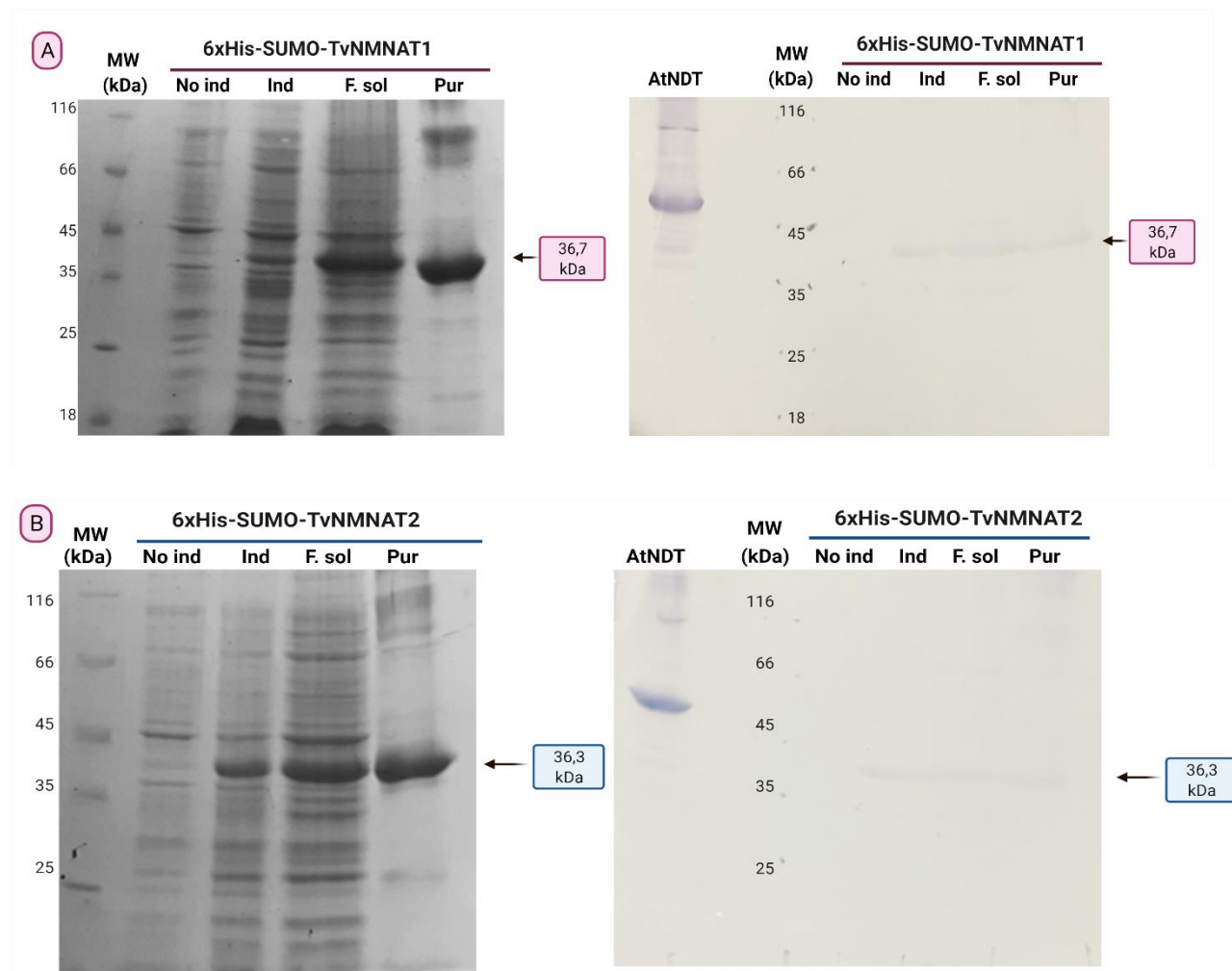


**Figura 6-11. Purificación de las proteínas recombinantes 6xHis-SUMO-TvNMNAT mediante IMAC.** Purificación de la proteína 6xHis-SUMO-TvNMNAT1 (*Izquierda*). Purificación de la proteína 6xHis-SUMO-TvNMNAT2 (*Derecha*). **F. sol:** Fracción soluble de partida. **NU:** Proteínas no unidas a la resina. **L1:** Lavado con 10 mM Imidazol. **L2 – L3:** Lavado con 25 mM **E1:** Eluido con 150 mM de Imidazol **E2:** Eluido con 200 mM de Imidazol. Marcador de peso de 14,4 – 116 kDa (Thermo Scientific) Electroforesis SDS-PAGE 12%, revelado en azul de Coomassie R-250.



La optimización de las condiciones de la purificación permitió obtener una alta concentración de las proteínas recombinantes parcialmente puras como se muestra en la Tabla 6-6. Finalmente, se realizó un proceso de diálisis para remover la alta concentración imidazol en la solución. La presencia de bandas adicionales de alrededor de 18, 25 y 80 kDa corresponden a una desnaturalización incompleta de la proteína y productos de degradación, como se verifica por la detección de anticuerpos 6xHis y 6xHis-SUMO-TvNMNAT (Figura 6-12, Figura 6-23). Adicionalmente, algunas copurificaciones puede generarse con proteínas de unión a metales divalentes y proteínas con alta cantidad de histidinas en su superficie [92].

**Figura 6-12. Optimización de la purificación de las proteínas recombinantes 6xHis-SUMO-TvNMNAT** **A)** Purificación de la proteína 6xHis-SUMO-TvNMNAT1. **B)** Purificación de la proteína 6xHis-SUMO-TvNMNAT2 **No Ind:** BL21 con plásmido recombinante no inducido. **Ind:** BL21 con plásmido recombinante inducido. **F. sol:** Fracción soluble. **Pur:** Eluido con 150 mM de Imidazol. **AtNDT:** Control de inmunodetección con transportador de NAD<sup>+</sup> de *A. thaliana*. Marcador de peso de 14,4 – 116 kDa (Thermo Scientific) Electroforesis SDS-PAGE 12%, revelado en azul de Coomassie R-250. Inmunodetección, membrana de nitrocelulosa,  $\alpha$ -6xHis 1:5000,  $\alpha$ -mouse fosfatasa alcalina 1:10000.



En la tabla 6-5 se presentan los datos relacionados a la eficiencia de la purificación de las proteínas recombinantes. A partir de 100 mL de cultivo inducido, se obtuvieron 0,75 mL de TvNMNAT1 con una actividad específica de 0,0572 UI/mL y 1,25 mL para la TvNMNAT2 con 0,1333 UI/mL. Las diferencias podrían corresponder a las condiciones

de inducción empleadas 4 y 2 horas respectiva e igualmente a una mayor estabilidad de la TvNMNAT2.

**Tabla 6-6. Rendimiento de purificación de las proteínas recombinantes 6xHis-SUMO-TvNMNAT.** Inducción 100 mL de medio LB, 1% Glucosa, 0,5 mM IPTG.

Proteína	Fracción	[ ] (mg/mL)	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total (UI)	Actividad específica		% Rendimiento	Factor de purificación
						(UI/mg)	(UI/mL)		
TvNMNAT1	Lisado	15,02	3,00	45,06	0,1143	0,0025		100,00	
	Eluido	4,21	0,75	3,16	0,0429	0,0136	0,0572	37,50	5,35
TvNMNAT2	Lisado	9,25	4,00	37,00	0,4571	0,0124		100,00	
	Eluido	6,03	1,25	7,54	0,1667	0,0221	0,1333	36,46	1,79

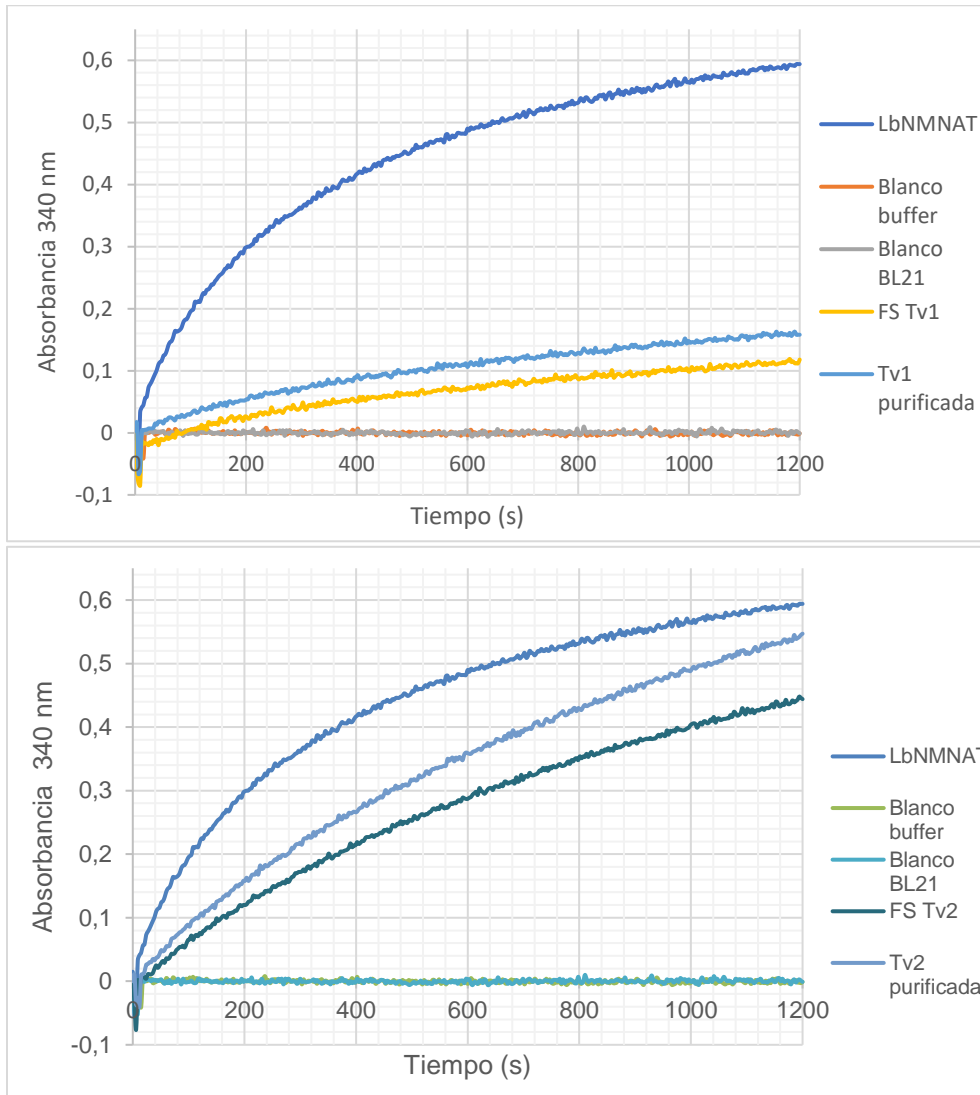
La identidad de las recombinantes TvNMNAT1 y TvNMNAT2 se comprobó midiendo la cantidad de dinucleótido de nicotinamida y adenina, producido mediante ensayos acoplados a alcohol deshidrogenasa (ADH) y ensayos directos (HPLC). En esta aproximación experimental, fueron usados ensayos enzimáticos acoplados en donde ocurren dos reacciones, en la primera reacción el NMN con ATP interactúan mediante la actividad catalítica de NMNAT generando NAD<sup>+</sup>, posterior ocurre la segunda reacción donde el NAD<sup>+</sup> con EtOH se reduce en NADH y acetaldehído mediante la ADH. La generación de NADH se monitorea mediante espectrofotometría a 340 nm. Como control positivo de reacción fue usada la NMNAT de *Leishmania braziliensis* y como control negativo, el buffer fosfatos en el cual se encuentran las proteínas recombinantes. Adicionalmente, se usaron los extractos solubles del sistema heterólogo *E.coli* BL21 (D3) demostrando que no manifiestan una actividad NMNAT. Los resultados indican que los dos candidatos presentan la actividad transferasa, perteneciendo a la familia citidililtransferasa (E.C. 2.7.7.1) debido al uso como sustrato de NMN / NaMN.

Al realizar una comparación de las enzimas recombinantes bajo las condiciones empleadas (pH 7.5, 20°C y NMN como sustrato) la TvNMNAT2 presentó mayor actividad que TvNMNAT1. Lo cual podría asociarse a diferencias de afinidad al sustrato o características estructurales específicas de las enzimas que modulan diferencialmente la reacción como se ha observa en las NMNATs de otros organismos (Figura 6-13) [93].

Las isoenzimas recombinantes TvNMNATs presentan rendimientos de 37,5 y 36,46 % respectivamente, al contrastarlo con otras NMNATs recombinantes producidas en nuestro grupo, muestran rendimientos de purificación de 5,43 % (6xHis-LbNMNAT) y

77,06% (MBP-PfNMNAT), estos datos presentan una alta variación en la solubilidad de las proteínas relacionado principalmente con las etiquetas adicionadas [6], [88].

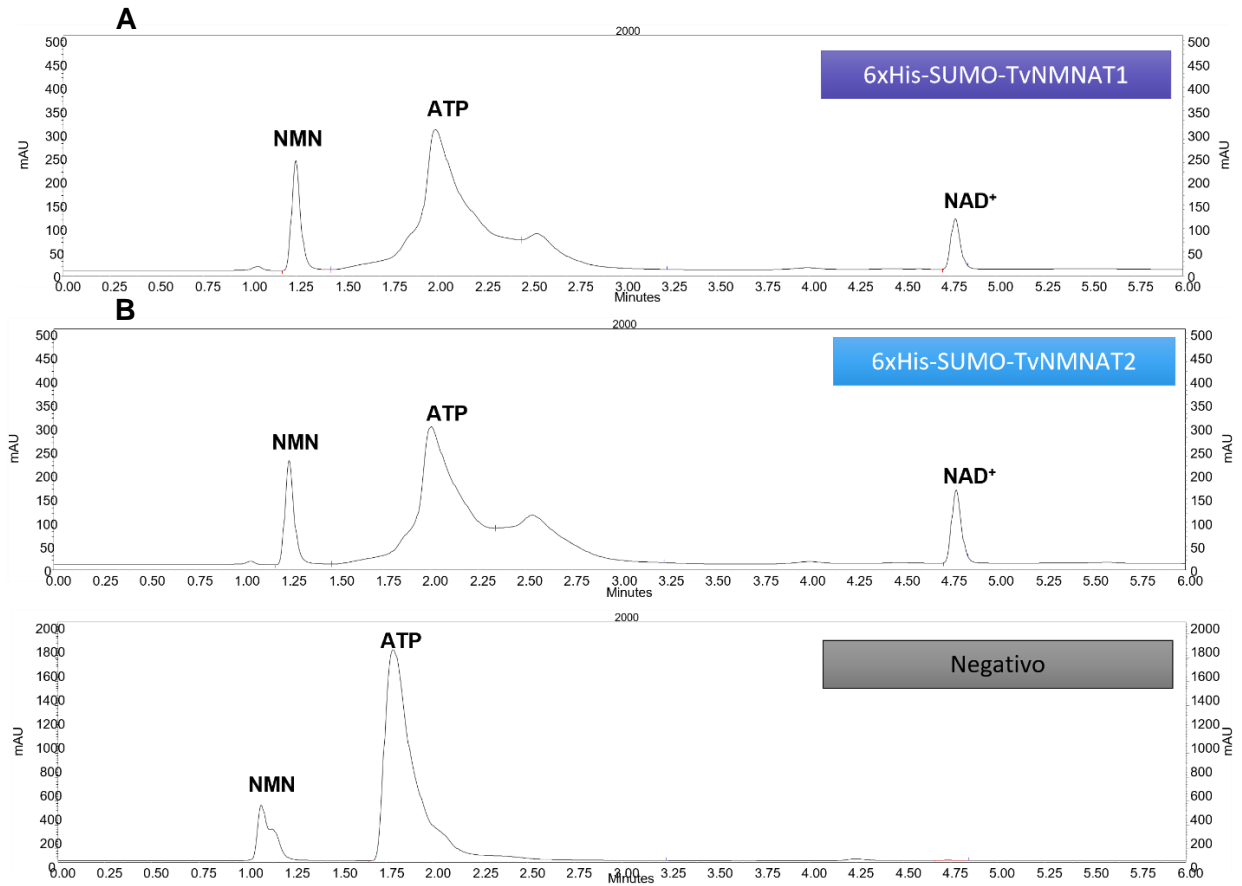
**Figura 6-13. Ensayo de actividad acoplado de las proteínas 6xHis-SUMO-TvNMNAT.** A) 6xHis-SUMO-TvNMNAT1 (250 µg de proteína) B) 6xHis-SUMO-TvNMNAT2 (250 µg de proteína). pH 7,5. Ensayo enzimático acoplado a ADH, reacción de 1 mL, detección de NADH a 340 nm



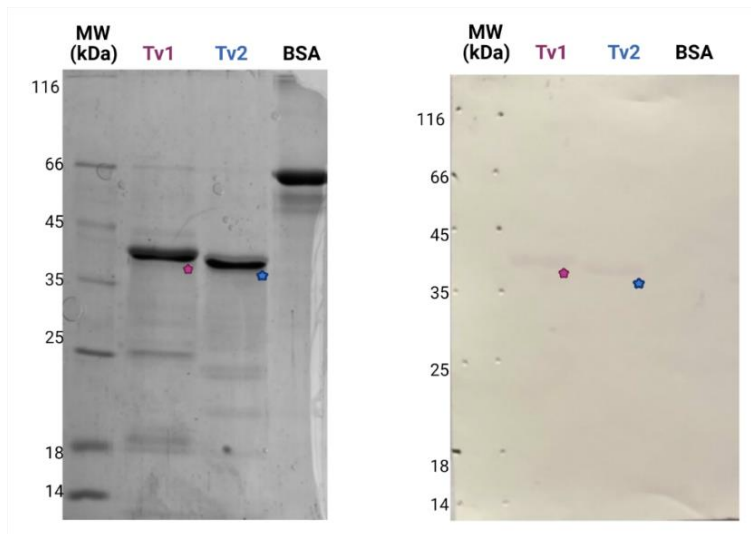
Los anteriores resultados se corroboraron de igual forma mediante ensayos enzimáticos directos por RP-HPLC, en los cuales se miden directamente los sustratos (NMN y ATP) y los productos (NAD<sup>+</sup>). En el cromatograma, se identifican 3 picos característicos con diferentes tiempos de retención, 1° a 1,25 min correspondiente a NMN, 2° a 2 min ATP y 3° a 4,75 min perteneciente a NAD<sup>+</sup>. En las dos enzimas se verifica la producción de

NAD<sup>+</sup>, con lo cual se confirma la identidad de estas NMNATs por ensayos enzimáticos directos (Figura 6-14).

**Figura 6-14. Confirmación de la actividad de las enzimas 6xHis-SUMO-TvNMNAT mediante ensayos directos por HPLC.** A) 6xHis-SUMO-TvNMNAT1 (50 µg de proteína) B) 6xHis-SUMO-TvNMNAT2 (100 µg de proteína). pH 7,5. Ensayo enzimático directo.



**Figura 6-15. Detección de NMNATs de *Trichomonas vaginalis*.** Tv1: Candidato 6xHis-SUMO-TvNMNAT1 (Izq), Tv2: Candidato 6xHis-SUMO-TvNMNAT2 (Centro), Suero albumina bovina (BSA). Inducción 37°C, 1 mM IPTG, 1% glucosa y tiempos de inducción 4 y 2 horas respectivamente. Marcador de peso de 14,4 – 116 kDa (Thermo Scientific) Electroforesis SDS-PAGE 12%, revelado en azul de Coomassie R-250. Inmunodetección, membrana de nitrocelulosa,  $\alpha$ -6xHis 1:5000,  $\alpha$ -mouse fosfatasa alcalina 1:10000.



Las NMNAT de *Trichomonas vaginalis* identificadas fueron parcialmente purificadas y presentan diferencias en actividad enzimática y tamaño (23,7 y 23,3 kDa + etiqueta 13 kDa) (Figura 6-15). Teniendo en cuenta los anteriores resultados, se identificaron experimentalmente dos isoenzimas encargadas de la síntesis del NAD<sup>+</sup> en *Trichomonas vaginalis*, la TvNMNAT1 y TvNMNAT2.

Los protozoos constituyen un grupo de organismos eucariotas unicelulares que mantienen algunas características de procariotas, en este grupo se identifican parásitos intra y extracelulares causantes de enfermedades relevantes en la salud pública. Estudios anteriores sobre el metabolismo energético del NAD<sup>+</sup>, señalan una reducción en el número de las NMNAT en parásitos intracelulares en relación con parásitos extracelulares como se observa en *Leishmania braziliensis* y *Trypanosoma cruzi*, los cuales solo presentan una NMNAT [6], [28]. De otro lado, en el parásito extracelular *Giardia lamblia* se identificaron dos isoenzimas NMNAT, al igual que en otros eucariotas de vida libre[30], [94].

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que *T. vaginalis* tal como *G. lamblia* presentan dos isoenzimas, siendo esto relacionado con su interacción con el hospedero.

Apoyando la hipótesis que la simplificación del metabolismo del NAD<sup>+</sup> está asociada con el desarrollo de parásitos de vida intracelular y su obtención de energía del hospedero.

#### **6.1.2.5 Caracterización enzimática de 6xHis-SUMO-TvNMNAT**

Con el propósito de estudiar las 6xHis- SUMO- TvNMNAT se realizaron análisis de medios de almacenamiento y condiciones enzimáticas experimentales (pH y temperatura). Para determinar algunos parámetros cinéticos tales como el Km, se realizó una aproximación empleando ensayos enzimáticos acoplados.

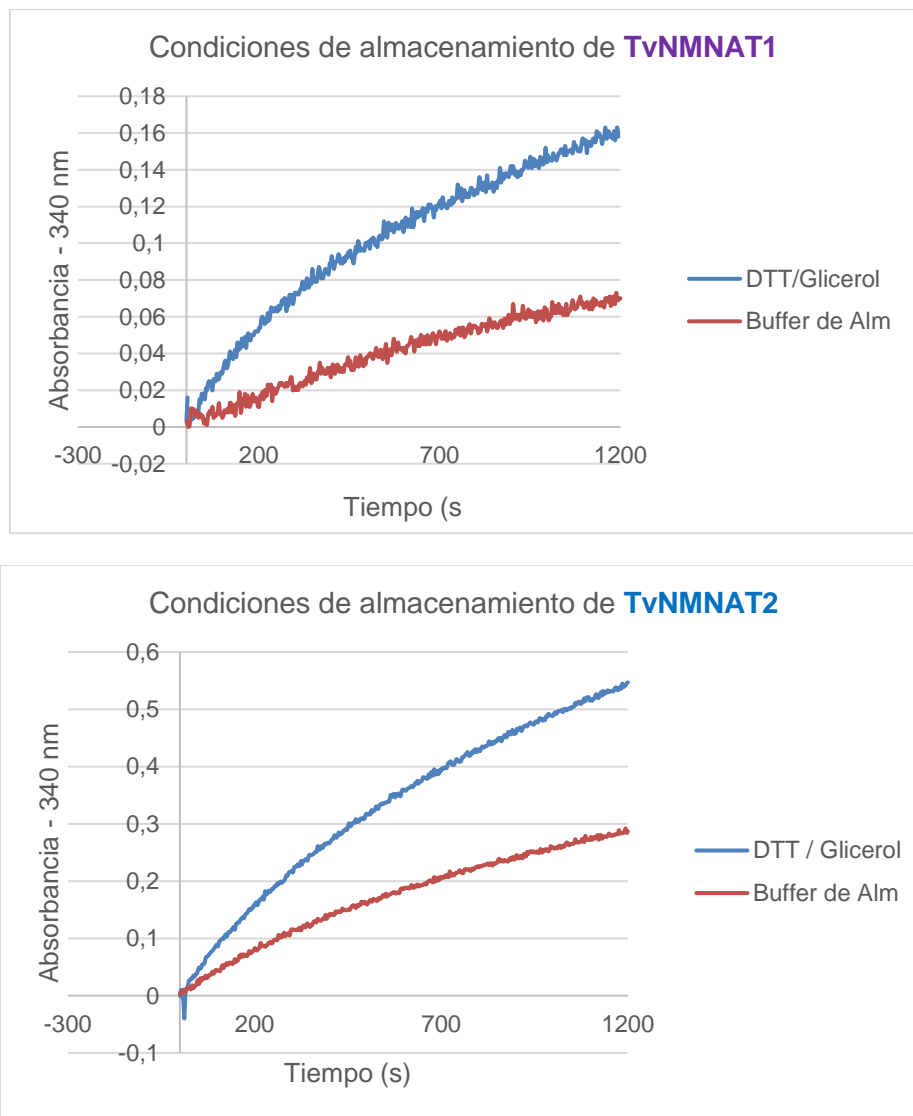
Posterior, al proceso de purificación se establecieron las mejores condiciones de almacenamiento de las proteínas recombinantes TvNMNAT mediante ensayos enzimáticos indirectos. Para ello, se evaluaron las enzimas en buffer de almacenamiento (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5, 300 mM NaCl) y en buffer de almacenamiento suplementado con DTT 1 mM y 10% Glicerol (v/v), una semana después del almacenamiento se realizaron los ensayos acoplados. Se determinó que el buffer suplementado genera una mayor actividad catalítica para las dos enzimas TvNMNAT (Figura 6-16). El requerimiento de DTT podría explicarse por su carácter reductor, permitiendo que los 6 (TvNMNAT1) y 4 (TvNMNAT2) residuos de cisteínas presentes en estas proteínas sean protegidos de la oxidación y la formación de puentes disulfuro no deseados, que podrían alterar la actividad catalítica [95], [96]. Este parámetro fue evaluado, debido al uso del DTT previamente en otras NMNAT; lo cual ha permitido la preservación de la actividad en LbNMNAT y HsNMNAT2. En contraste, la HsNMNAT1 no requiere este agente reductor [97], [98].

Por otra parte, se evaluó el pH óptimo y estabilidad térmica para las enzimas recombinantes mediante ensayos enzimáticos directos. La termo-estabilidad de las enzimas varía, TvNMNAT1 presenta mayor actividad a los 37°C después de lo cual se presenta una reducción en la actividad enzimática. Igualmente, TvNMNAT2 incrementa la producción de NAD<sup>+</sup> a los 37°C pero se mantiene estable hasta los 39°C (Figura 6-17-B). *Trichomonas vaginalis* al parasitar el tracto vaginal puede crecer entre 36.1 – 37.2 °C y ha sido reportado que los cultivos de este parásito pueden oscilar entre 26 – 42°C, siendo el mayor pico de multiplicación entre 36 a 38°C. Se ha mostrado que este organismo tiene la capacidad de soportar los procesos de hipertermia de su hospedero y se ha observado la muerte térmica a los 43°C [99]–[101]. Los datos anteriores presentan relación con los resultados obtenidos de actividad de las TvNMNAT en estos rangos de

temperatura donde se observa un incremento de la actividad en las temperaturas evaluadas.

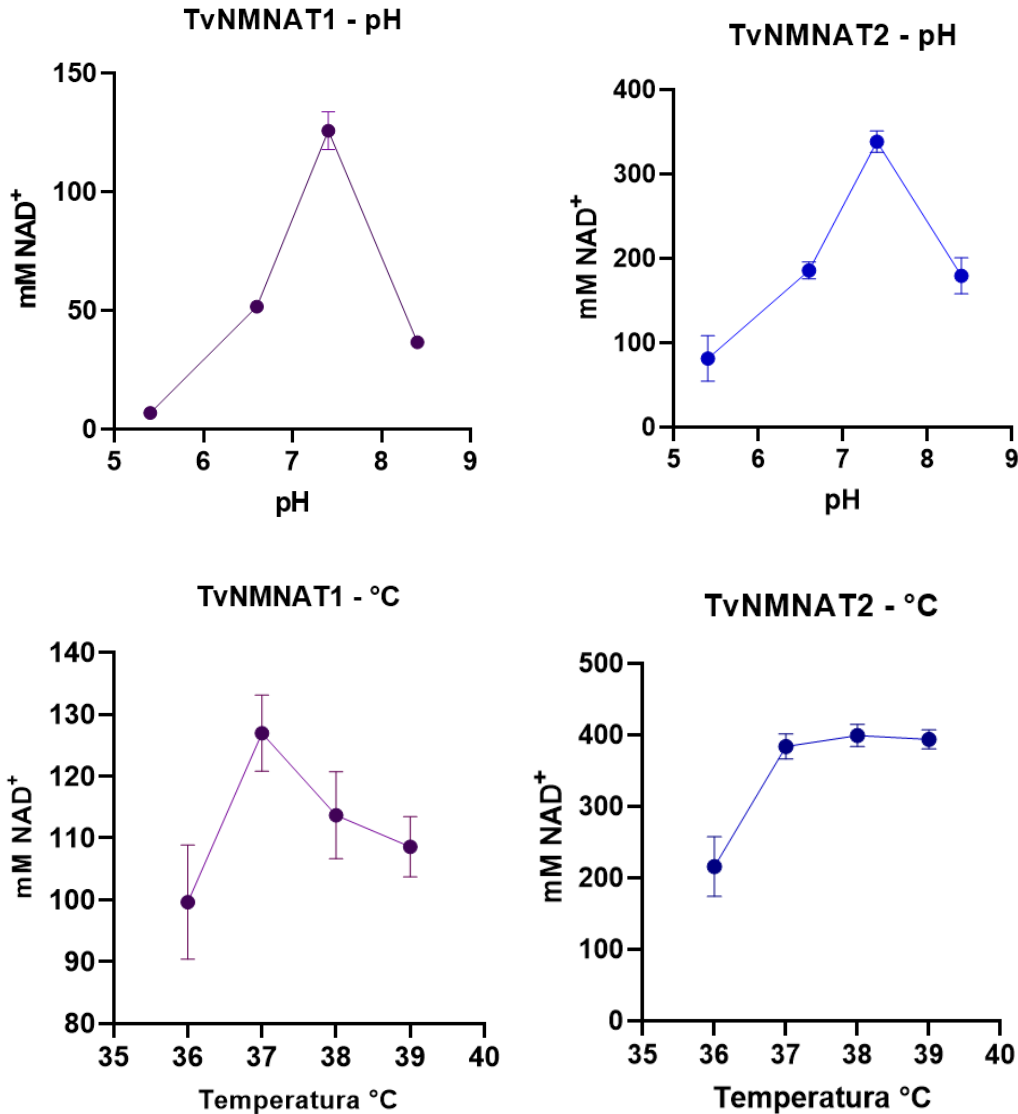
El pH óptimo para las isoenzimas TvNMNAT es 7,5 (Figura 6-17), lo cual se asocia con otras NMNATs identificadas que presentan rangos de pH entre 6,5 a 8, correspondiendo con los valores reportados para esta familia[102].

**Figura 6-16. Condiciones de almacenamiento de las proteínas 6xHis-SUMO-TvNMNAT.** A) 6xHis-SUMO-TvNMNAT1 (250 µg de proteína) B) 6xHis-SUMO-TvNMNAT2 (250 µg de proteína). Buffer de Alm: Buffer de almacenamiento. DTT/Glicerol: Buffer de almacenamiento suplementado con DTT 1mM y 10% Glicerol (V/V). Ensayos enzimáticos indirectos con ADH con Buffer HEPES pH 7.5. Reacción de 1 mL, detección de NADH a 340 nm.





**Figura 6-17. Condiciones óptimas de actividad enzimática para las enzimas 6xHis-SUMO-TvNMNAT.** Mediante ensayos directos se evaluaron las condiciones óptimas de: A. pH B. Temperatura. mM NAD<sup>+</sup>: mM NAD<sup>+</sup> producido en 20 min. Los datos se presentan con el promedio de la desviación estándar (n=3). Realizado en el programa Prism 9.



Se realizó la determinación de la  $K_m$  para el NMN usando las dos enzimas mediante ensayos enzimáticos acoplados durante 9 minutos. En el análisis de los datos, se obtuvieron valores similares usando los métodos de Michaelis-Menten y Hanes-Woolf (Tabla 6-7 y Figura 6-18). Teniendo en cuenta los valores obtenidos se identifica que TvNMNAT1 ( $K_m$  0,14119 mM) presenta una mayor afinidad por el NMN, que la TvNMNAT2 ( $K_m$  0,6880 mM). Similar a lo observado en las NMNATs humanas y en otros eucariotas superiores con múltiples NMNAT, en donde se encuentran diferentes  $K_m$

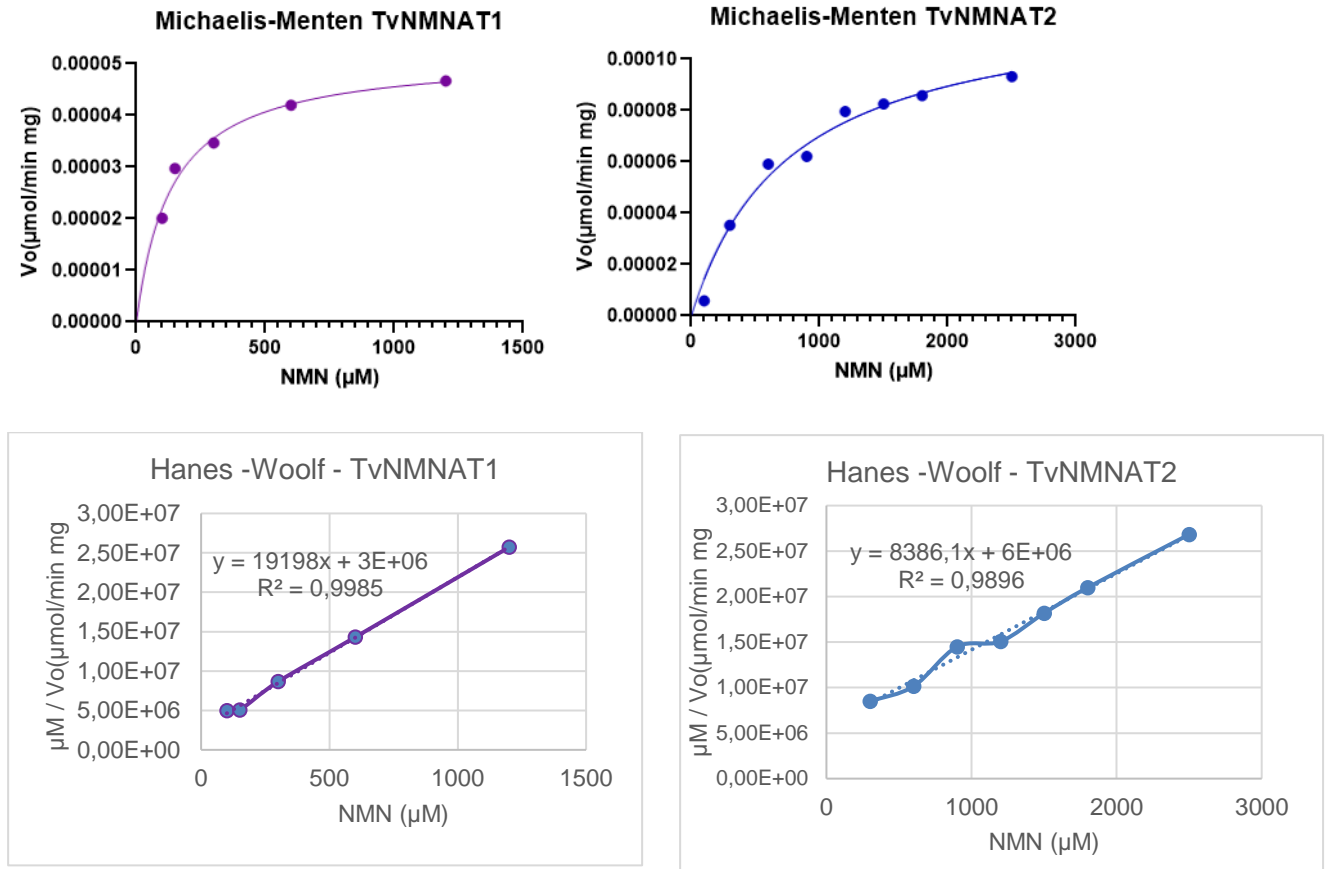
posiblemente asociados a diferentes isoenzimas, compartimentalización y rutas de biosíntesis específicas del dinucleótido, por ejemplo, en las enzimas HsNMNAT2 citoplasmática ( $K_m$  0,0889mM) y la HsNMNAT3 mitocondrial ( $K_m$  0,0662 mM) [16]. Por otra parte, se determinó la eficiencia catalítica de las enzimas TvNMNAT, identificando que la TvNMNAT1 presenta una mayor tasa de la producción de NAD<sup>+</sup> y una preferencia por el NMN. Es relevante continuar con el análisis de los otros sustratos de las NMNAT (ATP, NaAD, NaAM, PPI y NAD<sup>+</sup>), para identificar el sustrato con la mejor interacción y con ello explorar en la búsqueda de moléculas con actividad inhibitoria que puedan llevar a un control de parasitemia.

Los ensayos enzimáticos directos se llevaron a cabo, pero no fueron analizados, debido a las limitaciones en la disponibilidad del HPLC hasta la entrega de este documento, por ello no posible anexar los resultados. Se espera para el momento de la sustentación contar con la información.

**Tabla 6-7. Parámetros cinéticos para las enzimas 6xHis-SUMO-TvNMNAT.** Realizado mediante regresión lineal (Hanes-Woolf, usando Excel) y regresión no lineal (Michaelis-Menten, usando prism9).

Enzima	Sustrato	Km (mM)		Vmax ( $\mu\text{mol}/\text{seg mmol}$ )		Numero de recambio $K_{cat}$ ( $\text{seg}^{-1}$ )		Eficiencia Catalítica ( $K_{cat}/K_m \text{seg}^{-1} \text{mM}^{-1}$ )	
		Lineal	No lineal	Lineal	No lineal	Lineal	No lineal	Lineal	No lineal
TvNMNAT1	NMN	0,14119	0,1359	$3,185 \times 10^{-2}$	$3,164 \times 10^{-2}$	7,084	7,037	50,17	51,78
TvNMNAT2	NMN	0,6880	0,7520	0,07214	0,07423	21,82	21,66	31,71	28,80

**Figura 6-18. Determinación de los parámetros cinéticos de la proteína 6xHis-SUMO-TvNMNAT.** Realizado mediante regresión lineal (Hanes-Woolf, usando Excel) y regresión no lineal (Michaelis-Menten, usando prism9). Se uso concentraciones saturantes de ATP 5 mM.



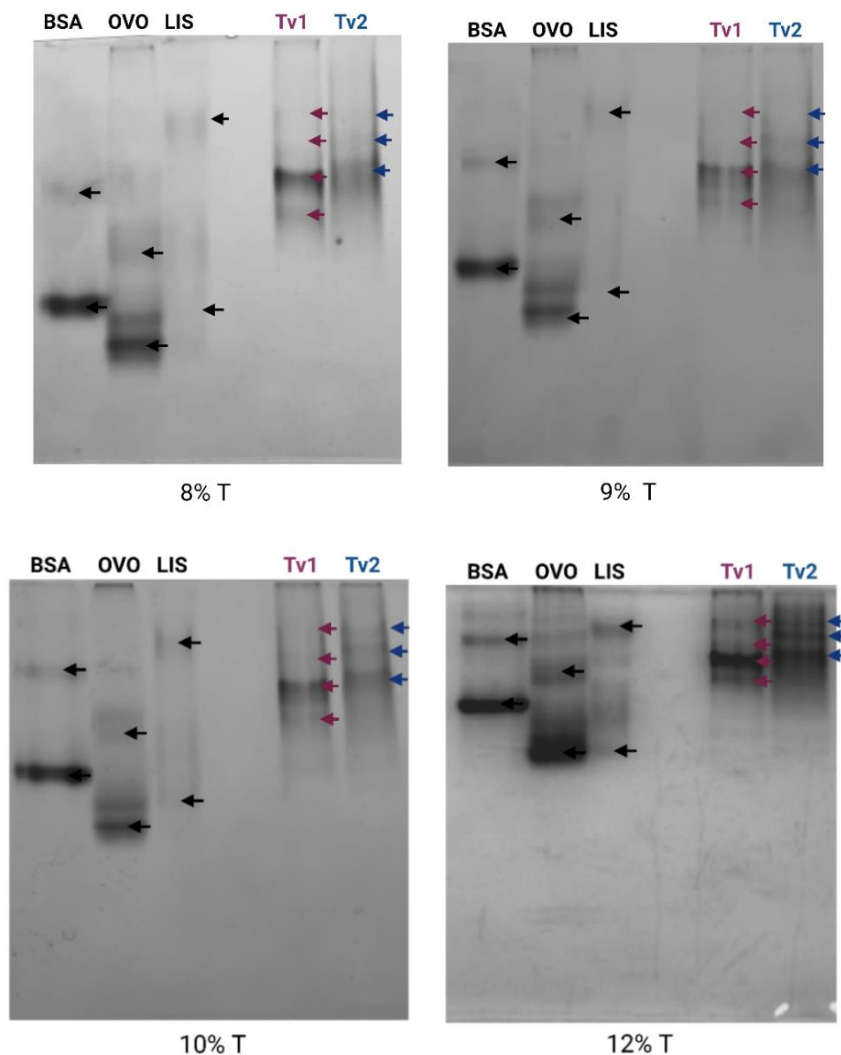
### 6.1.2.6 Análisis de la estructura cuaternaria de las enzimas recombinantes 6xHis-SUMO-TvNMNAT

En este apartado se presenta una aproximación de la estructura cuaternaria de las proteínas recombinantes 6xHis-SUMO-TvNMNAT, empleando electroforesis de poliacrilamida no denaturante (PAGE) para la generación de gráficos de Ferguson, los cuales se presentan como una estrategia para la comprensión de la estructura cuaternaria de estas enzimas.

El análisis de oligomerización fue realizado mediante la construcción de los diagramas de Ferguson, usando como patrones lisozima (14,3 kDa), ovoalbumina (43 kDa) y albumina de suero bovino – BSA (66 kDa), cuya estructura cuaternaria ha sido reportada [103], [104]. Estos patrones fueron analizados mediante PAGE usando diferentes

concentraciones de acrilamida, bajo condiciones que conservan su estructura cuaternaria (Figura 6-19). Teniendo en cuenta, la movilidad electroforética de los patrones moleculares se analizó la migración relativa ( $R_f$ ), indicada en la Tabla 6-8. Con los  $R_f$  obtenidos en cada una de las concentraciones de PAGE, se generaron graficas para calcular la pendiente de las rectas siendo este el valor de  $K_r$  (Figura 6-20 y Tabla 6-8). La construcción del grafico de Ferguson se realizó con el  $K_r$  de cada recta y el peso molecular de los oligómeros (Figura 6-21 y Tabla 6-9).

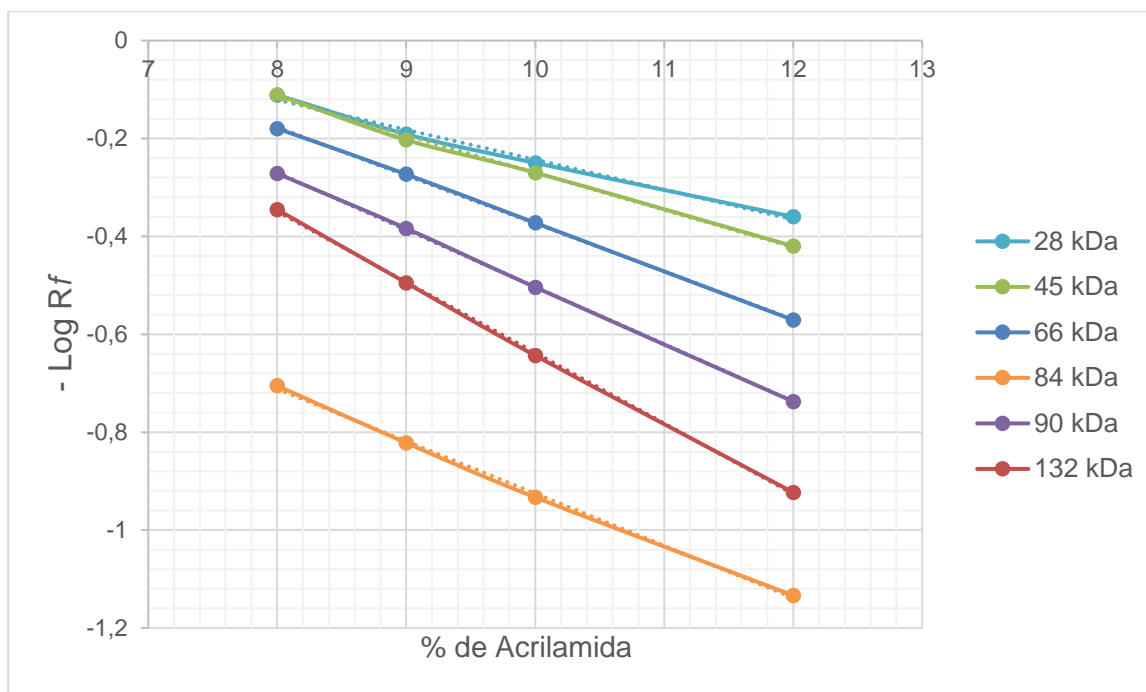
**Figura 6-19. Movilidad electroforética de proteínas patrón y 6xHis-SUMO-TvNMNAT mediante geles PAGE.** Patrones moleculares: BSA-Suero albumina bovina, OVO – Ovoalbúmina, LIS – Lisozima. Proteínas analizadas Tv1 (6xHis-SUMO-TvNMNAT1) y Tv2 (6xHis-SUMO-TvNMNAT2). Flechas indican las bandas usadas para la construcción de gráficos de Ferguson. Electroforesis PAGE (8, 9, 10 y 12%) revelado en azul de Coomassie R-250.



**Tabla 6-8. Migración relativa (Rf) de los patrones proteicos usados en geles PAGE.**

	<b>Lisozima (28 kDa)</b>	<b>Ovoalbúmina (45 kDa)</b>	<b>BSA (66,5 kDa)</b>	<b>Lisozima (84 kDa)</b>	<b>Ovoalbúmina (90 kDa)</b>	<b>BSA (132 kDa)</b>
<b>% Acrilamida</b>	<i>Log R<sub>f</sub></i>	<i>Log R<sub>f</sub></i>	<i>Log R<sub>f</sub></i>	<i>Log R<sub>f</sub></i>	<i>Log R<sub>f</sub></i>	<i>Log R<sub>f</sub></i>
<b>8</b>	-0,118864589	-0,110895659	-0,179607833	-0,705130313	-0,283056625	-0,345233658
<b>9</b>	-0,200565028	-0,202963405	-0,273001272	-0,784141614	-0,38369957	-0,494850022
<b>10</b>	-0,268360879	-0,282006758	-0,372385904	-0,93305321	-0,503855508	-0,643452676
<b>12</b>	-0,384576047	-0,431363764	-0,570802298	-1,133538908	-0,73239376	-0,922984816

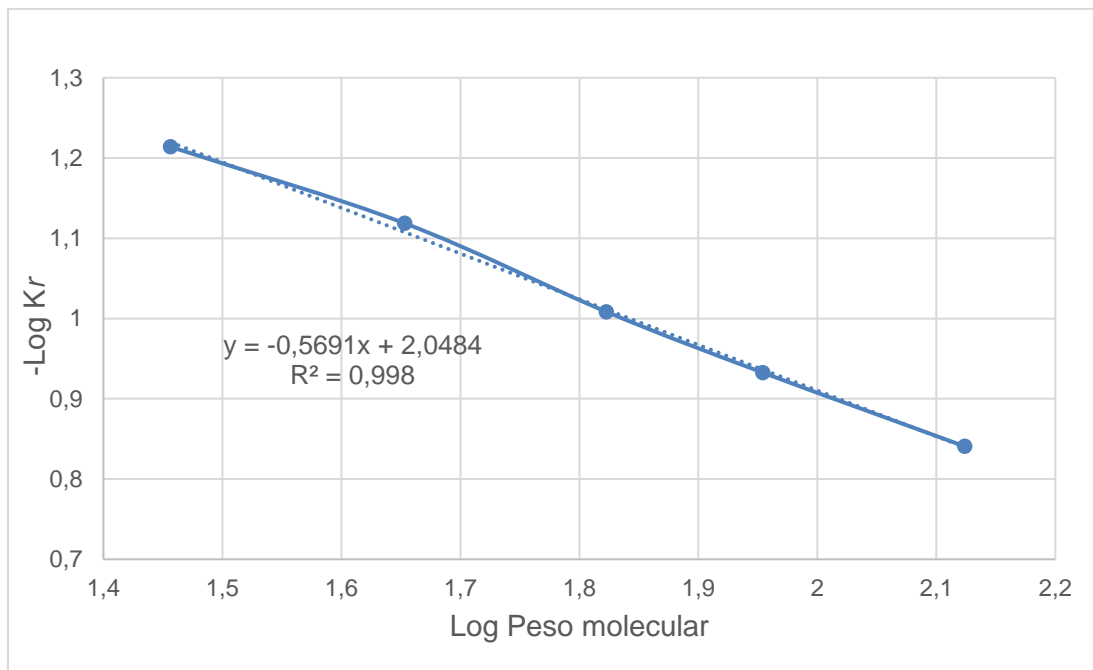
**Figura 6-20. Determinación de los coeficientes de retardo (Kr) de los patrones proteicos según su migración relativa.**



**Tabla 6-9. Coeficientes de retardo (Kr) de los patrones moleculares usados en geles PAGE.**

Peso molecular (kDa)	Ecuación de la recta	R <sup>2</sup>	Kr
28,6	$y = -0,0611x + 0,3679$	0,9921	0,0611
45	$y = -0,0761x + 0,4911$	0,9973	0,0761
66,5	$y = -0,0981 + 0,6075$	0,9998	0,0981
84	$y = -0,1008x + 0,5245$	0,9931	0,1008
90	$y = -0,1168x + 0,6648$	0,999	0,1168
133	$y = -0,1443x + 0,8049$	0,9997	0,1443

**Figura 6-21. Gráfico de Ferguson de los patrones proteicos.**



A las enzimas 6xHis-SUMO-TvNMNAT1 y 6xHis-SUMO-TvNMNAT2 de la misma forma se le determinaron los valores de  $K_r$  de las 4 y 3 bandas identificadas, respectivamente (Figura 6-22). Usando la ecuación de la recta obtenida en el gráfico de Ferguson, se realizó una interpolación de los datos determinando el peso molecular de cada banda, cuyo dato se dividió con la masa molecular de 36,7 y 36,3 kDa siendo esta la masa molecular de cada monómero de TvNMNAT (Tabla 6-10).

Los valores obtenidos indican que para el caso de 6xHis-SUMO-TvNMNAT1 se presentan homo-oligómeros en forma 1-mer, 2-mer y 3-mer y para 6xHis-SUMO-TvNMNAT2 se observan principalmente 2-mer y 3-mer, en los geles PAGE (9% y 10%) se identifica una banda difusa, posiblemente 1-mer. Esta variación puede asociarse a cambios en el equilibrio de oligomerización debido a las condiciones de pH, buffer, concentración de proteína, entre otras, como ha sido reportado para otras proteínas [105], [106].

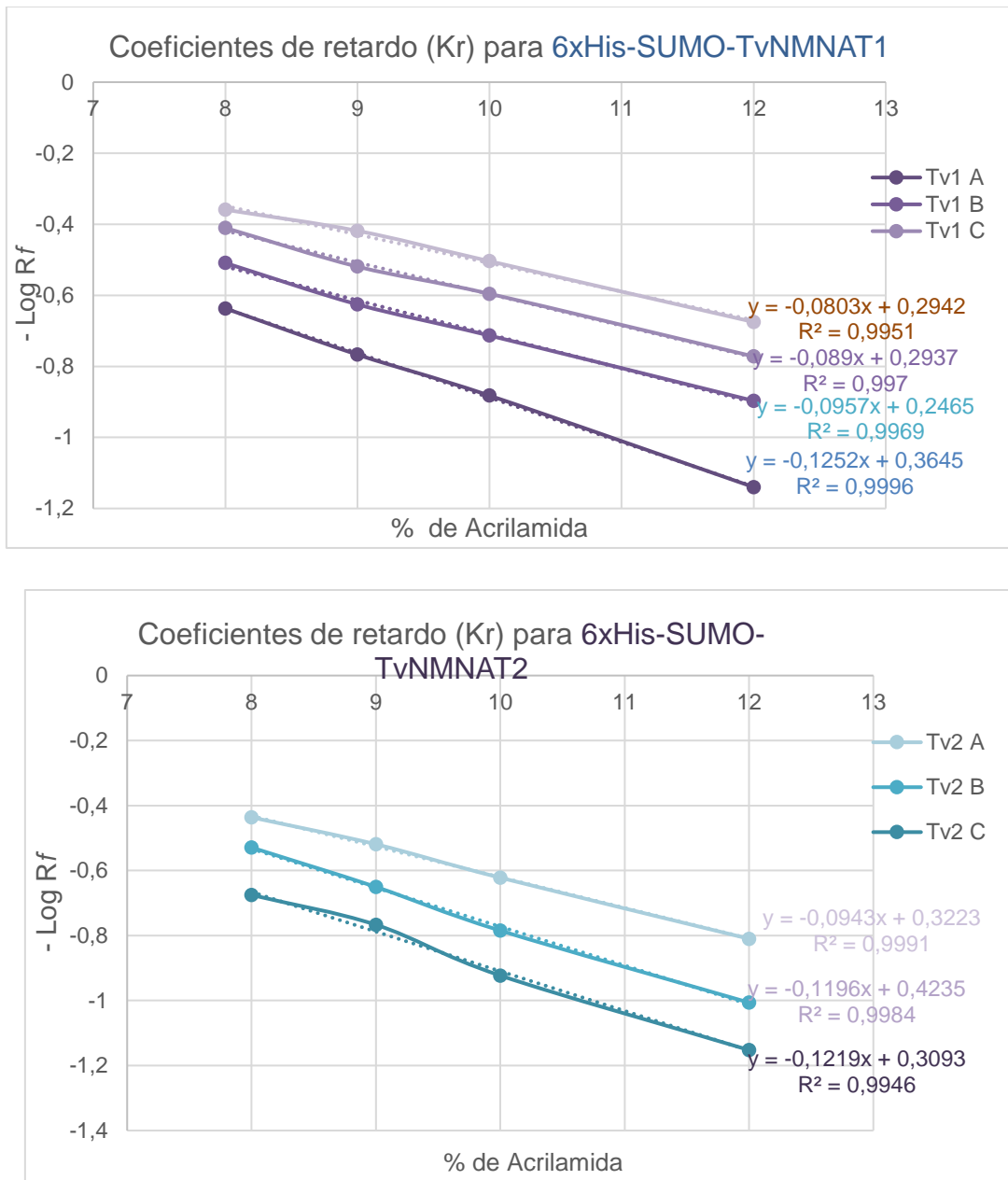
En la familia NMNAT se han identificado estructuras cuaternarias de 1-mer, 2-mer, 4-mer y 6-mer. Las NMNAT en este trabajo identificadas presentan formas 1-mer, 2-mer y 3-mer, no se observó la forma 6-mer en los análisis realizados, posiblemente debido por las condiciones de la matriz de poliacrilamida (% T y pH) y la concentración de la proteína, ya que los 3-mer constituyen posiblemente el estado de equilibrio intermedio para la formación de los hexámeros (dímeros de trímeros), como ha sido discutido para las HsNMNAT [16].

Adicionalmente, mediante análisis bioinformáticos usando GalaxyWEB se predijo que 6xHis-SUMO-TvNMNAT1 y 6xHis-SUMO-TvNMNAT2 puede presentar organizaciones dimericas, tetrámicas y hexámicas, mostrando una relación con los resultados experimentales obtenidos y estableciendo la posibilidad que bajo otras condiciones puedan constituirse 4-mer y 6-mer [107]. Cabe señalar que las enzimas utilizadas en estos ensayos son proteínas recombinantes que presentan una etiqueta en la región N-terminal, en donde esta adición pueda interferir en la constitución de 6-mer, por lo que es necesario realizar ensayos con las proteínas nativas.

El estudio de la estructura cuaternaria de las NMNAT es relevante para entender los procesos de regulación, interacción con otras proteínas, actividad chaperona y estabilidad o especificidad con los sustratos como ha sido reportado para esta familia [108], [109]. Para continuar con el estudio de oligomerización podrían emplearse

técnicas tales como cristalografía de Rayos-X, resonancia magnética, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), entre otros [110]. Este último es un método asequible que permitirá evaluar a la par la actividad catalítica de las diferentes fracciones, determinando así la relación estructura cuaternaria / actividad enzimática.

**Figura 6-22. Identificación de coeficientes de retardo (Kr) para las bandas de las proteínas 6xHis-SUMO-TvNMNAT analizadas por PAGE.**





**Tabla 6-10. Determinación de los estados de oligomerización de las proteínas recombinantes 6xHis-SUMO-TvNMNAT usando el grafico de Ferguson.** Fue realizada una aproximación numérica de los estados de oligomerización superior a 0.5 asociando con el siguiente oligómero.

Proteína		Kr	-Log Kr	Log MW	MW	MW/MW real	Oligómero
6xHis-SUMO-TvNMNAT1	A	0,1252	0,9023	2,0137	103,2080	2,8122	Trímero
	B	0,0957	1,0190	1,8086	64,3674	1,7538	Dímero
	C	0,089	1,0506	1,7532	56,6600	1,5438	Dímero
	D	0,0803	1,0952	1,6747	47,2908	1,2885	Monómero
6xHis-SUMO-TvNMNAT2	A	0,1219	0,9139	1,9933	98,4757	2,7354	Trímero
	B	0,1196	0,9222	1,9788	95,2342	2,6453	Trímero
	C	0,0943	1,0254	1,7974	62,7220	1,7422	Dímero

#### 6.1.2.5 Producción de herramientas inmunológicas en el modelo aviar.

Una vez identificadas funcionalmente las NMNAT de *Trichomonas vaginalis* y con el propósito de desarrollar una herramienta inmunológica que permite su estudio *in vivo* (en el parásito) e igualmente, constituya un insumo para el desarrollo de sistemas de detección, se empleó el modelo aviar para la generación de anticuerpos policlonales, como un objetivo adicional a desarrollar en este proyecto.

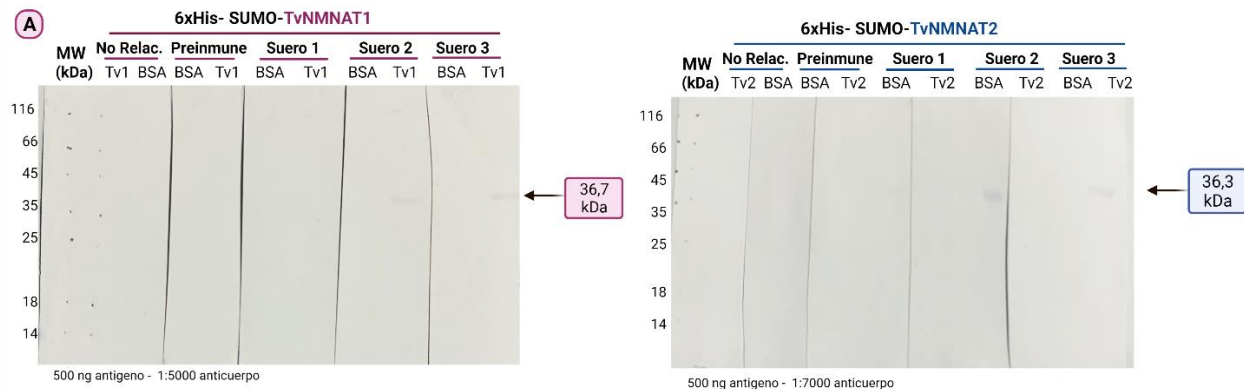
Las proteínas 6xHis-SUMO-TvNMNAT1 y 6xHis-SUMO-TvNMNAT2 purificadas y cuantificadas fueron inoculadas en gallinas Hy-line Brown de 100 semanas de edad, como fue especificado en la Tabla 5-2, junto con una Gallina control, siendo inyectada con PBS 1X. Durante cada esquema de inmunización fueron extraídas sangrías posteriores a la inoculación y se recogieron 15 y 16 huevos respectivamente para cada uno de los candidatos.

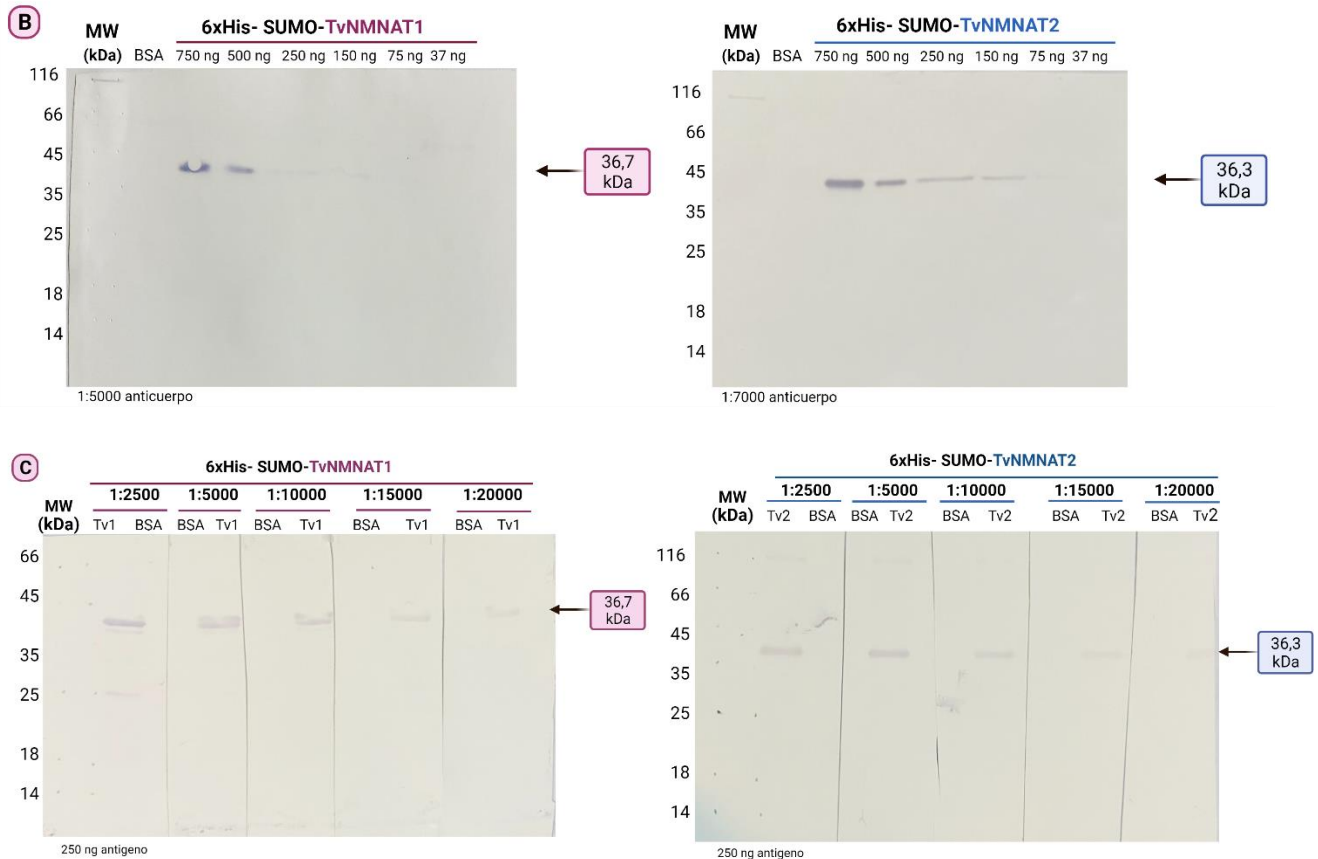
El modelo aviar es una estrategia promisorio debido a que las inmunoglobulinas Y (IgY) de las yemas presentan propiedades únicas (estabilidad y abundancia), además su extracción se realiza por protocolos de precipitación y representa un modelo no invasivo, con el cual se reduce el dolor para el modelo animal. Adicionalmente, en múltiples trabajos realizados en nuestro grupo de investigación y en la literatura, se demuestra que

la respuesta inmune puede generarse con bajas cantidades de antígeno y se obtienen entre 50 – 100 mg de IgYs por cada huevo, donde del 2 - 10% corresponden a IgYs específicos contra el antígeno [111], [112]. Por otra parte, los IgY policlonales generados contra parásitos se han descrito como nuevas estrategias para el control de las patologías generadas por estos organismos, debido a que estos presentan mejores títulos, estabilidad de su estructura en las regiones bisagra y costos bajos a comparación de las inmunoglobulinas de mamíferos [113].

Los anticuerpos  $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT1-IgY y  $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT2-IgY fueron obtenidos a partir de sueros extraídos de sangrías y huevos recolectados durante el periodo de inmunización. Los sueros se evaluaron estableciendo la especificidad de la interacción con el antígeno (proteínas 6xHis-SUMO-TvNMNAT). Se identifica un mayor reconocimiento en los sueros 2 y 3, mientras que en el suero 1 existe una baja detección, siendo esto relacionado con la evolución del esquema de producción de anticuerpos en el modelo aviar (Figura 6-23-A) (BIBLIOGRAFIA). Posteriormente a la purificación de los anticuerpos en la sangría 3, se evaluó la cantidad mínima de detección del antígeno de los IgYs - $\alpha$ TvNMNAT en una dilución 1:5000 y 1:7000, en donde se detectan hasta 150 ng y 75 ng de cada proteína respectivamente (Figura 6-23-B). Por último, se determinó la dilución máxima de los anticuerpos  $\alpha$ TvNMNAT mediante diluciones seriadas, que reconocen 250 ng de antígeno hasta en títulos de 1:20000 (Figura 6-23-C).

**Figura 6-23. Caracterización de anticuerpos policlonales  $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT-IgY.**  $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT1 (Izq),  $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT2 (Derecha)  
 A) Evaluación de especificidad de suero B) Análisis de sensibilidad de cantidad mínima de antígeno detectada C) Análisis de sensibilidad del título de anticuerpo. Inmunodetección, membrana de nitrocelulosa,  $\alpha$ -chicken fosfatasa alcalina 1:10000.



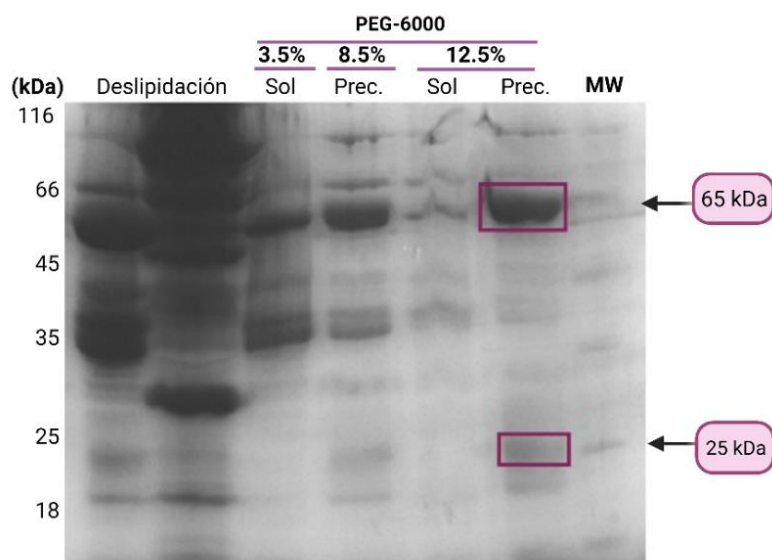


Adicional a las sangrías obtenidas como se mencionó anteriormente, el modelo aviar permite obtener anticuerpos policlonales a partir de la yema de huevo, siendo estos de gran relevancia por su producción, costo y cantidades obtenidas [114]. Las gallinas inmunizadas generaron solo 15 y 16 huevos respectivamente en el esquema de inmunización (30 días), resaltando que los tiempos de postura disminuyeron en comparación de gallinas más jóvenes; no obstante, esto no afectó la producción de las inmunoglobulinas en los huevos obtenidos. Lo cual indica que estos organismos pueden producir IgYs por largos periodos de tiempo y presentar vidas longevas. El uso de gallinas con posturas irregulares para la producción de los anticuerpos no había sido evaluado, ya que se recomiendan para ello gallinas de 7 – 8 semanas, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que se extiende la vida media útil hasta en 100 semanas en este modelo para estos fines [114], [115].

Los IgYs de la yema de huevo fueron purificadas mediante precipitación usando un gradiente de PEG-6000, el proceso fue monitoreado por SDS-PAGE. En donde se

verifica el enriquecimiento de las IgY mediante la identificación de la cadena pesada (65 kDa) y cadena liviana (25 kDa) en las precipitaciones al 8,5 y 12% como se muestra en la Figura 6-24 [62].

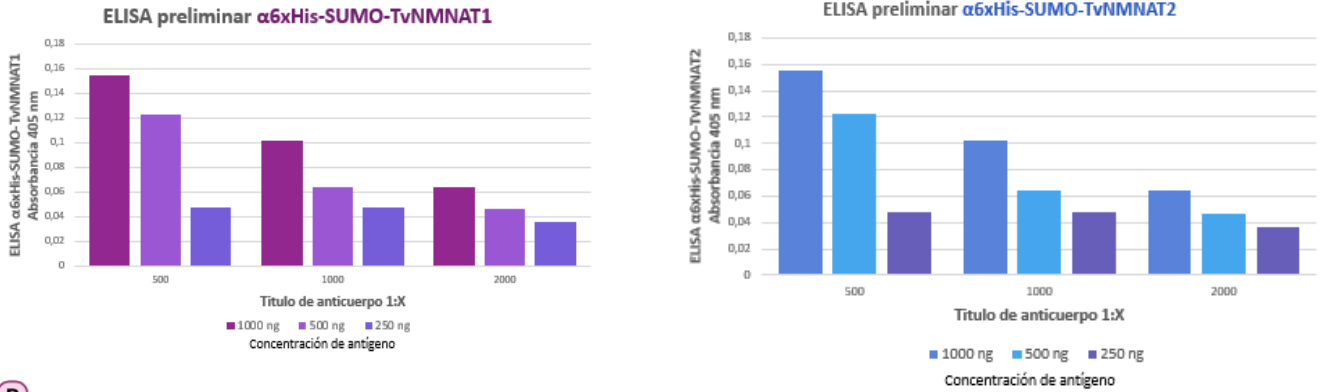
**Figura 6-24. Purificación de IgYs a partir de yema de huevo.** Prec: Fracción precipitada. Sol: Fracción soluble. Marcador de peso de 14,4 – 116 kDa (Thermo Scientific) Electroforesis SDS-PAGE 10%, revelado en azul de Coomassie R-250.



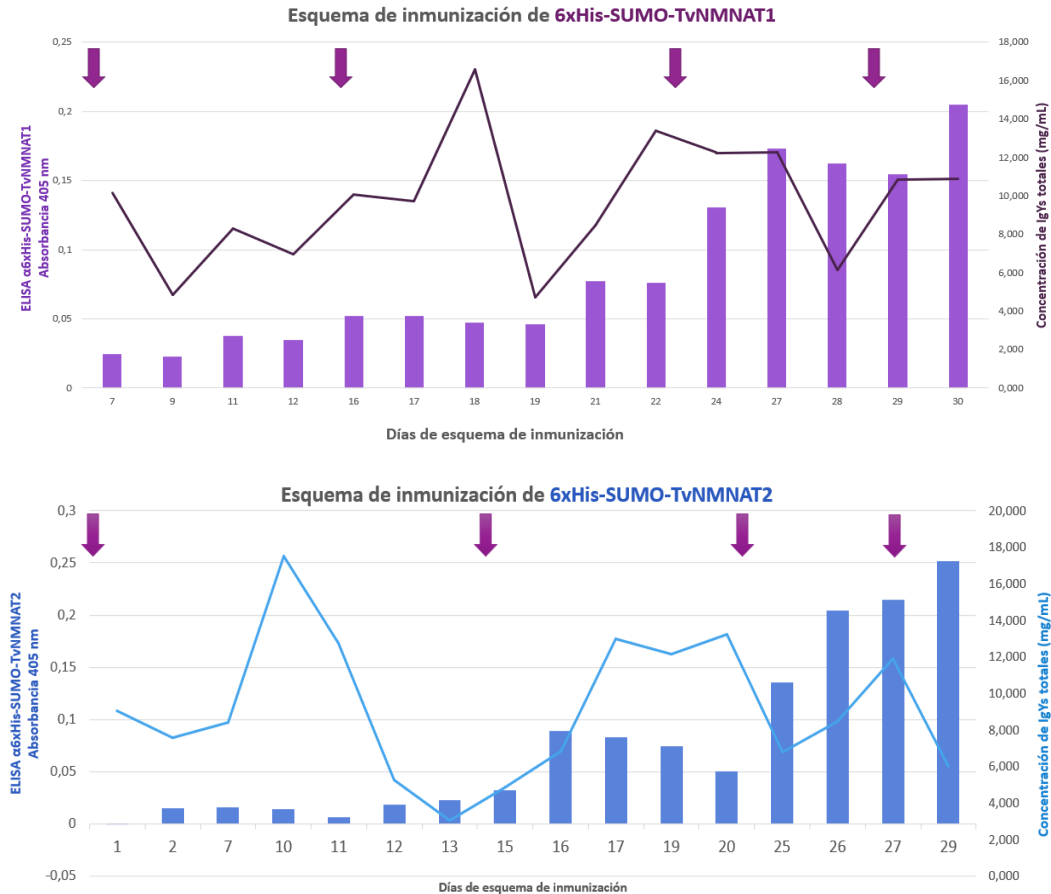
Las inmunoglobulinas obtenidas en el proceso de precipitación fueron cuantificadas por espectrofotometría a 280 nm, determinando así su concentración (mg/mL). El perfil generado presenta variaciones en la cantidad de IgYs durante el esquema de inmunización, esto corresponde a los valores de IgYs totales [116]. Se selecciono el huevo que presentaba la mayor concentración de inmunoglobulinas con el propósito de identificar las condiciones óptimas para la realización de un ELISA preliminar indirecto, siendo estas 500 ng de antígeno y un título de anticuerpo 1:1000 para los dos esquemas, como se ha establecido previamente en nuestro laboratorio (Figura 6-25-A). Una vez establecidas las condiciones del ELISA indirecto, se evaluó la totalidad de los huevos para establecer las IgY's específicas generadas con relación al perfil de inmunización. Se observó un aumento de la reactividad y especificidad por el antígeno 6xHis-SUMO-TvNMNAT1 y 6xHis-SUMO-TvNMNAT2 a partir del día 21 y 25 respectivamente, mostrando así una asociación entre las reinmunizaciones y la especificidad de los anticuerpos producidos como se identifica en el diagrama de barras (Figura 6-25-B).

**Figura 6-25. Evaluación de  $\alpha 6xHis$ -SUMO-TvNMNAT-IgY de yema de huevo.**  
 A) ELISA preliminar  $\alpha 6xHis$ -SUMO-TvNMNAT1-IgY (Izquierda) y  $\alpha 6xHis$ -SUMO-TvNMNAT2-IgY (Derecha) B) Monitoreo de la producción de IgY's en yema de huevo. Cuantificación de inmunoglobulinas precipitadas con PEG-6000 al 12% espectrofotometría 280 nm (línea de tendencia), Análisis por ELISA indirecto con anticuerpos a 405 nm (barras). Antígeno 500 ng, título de anticuerpo 1:1000. Flechas indican periodos de inmunización.

**A**



**B**



La generación de inmunoglobulinas específicas para los  $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT-IgY se verifica en mayor grado posterior a la tercera inmunización, las diferencias de los perfiles obtenidos se atribuyen a la inmunogenicidad de los antígenos y las características del individuo inmunizado. En cada ELISA indirecto realizado se usaron controles para determinar la relación entre antígeno y anticuerpo. El perfil de generación de anticuerpos  $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT-IgY contrastado con la producción de anticuerpos generados en el LIBBIQ es similar a trabajos previos en donde se utilizaron proteínas recombinantes solubles [117], [118].

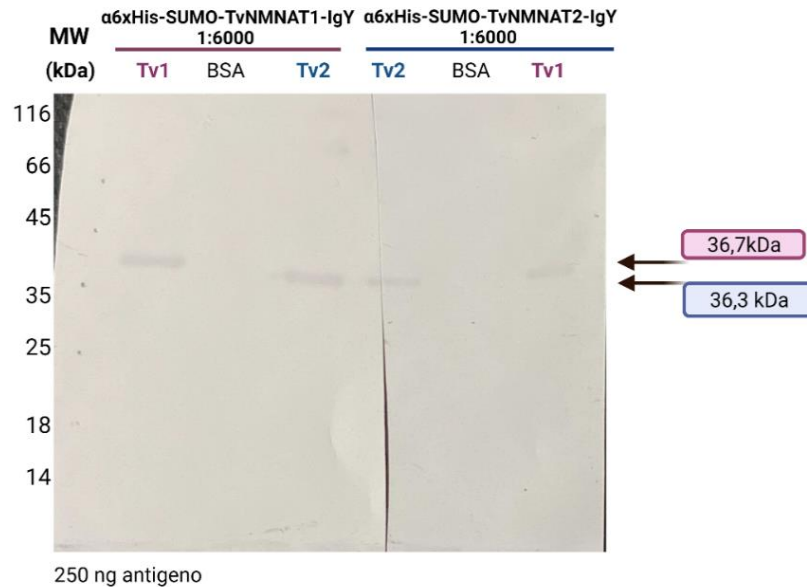
Finalmente, los anticuerpos  $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT-IgY se purificaron por afinidad, obteniendo 452 y 412  $\mu$ g de IgY's TvNMNAT de una alícuota de 400  $\mu$ L. Esta purificación permitió evaluar la interacción antígeno-anticuerpo e identificar el reconocimiento cruzado de las TvNMNAT recombinantes. Los anticuerpos  $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT1-IgY y  $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT2-IgY reconocen de manera específica a TvNMNAT1 y TvNMNAT2, respectivamente.

Adicionalmente, se evaluó el reconocimiento cruzado de los  $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT-IgYs en relación con los antígenos empleados usando un título de 1:6000. Se detecta un reconocimiento cruzado por los dos anticuerpos (Figura 6-26). Se realizó la predicción de los epítomos por BepiPred-2.0 de las proteínas nativas, en donde se determinan epítomos más inmunogénicos los cuales no son comunes entre las dos isoenzimas a nivel de estructura primaria (Tabla 6-11). Considerando lo anterior, la diferencia de epítomos y el reconocimiento cruzado es posible que los anticuerpos generados en el modelo aviar contengan epítomos de la etiqueta SUMO, para evaluar esto se procedió a realizar el reconocimiento de una proteína recombinante no relacionada que contenía la etiqueta 6xHis-SUMO (Triparedoxina peroxidasa de *Leishmania braziliensis* 6xHis-SUMO-LbTXNPxII); Los anticuerpos  $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT-IgY reconocieron la proteína recombinante evaluada, con lo cual se puede concluir que no solo se generaron anticuerpos específicos a las proteínas TvNMNAT, sino también contra etiqueta empleada (Figura 6-27. ) [119].

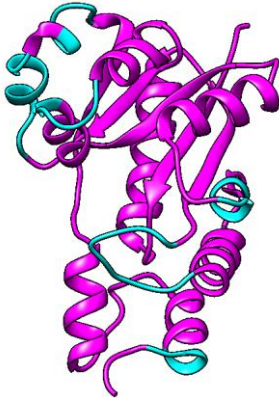
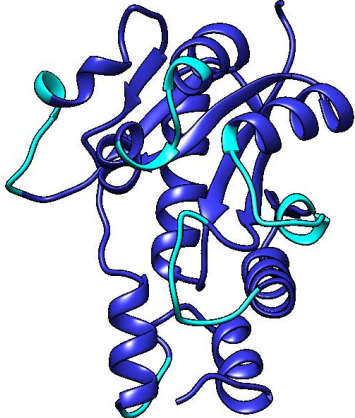
Para optimizar esta herramienta inmunológica es necesario purificar los anticuerpos específicos usando cromatografía de afinidad. Para ello se debe expresar la proteína recombinante y removerse la etiqueta usando proteasa SUMO, posterior se realizará la

purificación por afinidad de los anticuerpos empleando la proteína recombinante procesada, así se obtendrán anticuerpos contra los IgYs específicos TvNMNAT. Estos anticuerpos purificados permitirán determinar la localización *in vivo* de las enzimas NMNAT en el parásito [120].

**Figura 6-26. Evaluación de reconocimiento de las 6xHis-SUMO-TvNMNAT usando  $\alpha$ 6xHis-SUMO-TvNMNAT-IgY.** Inmunodetección, membrana de nitrocelulosa  $\alpha$ -chicken fosfatasa alcalina 1:10000

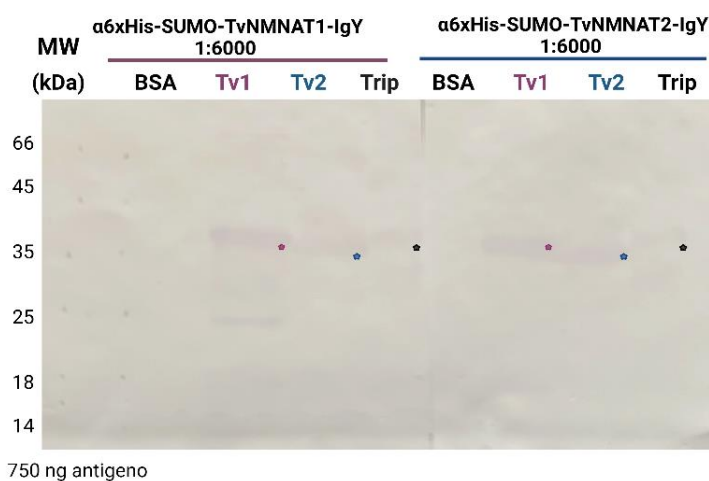


**Tabla 6-11. Predicción de epítomos de TvNMNAT1 y TvNMNAT2 por BepiPred 2.0.**

	TvNMNAT1	TvNMNAT2
<b>Epítomos predichos</b>		

<b>Secuencia de epítopes predichos</b>	GYKEKSGLAE	
	YETLQK	YIFKPGILS
	NQPCWE	TKWREP
	ESLDNLIEEV	EAVDLKS
	LQGEHK	HHIV
	EQNGL	

**Figura 6-27. Evaluación de reconocimiento cruzado de proteínas recombinantes TvNMNAT. Trip:** 6xHis-SUMO-LbTXNPxII. Inmunodetección, membrana de nitrocelulosa  $\alpha$ -chicken fosfatasa alcalina 1:10000.



Los anticuerpos obtenidos, como un producto adicional de este proyecto permitirán continuar con el estudio de las proteínas NMNAT de *Trichomonas vaginalis* en ensayos tales como inmunofluorescencia para determinar la localización subcelular de estas enzimas. Se espera igualmente que estos insumos constituyan un punto de partida para el desarrollo de sistemas de detección del parásito.



## **6.2 Búsqueda de candidatos a proteínas transportadoras de NAD<sup>+</sup> en parásitos extracelulares empleando herramientas computacionales.**

Los estudios acerca del metabolismo del NAD<sup>+</sup> en parásitos protozoarios ha permitido identificar una relación entre la forma de vida y el número de NMNAT, en donde en parásitos intracelulares se presenta una reducción en el número de NMNAT en contraste a parásitos extracelulares. Esta simplificación ha sido asociada con la obtención de energía del organismo y la distribución de NAD<sup>+</sup> en diferentes compartimientos subcelulares, estableciendo la necesidad de mecanismos de transporte del dinucleótido o sus precursores.

El análisis del metabolismo energético en parásitos intracelulares y la compartimentalización de las rutas asociadas al NAD<sup>+</sup> han llevado a identificar proteínas transportadoras de nucleótidos de la familia MCF capaces de movilizar el dinucleótido en estos organismos [121], [122] . En parásitos extracelulares, se han encontrado varias isoenzimas NMNAT, al igual como se determinó en este trabajo para *T. vaginalis*, no obstante, no se ha explorado la existencia de proteínas transportadoras, por lo cual se planteó “Realizar un acercamiento bioinformático en búsqueda de posibles transportadores del NAD<sup>+</sup> en protozoos extracelulares”. Para ello, se tomaron las secuencias de transportadores MCF-Ndt previamente identificados, con estos se obtuvieron secuencias consenso y mediante tBLASTn se buscaron posibles candidatos en la base de datos NCBI. Con los candidatos se realizaron análisis de estructura primaria, secundaria, terciaria y docking molecular como se muestra a continuación.

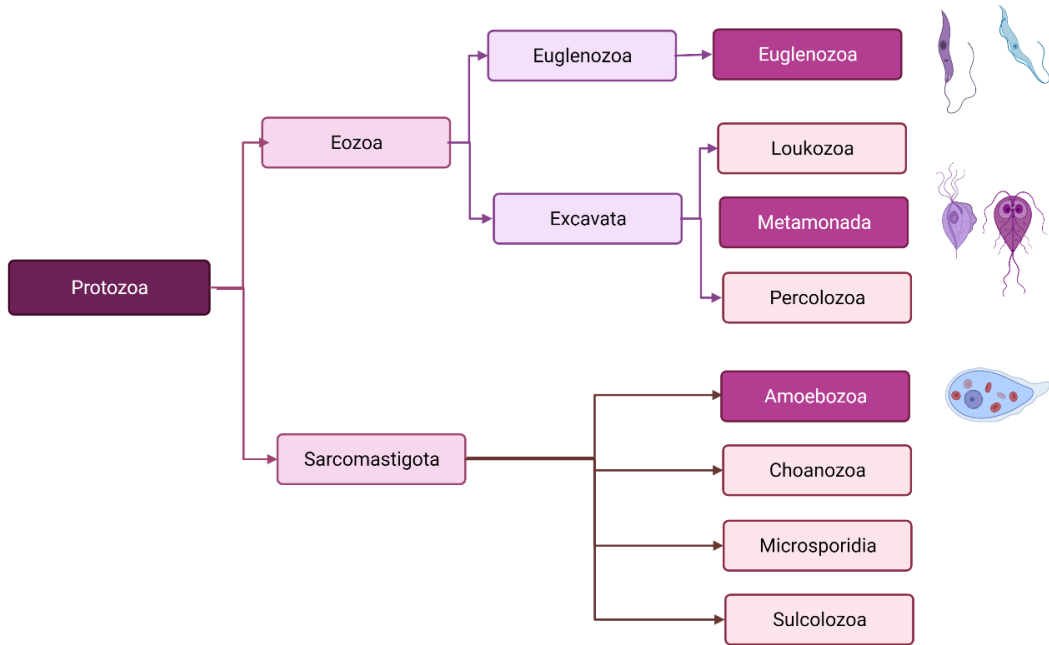
### **6.2.1 Alineamientos múltiples de transportadores de NAD<sup>+</sup> de la familia MCF- Ndt.**

Los parásitos protozoarios al ser organismos de gran divergencia pueden ser encontrados en diferentes grupos taxonómicos, se seleccionó una organización taxonómica en donde se establecen 8 phyla protozoa, siendo los phyla Euglenozoa, Metamonada y Amebozoa los que contienen especies parasitarias (Figura 6-28) [67].

Los protozoarios al ser organismos de gran diversidad y al ser eucariotas basales presentan algunas relaciones evolutivas con eucariotas superiores, por tanto, fueron

tomadas las secuencias proteicas de Ndt reportadas y las identificadas en el LIBBIQ [121], [122]; Con el propósito de realizar diversos alineamientos múltiples (Tabla 6-12).

**Figura 6-28. Clasificación taxonómica del reino Protozoa.** Organización taxonómica de los phylum protozoa [67].

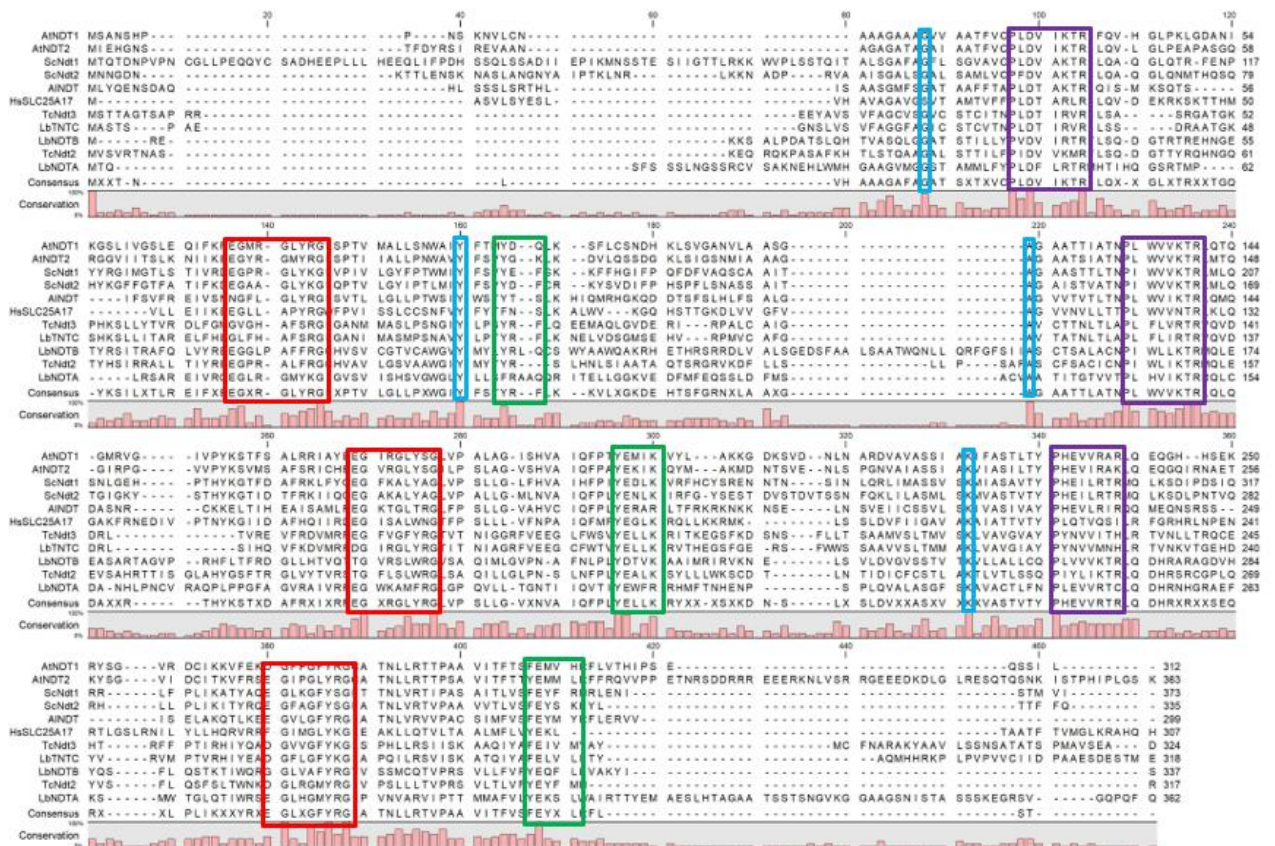


**Tabla 6-12. Transportadores MCF – Ndt reportados usados en los alineamientos múltiples.** Secuencias Ndt reportadas en NCBI (Azul) y secuencias de protozoos parásitos intracelulares identificadas en el LIBBIQ (Rojo).

Organismo	Transportadores MCF- Ndt	Códigos	Alineamientos múltiples							
			1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Leishmania braziliensis</i>	LbNdt1	XP_001568430.1	X	X						
	LbNdt2	XP_001567479.1	X	X						
	LbNdt3	XP_001563461.1	X	X						
<i>Trypanosoma cruzi</i>	TcNdtB	EKG04746.1	X	X						
	TcNdtC	EKG06478.1	X	X						
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ScNdt1	NP_012260.1	X		X		X		X	X
	ScNdt2	NP_010910.1	X		X		X		X	X
<i>Antonospora locustae</i>	PMP34	AAY27416.2	X		X					
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtNDT1	NP_566102.1	X		X	X		X		X
	AtNDT2	NP_001321077.1			X	X		X		X
<i>Homo sapiens</i>	SLC25A17	NP_001269655.1	X		X			X	X	

Los alineamientos múltiples fueron realizados en los programas CLC Main Workbench 21.0.3, Clustal omega y T-coffee, en donde los diferentes algoritmos de los programas permiten tener diversas secuencias consenso, realizando una aproximación diferencial para la obtención de los candidatos Ndt. En el alineamiento múltiple de las secuencias de los transportadores de NAD<sup>+</sup> de la familia MCF- Ndt reportados, se identifican los dos motivos hidrofóbicos PX [D / E] XX [K / R] X [K / R] (20–30 residuos) [D / E] GXXXX[W / Y / F] [K / R] G en tres secuencias en tándem, junto con los aminoácidos que conforman la red salina del lado citosólico siendo estas secuencias características de la familia de transportadores [123]. En este alineamiento también son identificados 4 residuos de G, Y, A y K altamente conservados. Se destacan en algunas proteínas variaciones e inserciones hacia el N- terminal (Figura 6-29).

**Figura 6-29. Alineamiento múltiple de transportadores de NAD<sup>+</sup> reportados.** Regiones hidrofóbicas (morado y rojo), red salina lado citosólico (verde) y residuos conservados (azul). Generado en el programa CLC Main Workbench 21.0.3. Candidatos reportados se encuentran en la Tabla 6-12.



## 6.2.2 Búsqueda y análisis a candidatos a transportadores de NAD<sup>+</sup> - Ndt

Las 24 secuencias consenso obtenidas con los alineamientos múltiples realizados (Anexo C), se utilizaron para realizar tBlastn en la plataforma del NCBI, permitiendo identificar algunos candidatos a transportadores de NAD<sup>+</sup> de la familia MCF-Ndt en parásitos extracelulares. Llama la atención el reducido número de genomas de parásitos extracelulares disponibles en la base de datos, ya que solo se encontraron 16 genomas de estos organismos (Tabla 6-13). Para la búsqueda fueron utilizadas las matrices BLOSUM 62 y BLOSUM45 para los alineamientos locales.

**Tabla 6-13. Parásitos extracelulares con genoma disponible en la base de datos NCBI.** Taxid: Base de datos taxonómica del organismo con genoma disponible.

Organismo	Taxid
<i>Trichomonas vaginalis</i>	5722
<i>Trichomonas gallinae</i>	56777
<i>Giardia duodenalis</i>	5741
<i>Trypanosoma brucei</i>	5691
<i>Spironucleus vortens</i>	58336
<i>Entamoeba histolytica</i>	5759
<i>Leptomonas pyrrocoris</i>	157538
<i>Enteromonas hominis</i>	460189
<i>Chilomastix</i>	450634
<i>Dientamoeba fragilis</i>	43352
<i>Herpetomonas muscarum</i>	5718
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	5728
<i>Retormonas</i>	193076
<i>Histomonas meleagridis</i>	135588
<i>Strigomonas oncopelti</i>	5657
<i>Angomonas deanei</i>	59799

Fueron analizadas 56 secuencias de las cuales se identificaron *in silico* 16 nuevos candidatos a transportadores de NAD<sup>+</sup> (Ndt) de la familia MCF solo en los protozoarios extracelulares *Trypanosoma brucei*, *Trichomonas vaginalis* y *Leptomonas pyrrocoris*.

Respondiendo al alto nivel de conservación del NAD<sup>+</sup> en parásitos extracelulares, algunos de estos organismos posiblemente no requieren un transporte interno, debido a las rutas de biosíntesis que se encuentran en los diferentes compartimientos subcelulares, donde es necesaria la presencia del dinucleótido para llevar a cabo procesos metabólicos, en forma similar a lo observado en *Homo sapiens* en donde se encuentran 3 isoenzimas NMNAT en núcleo, citoplasma y mitocondria. Junto con esto se

destaca, que en algunos parásitos se presentan organelos modificados como la mitocondria en *Giardia duodenalis* y *Entamoeba histolytica*. Este organelo que no genera ATP y está relacionado con la síntesis de grupos Fe-S necesarios para el ensamblaje de diversas proteínas [124], [125]. Por tanto, la simplificación de procesos en algunos organelos podría estar asociada con la ausencia de estos transportadores en los organismos descritos.

**Tabla 6-14. Candidatos a transportadores de NAD<sup>+</sup> (Familia MCF-Ndt).** Código de acceso de la secuencia génica y proteica en la base de datos NCBI.

Organismo	GenBank mRNA	GenBank Protein	Nombre de la Proteína
<i>Leptomonas pyrrocoris</i>	XM_015796809	XP_015664817.1	LpNdt1
	XM_015797555	XP_015663075.1	LpNdt2
	XM_015796914	XP_015664922.1	LpNdt3
	XM_015804934	XP_015656227.1	LpNdt4
	XM_015803209	XP_015657851.1	LpNdt5
	XM_015804935	XP_015656228.1	LpNdt6
	XM_015797557	XP_015663077.1	LpNdt7
<i>Trypanosoma brucei</i>	XM_824399	XP_829492.1	TbNdt1
	XM_824398	XP_829491.1	TbNdt2
	XM_823511	XP_828604.1	TbNdt3
	XM_822287	XP_827380.1	TbNdt4
	XM_823026	XP_828119.1	TbNdt5
	XM_842318	XP_847411.1	TbNdt6
	XM_824307	XP_829400.1	TbNdt7
<i>Trichomonas vaginalis</i>	XM_001328159	XP_001328194.1	TvNdt1
	XM_001582678	XP_001582728.1	TvNdt2
	XM_001308199	XP_001308200.1	TvNdt3

Las proteínas candidatas Ndt fueron analizadas teniendo en cuenta sus características, en donde su tamaño se encuentra entre 30 – 37 kDa junto con 3 dominios de repetición

en tándem de aproximadamente 50 aminoácidos delimitados por el motivo N- terminal PLDVVKTR y C- terminal GRGLYRG, donde los residuos de glicina y prolina se ubican en el sitio de unión al sustrato actuando como bisagras para la movilización del dinucleótido (Tabla 6-15)[126]. Teniendo en cuenta estas características estructurales, se observa que la repetición de los dominios pudo ser generado por triplicación de este dominio en dos hélices transmembranales, debido a una especialización de las estructuras por la constitución del dominio eucaria [21].

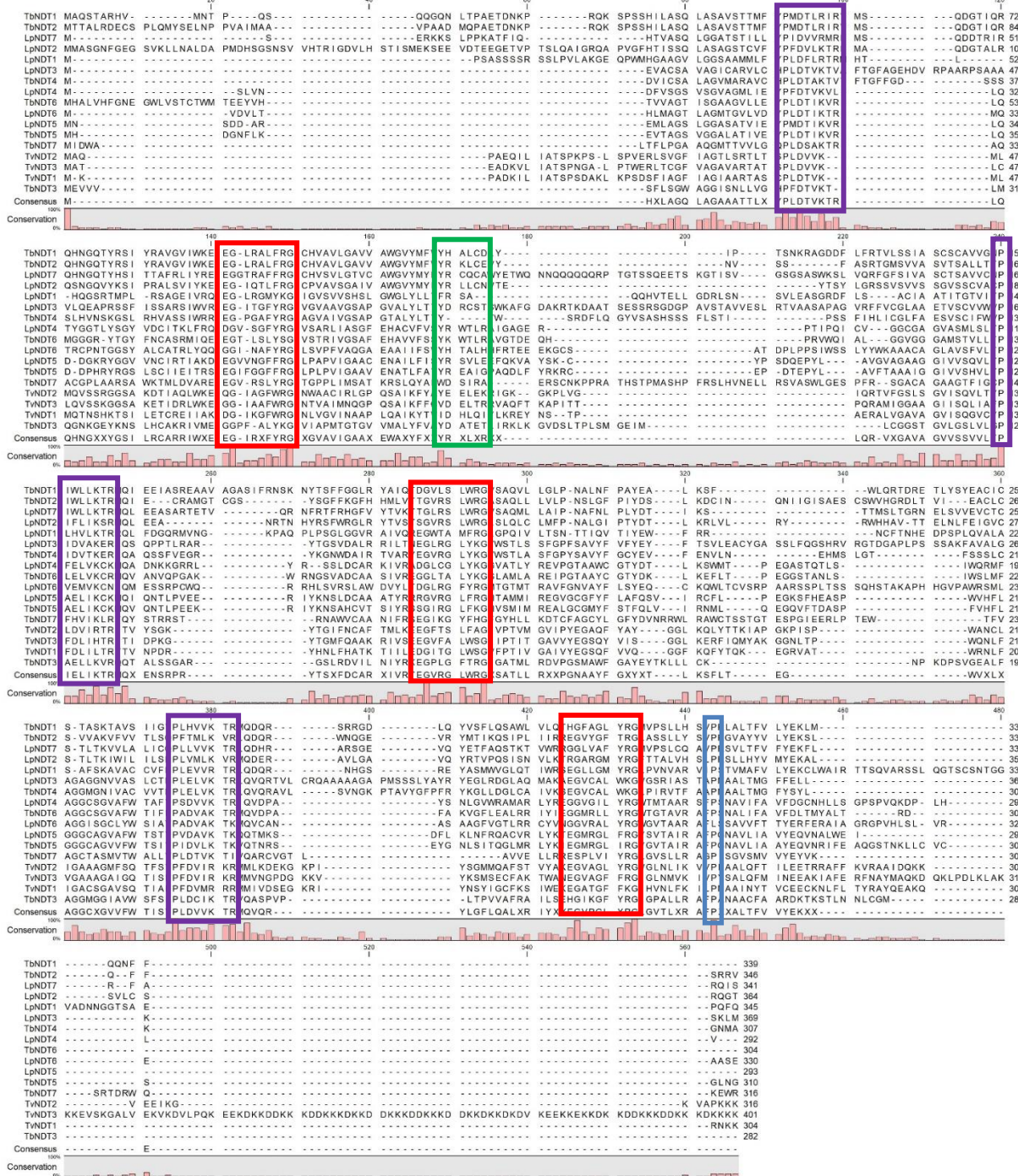
Los transportadores ortólogos se han descrito en variados organelos subcelulares como mitocondria, cloroplasto y peroxisoma, por lo cual la localización subcelular de los transportadores identificados se determinó mediante el servidor Deep-Loc 1.0, señalando ubicación de todos los candidatos en el compartimiento mitocondrial con valores de probabilidad entre 0,64-0,98 (Tabla 6-15). Sin embargo, cabe destacar que el parásito *T.vaginalis* no presenta mitocondria sino hidrogenosoma; en un estudio de este organelo mediante fraccionamiento celular y LC-MS/MS se identificaron posibles secuencias a transportadores de la familia MCF, los cuales corresponden a los candidatos TvNDT1, TvNDT2, TvNDT3 encontrados en esta aproximación bioinformática, posiblemente asociados con la necesidad de ATP/ADP en el hidrogenosoma [127], [128]. Por otra parte, también podría asociarse por el requerimiento de NAD/NADH debido a su uso en el complejo NADH deshidrogenasa involucrado en la producción de ATP en este organelo.

**Tabla 6-15. Características de los candidatos a transportadores de NAD<sup>+</sup> - Ndt.**  
Localización subcelular empleando el programa Deep-Loc 1.0.

Nombre de la Proteína	Tamaño		Dominios de Repetición en Tandem PX [D / E] XX [K / R] X [K / R] (20–30 residuos) [D / E] GXXXX[W / Y / F] [K / R] G		Localización subcelular / Probabilidad
	Gen (pb)	Proteína (aa)			
LpNDT1	1368	345	1	PLDFLRTR (22 residuos)EGLRGMKYK	Mitocondria 0,6786
			2	PLHVLKTR (31 residuos)EGWTAMFRG	
			3	PLEVVRTR (25 residuos)EGLLGMYRG	
LpNDT2	1413	364	1	PFDVLKTR (30 residuos) EGIQTLFRG	Mitocondria 0,9038
			2	PIFLIKSR (25 residuos) SGVRSLWRG	
			3	PLVMLKVR (26 residuos) RGARGMYRG	
LpNDT3	1814	369	1	PLDVTKTV (41 residuos)EGITGFYRG	Mitocondria 0,7788
			2	PIDVAKER (25 residuos)EGLRGLYK	
			3	PLELVKTR (42 residuos)EGVCALWKG	
LpNDT4	1350	292	1	PFDTVKVL(22 residuos) DGVSGFYRG	Mitocondria 0,9601
			2	PFELVKCK(25 residuos) DGLCGLYK	

			3	PSDVVKTR(21 residuos)EGGVGILYRG	
LpNDT5	1808	293	1	PMDTIKVR(21 residuos) EGVVNGFFRG	Mitocondria 0,9305
			2	PAELIKCK(27 residuos) RGVRLFRG	
			3	PVDAVKTK( 23 residuos) EGMRGLFRG	
LpNDT6	1598	330	1	PLDTIKTR(22 residuos) GGINAFYR	Mitocondria 0,9553
			2	PVEMVKCN(27 residuos)DGLRGFYRG	
			3	PADVAKTK(22 residuos) GGVRALYRG	
LpNDT7	1097	341	1	PIDVVRMR(29 residuos) EGGTRAFFRG	Mitocondria 0,6379
			2	PIWLLKTR(30 residuos)TGLRSLWRG	
			3	PLLVVKTR(26 residuos)GGLVAFYRG	
TbNDT1	1020	339	1	PMDTLRIR(30 residuos) EGLRALFRG	Mitocondria 0,8747
			2	PIWLLKTR (38 residuos)DGVLSLWRG	
			3	PLHVVKTR (26 residuos)HGFAGLYRG	
TbNDT2	1041	346	1	PMDTLRIR (30 residuos) EGLRALFRG	Mitocondria 0,7793
			2	PIWLLKTR (27 residuos) TGVRSLWRG	
			3	PFTMLKVR ( 26 residuos) EGVYGFTRG	
TbNDT3	849	282	1	PFDTVKTL (20 residuos) EGGPFALYKG	Mitocondria 0,9585
			2	PAELLKVR ( 23 residuos) EGPLGFTRG	
			3	PLDCIKTR ( 19 residuos) EHGKGFYRG	
TbNDT4	924	307	1	PLDTAKTV(31 residuos) EGPGAFYRG	Mitocondria 0,9505
			2	PIDVTKER (25 residuos) EGVRGLYKG	
			3	PLELVKTR (37 residuos) EGVCALWKG	
TbNDT5	933	310	1	PLDTIKVR(21residuos)EGIFGGFFRG	Mitocondria 0,9372
			2	PAELIKCK ( 27 residuos) SGIRGLFKG	
			3	PIDVLKTK ( 23 residuos) EGMRGLIRG	
TbNDT6	915	304	1	PLDTIKVR(21 residuos)EGTSLYSG	Mitocondria 0,9779
			2	PLELVKCR (26 residuos) EGGLTALYKG	
			3	PADVAKTR (21 residuos)EGGMRLLYRG	
TbNDT7	951	316	1	PLDSAKTR (22 residuos) EGVRSLYRG	Mitocondria 0,9294
			2	PFHVIKLR(22 residuos) EGIKGYFHG	
			3	PLDTVKTI (17 residuos) ESPLVIY	
TvNDT1	915	304	1	PLDTVKML(20 residuos)DGIKGFWRG	Mitocondria 0,9187
			2	PFDLILTR (21 residuos)DGITGLWSG	
			3	PFDVMRRR (25 residuos) EGATGFFKG	
TvNDT2	1072	316	1	PLDVVKML (19 residuos) EQGIAGFWRG	Mitocondria 0,9202
			2	PLDVIRTR (21 residuos) EGFTSLFAG	
			3	PFDVIRKR (25 residuos)EGVAGLYRG	
TvNDT3	1274	401	1	PLDVVKLC (19 residuos) EGGIAAFWRG	Mitocondria 0,9726
			2	PFDLIHTR (21 residuos)EGVFALWSG	
			3	PFDVIRKR (25 residuos)EGVAGFFRG	

**Figura 6-30. Alineamiento múltiple de los candidatos a transportadores de NAD<sup>+</sup> - Ndt.** Regiones hidrofóbicas (morado y rojo), red salina lado citosólico (verde) y residuos conservados (azul). Generados en el programa CLC Main Workbench 21.0.3





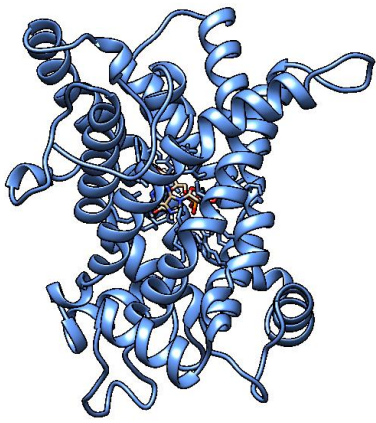
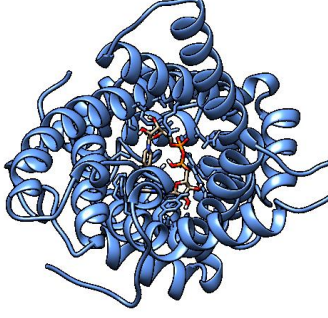
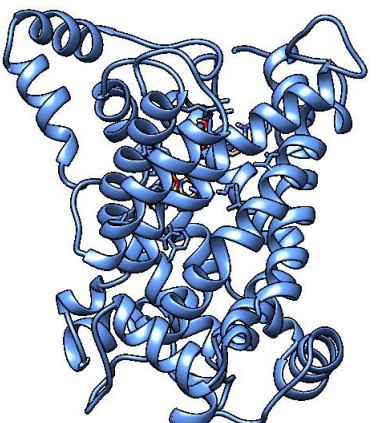
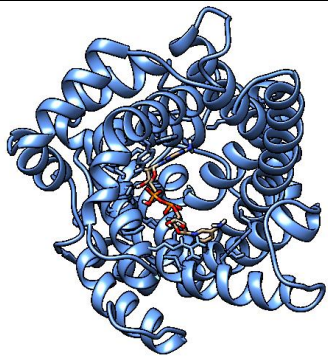
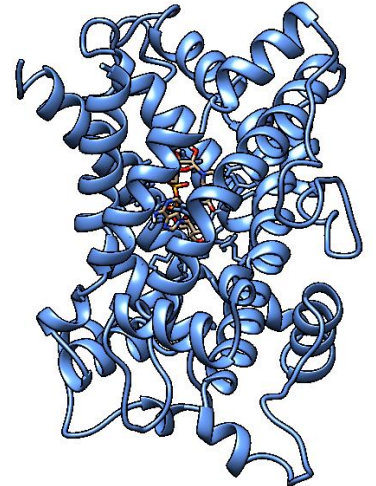
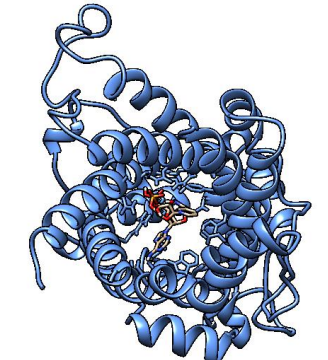
La topología de los candidatos Ndt fue predicha por el servidor PHYRE2, estas proteínas presentan una organización en 6 hélices transmembranales intercaladas con tres hélices pequeñas hacia el lado interno de la membrana. Los extremos N- y C- terminal de los candidatos se encuentran en ubicados en la cara exterior de la membrana. Exceptuando los candidatos LpNDT1 y TvNDT3 que presentan su extremo C-terminal hacia el lado citoplasmático y 7 hélices transmembranales (Anexo D) [121].

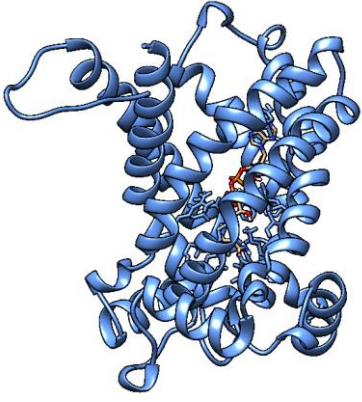
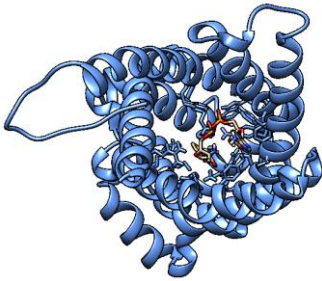
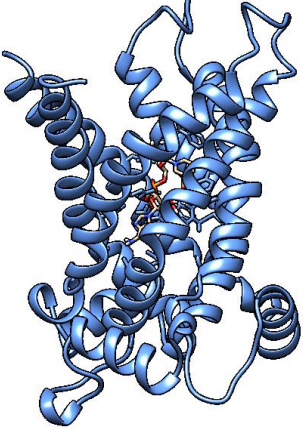
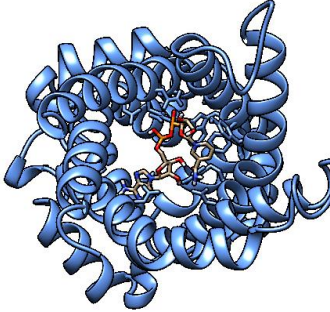
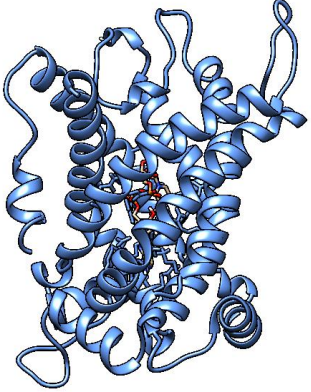
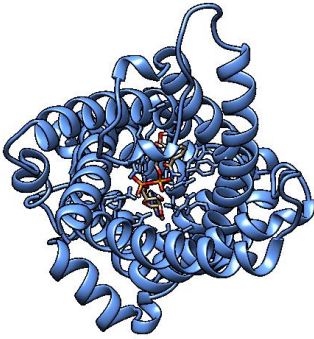
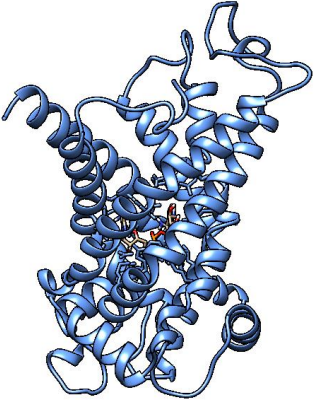
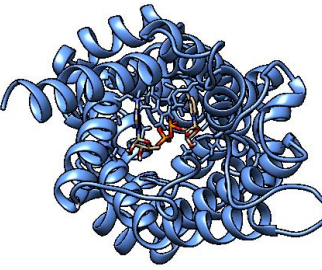
Los candidatos a Ndt fueron modelados en el software Robetta, estos presentan forma de barril constituido por las 6 -7 hélices  $\alpha$  con canal central altamente conservado [129]. La validación de las estructuras se realizó mediante el plot de Rammachandran y Swiss-Model, donde más del 92% de los aminoácidos de los candidatos están en las regiones favorecidas [130]. La superposición de los candidatos con transportadores de  $\text{NAD}^+$  de *Homo sapiens* (SLC25A17) y *Arabidopsis thaliana* (AtNDT1) previamente identificados obtuvieron valores de RMSD entre 0.9 y 1.2 Å demostrando su similitud estructural con las proteínas identificadas (Tabla 6-16). Se observa la presencia de regiones específicas hacia N-terminal de los candidatos con respecto a su ortólogo humano, los cuales podrían estar relacionados con interacción con el organelo subcelular en donde se encuentran ubicados.

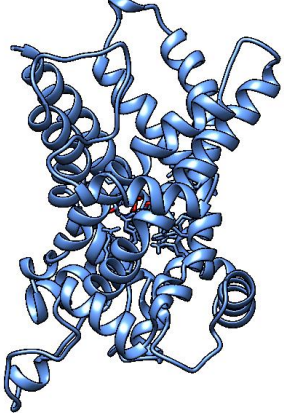

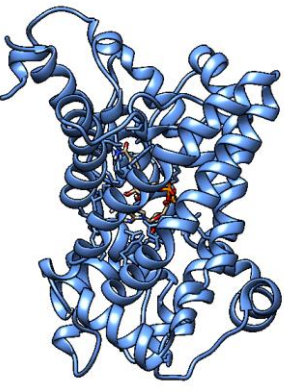
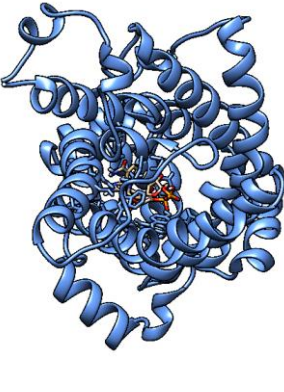
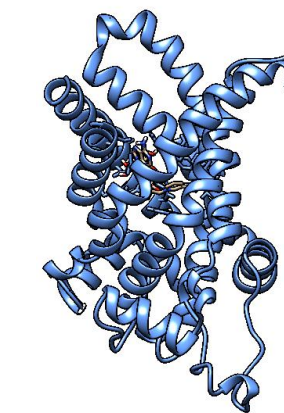
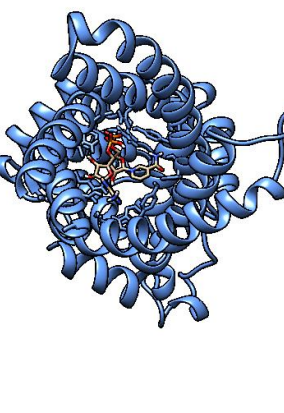
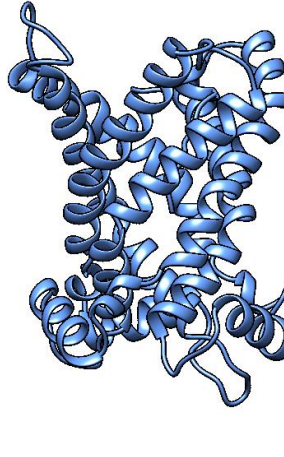
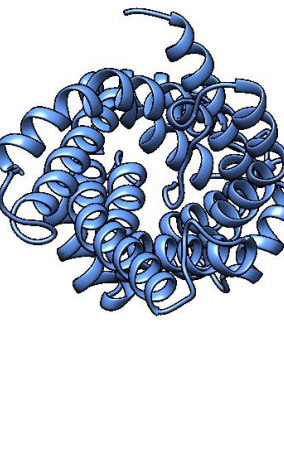
Se realizó un acoplamiento molecular con el propósito de analizar la interacción de los 16 candidatos a transportadores Ndt con el  $\text{NAD}^+$ , teniendo en cuenta que este es uno de los diferentes sustratos que pueden transportar estas proteínas [19]. Para lo cual mediante AutoDock Vina se calcularon las energías de unión de los candidatos a transportador y el  $\text{NAD}^+$  donde las interacciones se encuentran en el rango entre -10 y -8 kcal/mol, estos valores de unión se relacionan con la alta afinidad por el  $\text{NAD}^+$  al igual que lo observado para los transportadores ya identificados experimentalmente SLC25A17 y AtNDT1 a los cuales también se les calculo su energía de unión de -8,7 y -8,9 kCal/mol, respectivamente (Tabla 6-16).

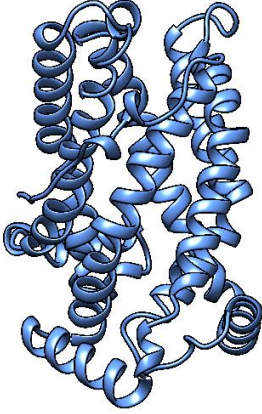
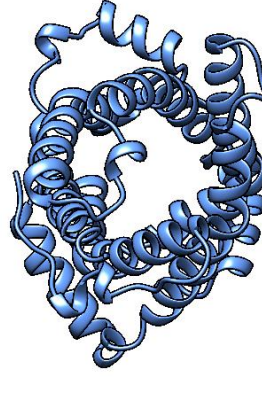
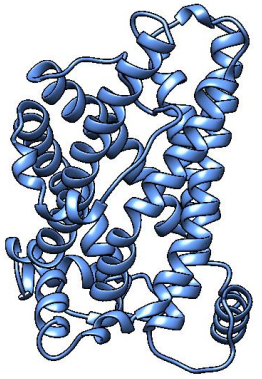
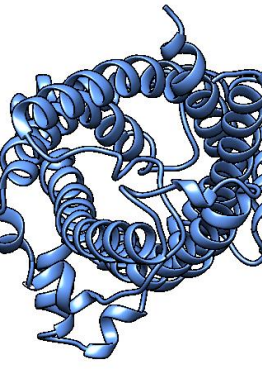
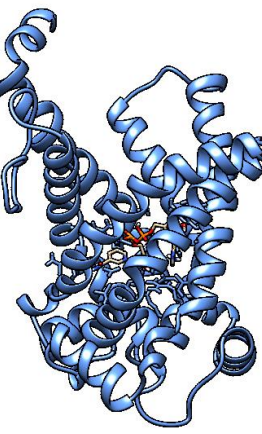
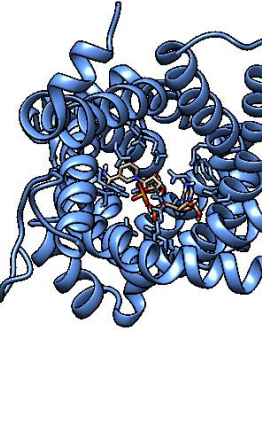
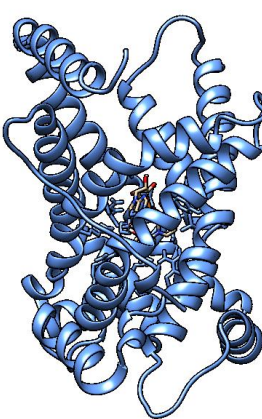

El análisis de interacciones entre el ligando y el transportador se evaluaron con LigPlot+, identificando interacciones principalmente con residuos altamente conservados de Arg, Ser y Thr aunque se presentan variaciones de algunos residuos cargados, modificando de esta forma los puentes de hidrógeno involucrados en el sitio de unión que permiten la movilización del dinucleótido (Tabla 6-16).

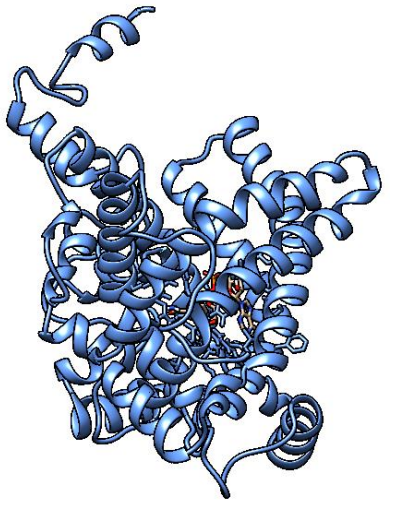

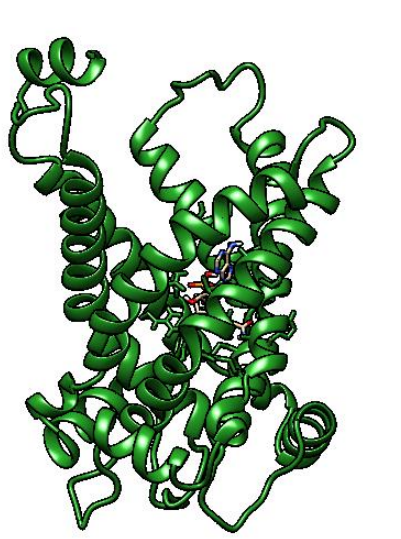
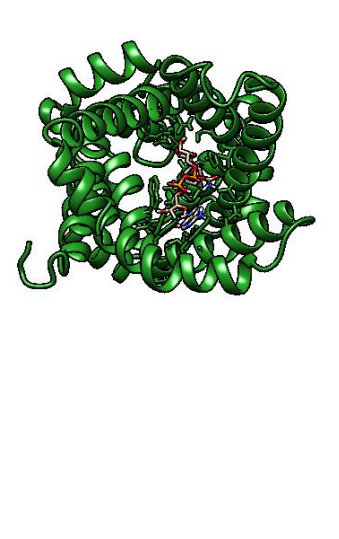
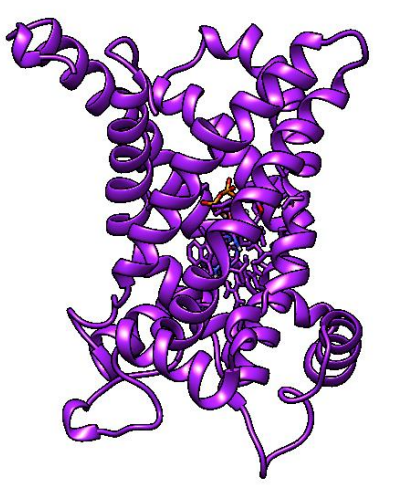
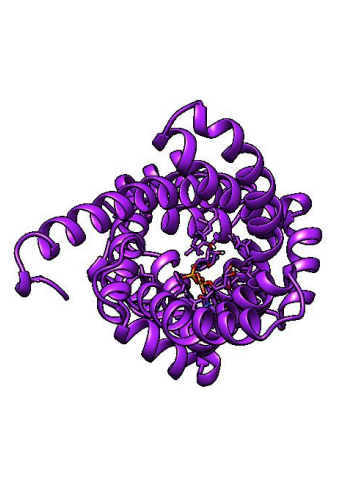
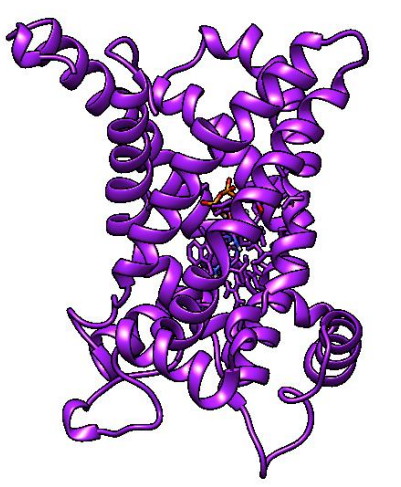
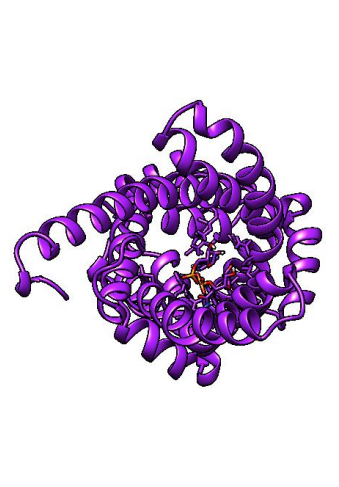
**Tabla 6-16. Análisis de los candidatos a transportadores de NAD<sup>+</sup> Ndt de la familia MCF. E.U: Energía de unión. RIS: Residuos que interactúan con sustrato (NAD<sup>+</sup>)**

Candidato Ndt	Vista lateral	Vista superior	Valores
LpNDT1			<b>E.U</b> -8,8 kCal/mol
			<b>RISN</b> Ser-86 His-87, Tyr-94, Ala-132, Thr-135, His-143, Arg-290, Ser-294, Thr-295
			<b>RMSD</b> <b>HsSLC25A17</b> 0,944 Å con 207 átomos <b>AtNDT1</b> 1,031 Å con 189 átomos
LpNDT2			<b>E.U</b> -9,1 kCal/mol
			<b>RISN</b> Ser-176, Ser-180, Ser-184, Arg-172, Gln-234, Asn-241.
			<b>RMSD</b> <b>HsSLC25A17</b> 1,052 Å con 201 átomos <b>AtNDT1</b> 1,031 Å con 189 átomos
LpNDT3			<b>E.U</b> -9 kCal/mol
			<b>RISN</b> Arg-14, Lys-24, Ser-84, Trp-164, Glu-286, Asn-353
			<b>RMSD</b> <b>HsSLC25A17</b> 1,043 Å con 180 átomos <b>AtNDT1</b> 1,128 Å con 173 átomos

LpNDT4			<b>E.U</b> -9,3 kCal/mol
			<b>RISN</b> Arg-163, Trp-209, Asp-216, Lys-219, Thr-220, Arg-259
			<b>RMSD</b> <b>HsSLC25A17</b> 1,117 Å con 178 átomos
			<b>AtNDT1</b> 1,130 Å con 192 átomos
LpNDT5			<b>E.U</b> -9,2 kCal/mol
			<b>RISN</b> Arg-175, Glu-176, Tyr-183, Trp-221, Arg-272, Asn-277
			<b>RMSD</b> <b>HsSLC25A17</b> 1,080 Å con 198 átomos
			<b>AtNDT1</b> 1,140 Å con 167 átomos
LpNDT6			<b>E.U</b> -9,5 kCal/mol
			<b>RISN</b> Lys-29, Thr-30, Gln- 70, Glu-73, Glu-131, Arg-179, Lys-254, Thr-255, Ala-295
			<b>RMSD</b> <b>HsSLC25A17</b> 1,082 Å con 195 átomos
			<b>AtNDT1</b> 1,189 Å con 185 átomos
LpNDT7			<b>E.U</b> -10 kCal/mol
			<b>RISN</b> Ser-28, Ser-85, Lys- 274, Ser-315, Gln- 318, Arg-322
			<b>RMSD</b> <b>HsSLC25A17</b> 1,173 Å con 200 átomos
			<b>AtNDT1</b> 1,081 Å con 206 átomos

TbNDT1			<p><b>E.U</b> -9,5 kCal/mol</p> <p><b>RISN</b> Ala-105, Trp-161, Thr-165, Ser-264, Lys-274, Ser-315, Arg322</p> <table border="1" data-bbox="1166 443 1375 615"> <tr> <td rowspan="2" style="text-align: center; vertical-align: middle;"><b>R M S D</b></td> <td><b>HsSLC25A17</b> 1,115 Å con 204 átomos</td> </tr> <tr> <td><b>AtNDT1</b> 1,146 Å con 202 átomos</td> </tr> </table>	<b>R M S D</b>	<b>HsSLC25A17</b> 1,115 Å con 204 átomos	<b>AtNDT1</b> 1,146 Å con 202 átomos
<b>R M S D</b>	<b>HsSLC25A17</b> 1,115 Å con 204 átomos					
	<b>AtNDT1</b> 1,146 Å con 202 átomos					
TbNDT2			<p><b>E.U</b> -9,5 kCal/mol</p> <p><b>RISN</b> Ser-54, Ser-58, Thr- 62, Asp-69, Arg-72, Tyr128, Gln211.</p> <table border="1" data-bbox="1166 835 1375 1014"> <tr> <td rowspan="2" style="text-align: center; vertical-align: middle;"><b>R M S D</b></td> <td><b>HsSLC25A17</b> 1,062 Å con 188 átomos</td> </tr> <tr> <td><b>AtNDT1</b> 1,141 Å con 193 átomos</td> </tr> </table>	<b>R M S D</b>	<b>HsSLC25A17</b> 1,062 Å con 188 átomos	<b>AtNDT1</b> 1,141 Å con 193 átomos
<b>R M S D</b>	<b>HsSLC25A17</b> 1,062 Å con 188 átomos					
	<b>AtNDT1</b> 1,141 Å con 193 átomos					
TbNDT4			<p><b>E.U</b> -9,4 kCal/mol</p> <p><b>RISN</b> Ser-6, Arg-14, Ser- 179, Asn-218, Arg- 284, Asn-291</p> <table border="1" data-bbox="1166 1182 1375 1434"> <tr> <td rowspan="2" style="text-align: center; vertical-align: middle;"><b>R M S D</b></td> <td><b>HsSLC25A17</b> 1,122 Å con 191 átomos</td> </tr> <tr> <td><b>AtNDT1</b> 1,168 Å con 161 átomos</td> </tr> </table>	<b>R M S D</b>	<b>HsSLC25A17</b> 1,122 Å con 191 átomos	<b>AtNDT1</b> 1,168 Å con 161 átomos
<b>R M S D</b>	<b>HsSLC25A17</b> 1,122 Å con 191 átomos					
	<b>AtNDT1</b> 1,168 Å con 161 átomos					
TbNDT5			<p><b>E.U</b> -8 kCal/mol</p> <p><b>RISN</b> Ala-205, His-210, Asn-278, Asn-289, Glu-293, Cys-305</p> <table border="1" data-bbox="1166 1633 1375 1898"> <tr> <td rowspan="2" style="text-align: center; vertical-align: middle;"><b>R M S D</b></td> <td><b>HsSLC25A17</b> 1,121 Å con 184 átomos</td> </tr> <tr> <td><b>AtNDT1</b> 1,097 Å con 177átomos</td> </tr> </table>	<b>R M S D</b>	<b>HsSLC25A17</b> 1,121 Å con 184 átomos	<b>AtNDT1</b> 1,097 Å con 177átomos
<b>R M S D</b>	<b>HsSLC25A17</b> 1,121 Å con 184 átomos					
	<b>AtNDT1</b> 1,097 Å con 177átomos					

TbNDT6			<p><b>E.U</b> - 8,3 kCal/mol</p> <p><b>RISN</b> Arg-143, Val-146, Lys-178,Arg-186, Met-245, Gln-246</p> <p><b>RMSD</b></p> <p><b>HsSLC25A17</b> 1,336 Å con 45 átomos</p> <p><b>AtNDT1</b> 1,323 Å con 25 átomos</p>
TbNDT7			<p><b>E.U</b> - 9,8 kCal/mol</p> <p><b>RISN</b> Gln-23, Ser-27, Met-47, Ser-58, Lys-149, Thr-158, Arg-158</p> <p><b>RMSD</b></p> <p><b>HsSLC25A17</b> 1,302 Å con 32 átomos</p> <p><b>AtNDT1</b> 1,389 Å con 53 átomos</p>
TvNDT1			<p><b>E.U</b> -9 kCal/mol</p> <p><b>RISN</b> Arg-35, Asp-42, Lys-45, Gln-125, Glu-179, Gln-217, Asp-224, Arg-227, Arg-228.</p> <p><b>RMSD</b></p> <p><b>HsSLC25A17</b> 1,099 Å con 201 átomos</p> <p><b>AtNDT1</b> 1,009 Å con 207 átomos</p>
TvNDT2			<p><b>E.U</b> -8,8 kCal/mol</p> <p><b>RISN</b> Arg-35, Arg-83, Asp-132, Arg-135, Tyr-178, Gln-220, Arg230</p> <p><b>RMSD</b></p> <p><b>HsSLC25A17</b> 1,085 Å con 188 átomos</p> <p><b>AtNDT1</b> 1,088 Å con 207 átomos</p>

TvNDT3			<b>E.U</b> -9,7 kCal/mol
			<b>RISN</b> Arg-35, Lys-45, Ala-80, Asp-134, Tyr-180, Glu-181, Gln-222, Ser-225, Lys-233.
AtNDT1			<b>RMSD</b> <b>HsSLC25A17</b> 1,112 Å con 188 átomos
			<b>AtNDT1</b> 1,046 Å con 185 átomos
HsSLC25A17			<b>E.U</b> - 8,9 kCal/mol
			<b>RISN</b> Thr-127, Thr-128, Ser-228, Thr-231, Arg-278, Arg-281.
HsSLC25A17			<b>E.U</b> - 8,7 kCal/mol
			<b>RISN</b> Ser -78, Asn-115, Trp-123, Leu -175

Fueron identificaron 16 posibles candidatos a proteínas transportadoras de NAD<sup>+</sup> de la familia MCF, los cuales tienen las características de transportadores previamente reportados y que permiten la movilización del dinucleótido a organelos como mitocondria e hidrogenosoma para la obtención de energía de los parásitos. Esta familia de transportadores no fue identificada en todos los protozoarios extracelulares analizados por lo que podrían existir otros tipos transportadores de NAD<sup>+</sup> o sus precursores. Por otra parte, la ausencia de estos transportadores podría corresponder o relacionarse a los múltiples procesos de biosíntesis del dinucleótido en estos parásitos, los cuales como dijimos presentan diferentes NMNATs. Los transportadores de NAD<sup>+</sup> están escasamente representados en el genoma humano y el estudio de estos transportadores podría ser promisorio para el desarrollo de nuevos blancos quimioterapéuticos.

## 7. Conclusiones

En este trabajo se identificaron y estudiaron en el parásito extracelular *T. vaginalis*, dos nuevas NMNAT. Estas enzimas se evaluaron mediante análisis *in silico*, en donde se estableció que presentan las características de la familia de nucleotidiltransferasas tales como sus dos sitios de unión a ATP, plegamiento tipo Rossmann e interacción con los sustratos mediante acoplamiento molecular. Las TvNMNAT al ser comparadas con sus ortólogas humanas presentan diferencias a nivel estructural, siendo las NMNAT identificadas más compactas y sin regiones de inserción, se destaca que las NMNATs del parásito presentan una alta similitud con la estructura de la HsNMNAT3.

Se desarrolló un acercamiento experimental, en donde las proteínas recombinantes denominadas 6xHis-SUMO-TvNMNAT1 y 6xHis-SUMO-TvNMNAT2 de 36,7 y 36,3 kDa se clonaron y expresaron en el sistema heterólogo *E. coli*. La actividad enzimática de las TvNMNAT fue corroborada y caracterizada mediante ensayos directos e indirectos usando como sustratos el NMN y ATP. Adicionalmente, mediante ensayos de oligomerización según gráficos de Ferguson se determinó una organización 1-mer, 2-mer y 3-mer.

Como apartado adicional, fueron generadas herramientas inmunológicas en el modelo aviar para la detección de la localización subcelular de estas enzimas, lo cual podría constituir un primer paso para el diagnóstico *T. vaginalis* en la población.

Finalmente, usando una aproximación bioinformática se identificaron 16 candidatos a transportadores de NAD<sup>+</sup> de la familia de transportadores mitocondriales MCF – Ndt en parásitos extracelulares. Aportando al entendimiento de las relaciones de los procesos de biosíntesis del dinucleótido y dinámicas intracelulares en estos protozoos.



## 7.1 Perspectivas

Este trabajo constituyó un primer acercamiento al metabolismo del NAD<sup>+</sup> en *Trichomonas vaginalis*. La identificación de dos enzimas claves en el metabolismo del dinucleótido representan el inicio de una línea de investigación utilizando este parásito extracelular. A continuación, se presentan algunas perspectivas para continuar el estudio de las NMNAT en este protozoo.

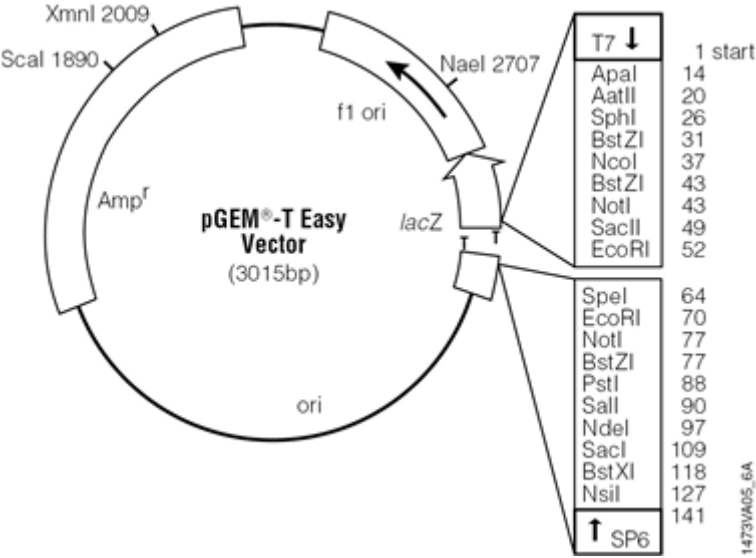
Teniendo en cuenta la caracterización enzimática es necesario continuar con este proceso de determinación de Km, Kcat y Vmax para los diferentes sustratos y realizar evaluación del efecto de cofactores enzimáticos. Con los resultados anteriores, se plantea el diseño y evaluación de diferentes tipos de inhibidores basados en el sustrato que presente la mayor afinidad, donde se podrían generar estrategias quimioterapéuticas para el control de esta parasitemia.

La aproximación de la estructura cuaternaria permitió determinar diversos estados de oligomerización usando gráficos de Ferguson, para corroborar estos resultados es necesario abordar otras técnicas analíticas como cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) e igualmente, analizar la oligomerización de las proteínas nativas al eliminar la etiqueta.

Es necesario con las herramientas inmunológicas generadas en este estudio, realizar análisis de localización subcelular usando técnicas de inmunofluorescencia.



# A. Anexo A – Mapa de los vectores utilizados



## B. Anexo B – Alineamientos múltiples de secuencias NMNAT de parásitos protozoarios.



## C. Anexo C - Secuencias consenso para la identificación de proteínas transportadoras de NAD<sup>+</sup> de la familia MCF.

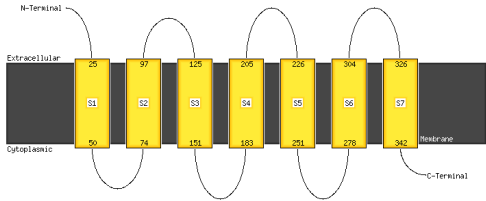
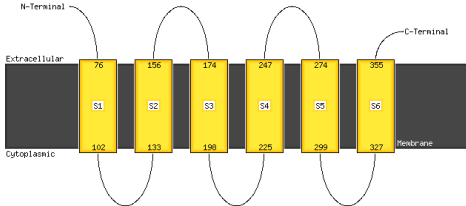
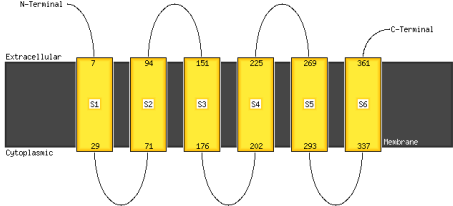
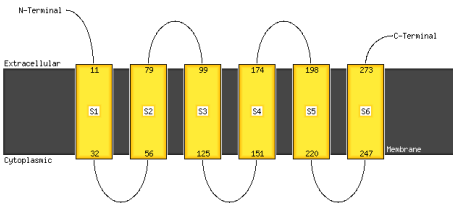
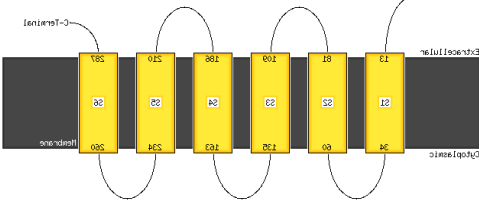
Secuencias consenso generadas con CLC MAIN WORKBENCH	
Alineamiento 1 (Todas las secuencias)	MXXTNLVHAAAGAFAGATSXTXVCPDVDVIKTRQLQXXGLXTRXXTGQYKSILXTLRE IFXEEGXRGLYRGLXPTVLGLLPXWGIYFSTYRFLKVKVLXGKDEHTSFGRNXLAA XGAGAATTLATNPLWVVKTRQLQDAXRTHYKSTXDAFRXIXRREGXRGLYRG LVPSLLGVXNVAIQFPLYELLKRYXXXSXXKDNSLXSLDVXXASVXKXVASTVTYP HEVVRTRLQDHRXRXSEQRXXLPLIKXXYRXLGLXGFYRGLATNLLRTVPAAVI TFVSFEYXLRFLST
Alineamiento 2 (Parásitos)	MKXXSXXXAPAREHXVSVXAGQFXGATSTCXTXPLDTIRTRXXSQDXXTRXXGK TXKSILRXXREIXREEGLXAFXRGLGVVXGSPXWGIYLTXYRALQAEXAQXGR GXXDDXXLXLAIGAXCTTTLXNPLWLIKTRXQLXDASACVLTXHEVFRDGMVLR REGFRGLXRGLSXQILXXVXXGXXXPLYELLKRXRXGXFKXXLSSXXVVSXSSX SKLVAVXXAYPXXVXTRQLQDHRNRTGRXEYVSFLXXXXTIWQADGLXGFYRGL XPXLLRXVPXXXLQFVXXEYXLAXAXYX
Alineamiento 3 (Proteínas identificadas)	MXXXDNTXSXSSVLSNLXAAAGAFAGAXAATFVCPDVDVAKTRQLVQGLQXSXXN QXGIFGLXXIXKXEGXRGLYRGLSPTVLGLLPTWXIYFSVYDXLKKXLHXXXPPX SFGXNLXAAIGAGAATXXTNPLWVVKTRMLQGIXRGPTXYKGTIDAFRXIIXYE GIXXLYXGLVPSLLGVXHVAIQFPLYEXLVXFXKXNXTSLNSQDVIIASSXXXI ASTVTYPHEVLRXRLQXXXIXNSEQRYGXLXLIKXTRXQEGXPGFYRGXATNLX RTVPAAVITFVSFEYMXRFLEVSTFX
Alineamiento 4 (Transportadores de <i>A. thaliana</i> )	MXXXXXXXXFDYRXXXXVXXNAXAGAXAGXXAATFVCPDVDVIKTRXQVXGLPXXX XXXXGXXIXXSLXXIXKXEGXRGXYRGLSPTXXALLXNWAXYFXXYXXLKKXXLS XDKLSXGXNXXAAXGAGAATXIATNPLWVVKTRLXTQGXRXXGVPYKSXXSAX XRIXEEGXRGLYSGXXPLAGXSHVAIQFPXYEXIKXYAKXXXXSVXNLXXXXV AXASSIAKXXASXLTYPHEVVRAXLQEQGXIRXXEXXYSVXDCIXKVFXXXGXP GXRYGCATNLLRTPXAVITFTXEMXXRFXXXXXPXETNRSDRRRREEERKNLV SRRGEEEDKDLGLRESQTQSXXXSTPHIPLGSK
Alineamiento 5 (Transportadores de <i>S. cerevisiae</i> )	MXXXDNPVPCNGLLPEQQYCSADHEEPLLLHEXXXXXXXXXXLXXXXXXXXPK XNXSTESIIGTTLXKXXPLSSTXXXAXSGAXXGLSXXXVCPXDVAKTRLQAQGL QXXTXXXXXXXXYGXXGTXTIXXDEGXXGLYKGLXPXVLGYXPTXMIYFSVYXFX KXXXIFPXXXFXXXXXAITAGAXSTXTNPIWVVKTRMLQXXXGXXXTHYKGT XDVFRKXXXQEGXKALYAGLVPLLXGXXVAIFPXYEXLXRFXCYSXXXXXT DVTXNXQLIXASXXSKMXASXVTYPHEILRTRMQLKSDXPXXXQRXLXPLIKXT YXQEGXXGFYSGFXTNLVRTXPAXXTLVSFEYXXXXLENIXTXXX
Alineamiento 6 (Transportadores de <i>A. thaliana</i> y Humanos)	MXXXXXXXXXSXEVXNAXAGAXAGVXAATFVCPDVDVIKTRQLVXGLPXXXDXXX KGXXIXXSLXXIIEEGXRGXYRGLSPTIXALLXNWAVYFXXYXXLKKXXLSXDHL SXGXNXXAAXGAGAATXIATNPLWVVKTRLXTQGXRXXGIVPYKSXXSAFXRIXXE EGIRGLYSGXXPSLAGVSHVAIQFPXYEXIKXYLAKKXXKSVXNLXXXDVAISSIA KXIASTLTYPHEVVRAXLQEQGHXXNXXEXRYSVXDCIXKVFXXGIPGLYRGCA TNLLRTPXAVITFTXYEMXXRFXXTVXPXEGLXXXXXQXXXX
Alineamiento 7 (Transportadores de <i>S. cerevisiae</i> y Humanos)	MXXXDNTXXXXXXXXXXSLSXXXXXXXXPKXNXLKXXXPVXAXSGAXXGXLXSSX XVCPDVDVAKTRLQAQGLQXRXXXXXHYXGXXGTLXTIXKDEGXXGLYKGLXPXVL GYXPTXMIYFSVYXFKKXXVXIFPHSFXXXXXXAITAGAXSTXLTNPIWVVKTRL MLQXXXGXXPTHYKGTIDAFRXXIXQEGXKALYAGLVPSLLGXFNVAIQFPXYEXL KXRFYXXXXXXXXXXXXSSNLQXLIXASXVSKMIASVTYPHEILRTRMQLKSDXP NXXQRXLXPLIKITYRQEGXXGFYSGFXTNLVRTVPAAXTLVSFEYKXXLXXXT

	TMXX
Alineamiento 8 ( <i>S. cerevisiae</i> y <i>A. thaliana</i> )	MXXXDNPTXXXXXXXVLANPKNLKPAXXGAXAGALXATFVCPLDVXKTRLQXQ GLXXXXXXXXNQXXXGIXGLXTIFKDEGXRGLYXGLSPTVLXXLPXWXYFVSYDFL KKFLXSIXPKLSFGXNXXAAIXAGAAXTIATNPXWVVKTRLMXQGIXGXXXKXT FXAFRXIXYEGXXXLYXGLVPXLXGXSHVAIQFPXYEXXKVXFYKXXXTSVDXL NXQXXXASSIXKMIASTXTYPHEXLRXRQXXXDIPNSEQRYSGXXXIKKXRX QEGFPGFYXGXATNLXRTTPAAVITXXSFEXXRFLXXXPEQSTXXX

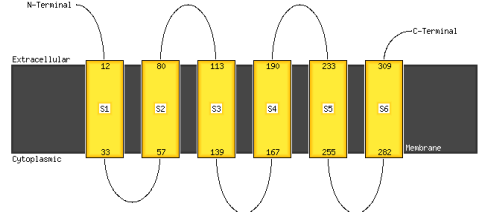
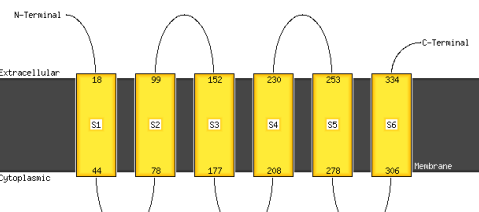
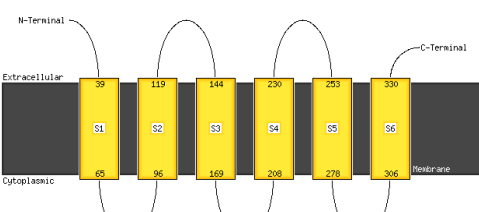
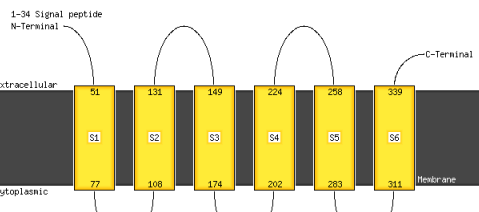
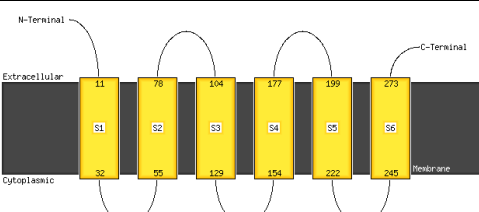
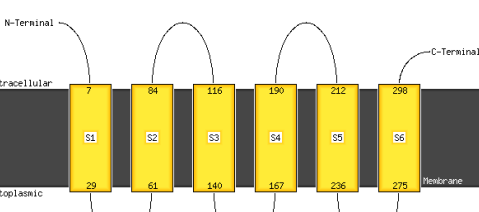
	<b>Secuencias consenso generadas con CLUSTAL OMEGA</b>
Alineamiento 1 (Todas las secuencias)	SXXSSPKSAESLVHAAAGAFAGATSXTXVCPLDVIKTRLQSQGLXGQYKSILXTL REIFXEEGLRGLYRGLXPTVLGLLPXWGIYFSTYRFLKXXLXGXDEHXSFXLNL XAIGAGAATTLATNPLWVVKTRLQLQDAXGVGPTHYKSTXDAFRXIXRREGXR GLYRGLVPSLLGVFHVAIQFPLYELLKRYXXKXSXKVNLXSLDVXXASVXKXVA STVTYPHEVVTRLQDHRXRXXSEQRXXLPLIKXXYRXEGLXGFYRGLATNLLR TVPAAVITFVSFEYXLRXLXTVXP
Alineamiento 2 (Parásitos)	XXSKXSXPKXXXSLVHXFAGQXXGAXSTCXXXPLDXIRXRXXSQXGXTGXXHX GLTYSIXRXAREXXREEGGLXAFXRGXGVXVMXSVPXWGXLYXXYRFLQNEXA AXGAXESGVDFLRPFLCAIGAXCTTXXLTXPLXLIKTRXQLDXAXRVFXGXR XVRRXGFRXLXRGXSXQILLVXXGLXWXXYELLKRXTXEGSFKXXLSSXXVVS LSXVXKLVAVXLAXPNVVKTXLQDHRXRTGXXEYVSFLXXXRXIWDGLVGF YRGLVPSLLRXVPXXLQXVXYEQFLHRAKYXXPAASS
Alineamiento 3 (Proteínas identificadas)	MXXSVLSREVLXNAAXGAFAGAXAATFVCPLDVAKTRLQVQGLXKNQXKGFIFG XLXXIXKXEGXRGLYRGLSPTVLGLLPTWXYFVSYDXLKKFLHXIXPXXSFGXN LXAAIGAGAATTTXNPLWVVKTRMLQGIXXGPTXYKGTIDAFRXIIXYEGIXL YXGLVPSLLGVXHVAIQFPLYEXLKVXFAKXNKSXXLNSQDVIIASSXXKXIAS TVTYPHEVLRXRLQXXXIXNSEQRGXLLIKXTXRQEGXPGFYRGXATNLXRT VPAAVITFVSFEYMXRFLETVPPE
Alineamiento 4 (Transportadores de <i>A. thaliana</i> )	No disponible
Alineamiento 5 (Transportadores de <i>S. cerevisiae</i> )	No disponible
Alineamiento 6 (Transportadores de <i>A. thaliana</i> y Humanos)	MXSXXXXXXXXSXEVLXNAXAGAXGVXAATFVCPLDVIKTRLQVXGLPKXXXXXXXX XGXIXXSLXXIIEEGXRGRYRGLSPTIXALLXNWAYFXXYXXLXXLXSXDH KLSXGXNXXAAXGAGAAXIATNPLWVVKTRLXTQGXRXGVYKXSXXSAFXRI XXEEGIRGLYSGXXPSLAGVSHVAIQFPXYEXIKXYLAKKXXXSVXNLSXXDVAI ASSIAKXIASTLTYPHEVVRAXLQEQGHXXNXEXRYSGVXDCIXKVFRXXGIPGL YRGCATNLLRTPXAVITFTYEMXXRFXXTVXPXXXXXX
Alineamiento 7 (Transportadores de <i>S. cerevisiae</i> y Humanos)	MXXXDXXXLXXXXXXXXLXXXXXXXXPKXXXVXXXXXXXXVXAXSGAXXGLSX XXVCPLDVAKTRLQAQGLQXXXXXXXXYKGGXGTLXTIXKDEGXXGLYKGLXPX VLGYXPTXMIYFVYXFKKXXVXIFPHSFXXXXXXXXXAITAGAXSTXLNPIWVVK TRLMLQXXXGXXPTHYKGTIDAFRKIIXQEGXKALYAGLVPSSLGXFNVAIQFPX YEXLKXRFXXXXXXXXXXSNXQXLIXASXVSKMIASTVTYPHEILRTRMQLKSD XPXXXQRXLLPLIKXTYRQEGXXGFYSGFXTNLVRTVPAAXATLVSFEYXXXXL XTFXXMXX
Alineamiento 8 ( <i>S. cerevisiae</i> y <i>A. thaliana</i> )	MDLLXIEPKMXXXXXXXXXXXXVXXNAXXGAXAGALXATFVCPLDVXKTRLQXQ GLXXXXXXXXNQXXXGIXGLXTIFKDEGXRGLYXGLSPTVLXXLPXWXYFVSYDF LKKFLXSIXPKLSFGXNXXAAIXAGAAXTIATNPXWVVKTRLMXQGIXGXXXK XTFXAFRXIXYEGXXXLYXGLVPXLXGXSHVAIQFPXYEXXKVXFAKXXXTSVX XLNXQXXXASSIXKMIASTXTYPHEXLRXRQXXXDIPNSEQRYSGXXXIKKX XRQEGFPGFYXGXATNLXRTTPAAVITXXSFEXXRFLXTXXPEX

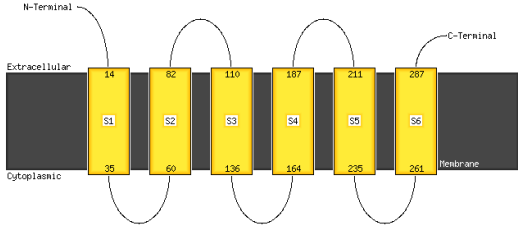
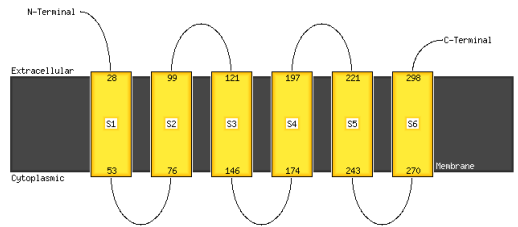
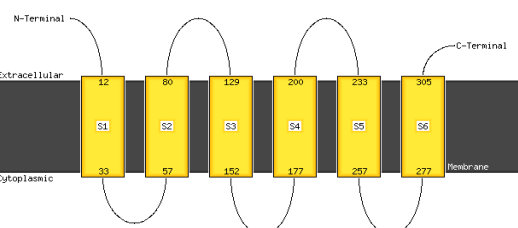
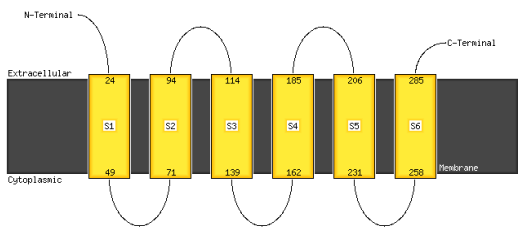
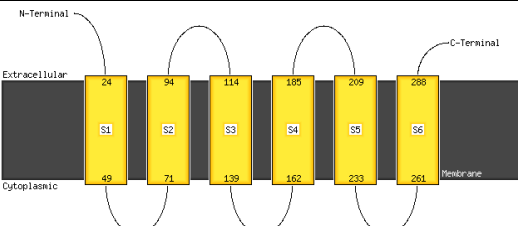
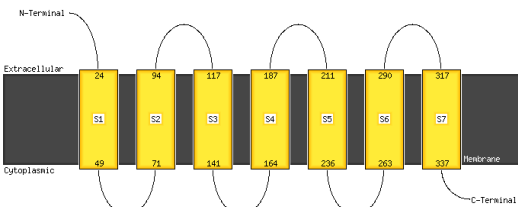
	<b>Secuencias consenso generadas con T-Coffee</b>
Alineamiento 1 (Todas las secuencias)	MXSTXNSXNAESLVHAAAGAFAGATSXTXVCPLDVIKTRLQSQGLXTGQYKSIL XTLREIFXEEGLRGLYRGLXPTVLGLLPXWGIYFSTYRFLKXXLVXXGXQSFXLN LLXAIGAGAATTLATNPLWVVKTRQLQDAXXPPTHYKXFDAFRXIXRREGXR GLYRGLVPSLLGVFHVAIQFPLYELLKRYXXKXSNKXNLXSLDVXXASVXKXVA STVTYPHEVVRTRLQDHRXRXETXYXSXLPLIKXXYRXEGLXGFYRGLATNLL RTVPAAVITFVSFEYXLRXLXTVV
Alineamiento 2 (Parásitos)	MXSTXSXLPEXXSLVHXFAGQXXGAXSTCXXXPLDXIRXRXSSQXGXTXXPHK SXLRXAREXXREEGLXAFXRGXGVXVMXSVXPWGXYLXXYRFLQNEAALGA TRXEXLXPFLCAIGAXCTTTLTXPLXLIKTRXQLDXAXRVFXGXRDXVRRXG FRXLXRGXSXQILLVXXGLXWXXYELLKRXTXEGSFKXXLSFLXVVSLSXVVKL VAVXLAXPXNVVKTXLQDHRXRTGXEXVSFLXXXRXXIWXQADGLVGFYRGLVP SLLRXVPXXXLQXVXYEXXLXARAKYXXSAAASST
Alineamiento 3 (Proteínas identificadas)	MXXXDNXTXSREVLXNAAXGAFAGAXAATFVCPLDVAKTRLQVQGLQNQKXX GIFGLXXIXKXEGXRGLYRGLSPTVLGLLPTWXIYFSVYDXLKKFLVSIXPXXSF GXNLXAAIGAGAATTTXNPLWVVKTRMLQGARXGPTXYKGTDAFRXIIYXE GIXLYXGLVPSLLGVXHVAIQFPLYEXLKVXFAXKXNXSVXXLNSQDVIIASSXX KXIASTVTYPHEVLRXRLQXXXXIXETRXGXLLIKXTXRQEGXPGFYRGXATN LXRTVPAAVITFVSFEYMXRFLETVVPL
Alineamiento 4 (Transportadores de <i>A. thaliana</i> )	No disponible
Alineamiento 5 (Transportadores de <i>S. cerevisiae</i> )	No disponible
Alineamiento 6 (Transportadores de <i>A. thaliana</i> y Humanos)	MXXXXXXXXXSXEVXNAXAGAXGVXAATFVCPLDVIKTRLQVXGLPKXXXXXX XGXXIXXSLXXIIKEEGXRGXYRGLSPTIXALLXNWAIFYXXYXXLXXLXSXDH KLSXGXNXAAAGAGAATXIATNPLWVVKTRLXTQGXRXGIVPYKSXXSAFXRI XXEEGIRGLYSGXXPSLAGVSHVAIQFPXYEXIKXYLAKKXXXSVXNLSXXDVAI ASSIAKXIASTLTYPHEVVRAXLQEQGHXXNXEXRYSGVXDCIXKVFRXXGIPGL YRGCATNLLRTPXAVITFTXYEMXXRFXXTVXPXXXXXXGLXXXXXX
Alineamiento 7 (Transportadores de <i>S. cerevisiae</i> y Humanos)	MXXXDNXXXLXXXXXXXXLXXXXXXXXPXKNXXXXXXXXXXVXAXSGAXXGLSX XXVCPLDVAKTRLQAQGLQXXXXXXXXYKGGXGTLXTIXKDEGXXGLYKGLXPX VLGYXPTXMIYFSVYXFXXXXXXIFPHSFXXXXXXXXXAITAGAXSTXLTNPIWVVK TRLMLQXXGXXPXYKGTIDAFRXXIXQEGXKALYAGLVPSSLGXFNVAIQFPX YEXLXRFXXXXRXXXXXSNLQXLIXASXVSKMIASVTYPHEILRTRMQLKSD XPNXXQRXLLPLIKXTYRQEGXXGFYSGFXTNLVRTVPAAXTLVSFEYXXXXL XTFXXMXX
Alineamiento 8 ( <i>S. cerevisiae</i> y <i>A. thaliana</i> )	MXXXDNPTXXXXXSLPKNXVXXNAXXGAXAGALXATFVCPLDVXKTRLQXQG LXXXXXXXXNQXXGIXGLXTIFKDEGXRGLYXGLSPTVLXXLPXWXYFVYDFL KKFLXSIXPKLSFGXNXAAIXAGAAXTIATNPXWVVKTRLMXQGIXGXXYKX TFXAFRXIXYEGXXXLYXGLVPLXGXSHVAIQFPXYEXKXVXFAXSXXTSVXX LNQXXXXASSIXKMIASXTYPHEXLRXRXQXXXDIPNXXXXGXXXXIKXXXRQ EGFPGFYXGATNLXRTTPAAVITXXSFEXXRFLTXPESTI

## D. Anexo D – Topología de los candidatos a transportadores de la familia MCF - Ndt

Nombre de la Proteína	TOPOLOGIA DE LOS CANDIDATOS	Número de hélices transmembranales
LpNDT1	 <p>Diagram illustrating the topology of LpNDT1. The protein is shown with 7 transmembrane helices. The N-terminus is extracellular and the C-terminus is cytoplasmic. The helices are numbered 1-7, with their start and end residues indicated: Helix 1 (25-51), Helix 2 (51-74), Helix 3 (74-151), Helix 4 (151-183), Helix 5 (183-226), Helix 6 (226-278), and Helix 7 (278-342).</p>	7
LpNDT2	 <p>Diagram illustrating the topology of LpNDT2. The protein is shown with 6 transmembrane helices. The N-terminus is extracellular and the C-terminus is cytoplasmic. The helices are numbered 1-6, with their start and end residues indicated: Helix 1 (76-102), Helix 2 (102-133), Helix 3 (133-156), Helix 4 (156-174), Helix 5 (174-225), Helix 6 (225-299), and Helix 7 (299-327).</p>	6
LpNDT3	 <p>Diagram illustrating the topology of LpNDT3. The protein is shown with 6 transmembrane helices. The N-terminus is extracellular and the C-terminus is cytoplasmic. The helices are numbered 1-6, with their start and end residues indicated: Helix 1 (7-29), Helix 2 (29-71), Helix 3 (71-94), Helix 4 (94-151), Helix 5 (151-202), Helix 6 (202-293), and Helix 7 (293-337).</p>	6
LpNDT4	 <p>Diagram illustrating the topology of LpNDT4. The protein is shown with 6 transmembrane helices. The N-terminus is extracellular and the C-terminus is cytoplasmic. The helices are numbered 1-6, with their start and end residues indicated: Helix 1 (11-30), Helix 2 (30-56), Helix 3 (56-72), Helix 4 (72-99), Helix 5 (99-174), Helix 6 (174-198), Helix 7 (198-220), and Helix 8 (220-247).</p>	6
LpNDT5	 <p>Diagram illustrating the topology of LpNDT5. The protein is shown with 6 transmembrane helices. The N-terminus is cytoplasmic and the C-terminus is extracellular. The helices are numbered 1-6, with their start and end residues indicated: Helix 1 (82-100), Helix 2 (100-134), Helix 3 (134-154), Helix 4 (154-181), Helix 5 (181-202), Helix 6 (202-222), Helix 7 (222-281), and Helix 8 (281-300).</p>	6



<p>LpNDT6</p>		<p>6</p>
<p>LpNDT7</p>		<p>6</p>
<p>TbNDT1</p>		<p>6</p>
<p>TbNDT2</p>		<p>6</p>
<p>TbNDT3</p>		<p>6</p>
<p>TbNDT4</p>		<p>6</p>

<p>TbNNT5</p>		<p>6</p>
<p>TbNNT6</p>		<p>6</p>
<p>TbNNT7</p>		<p>6</p>
<p>TvNNT1</p>		<p>6</p>
<p>TvNNT2</p>		<p>6</p>
<p>TvNNT3</p>		<p>7</p>

## Bibliografía

- [1] I. Mesquita *et al.*, “Exploring NAD<sup>+</sup> metabolism in host-pathogen interactions,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 73, no. 6, pp. 1225–1236, 2016, doi: 10.1007/s00018-015-2119-4.
- [2] C. Cantó, K. J. Menzies, and J. Auwerx, “NAD<sup>+</sup> Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus,” *Cell Metab.*, vol. 22, no. 1, pp. 31–53, 2015, doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.023.
- [3] WHO (World Health Organization), “Vector-borne diseases,” 2017. .
- [4] N. Forero-Baena, D. Sánchez-Lancheros, J. C. Buitrago, V. Bustos, and M. H. Ramírez-Hernández, “Identification of a nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenylyltransferase in *Giardia lamblia* (GINMNAT),” *Biochim. Open*, vol. 1, pp. 61–69, 2015, doi: 10.1016/j.biopen.2015.11.001.
- [5] C. H. Niño, N. Forero-Baena, L. E. Contreras, D. Sánchez-Lancheros, K. Figarella, and M. H. Ramírez, “Identification of the nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase of *Trypanosoma cruzi*,” *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 110, no. 7, pp. 890–897, 2015, doi: 10.1590/0074-02760150175.
- [6] L. E. Contreras, R. Neme, and M. H. Ramírez, “Identification and functional evaluation of *Leishmania braziliensis* Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 115, pp. 26–33, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.pep.2015.08.022.
- [7] L. Rajman, K. Chwalek, and D. A. Sinclair, “Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence,” *Cell Metab.*, vol. 27, no. 3, pp. 529–547, 2018, doi: 10.1016/j.cmet.2018.02.011.
- [8] S. ichiro Imai and L. Guarente, “NAD<sup>+</sup> and sirtuins in aging and disease,” *Trends Cell Biol.*, vol. 24, no. 8, pp. 464–471, 2014, doi: 10.1016/j.tcb.2014.04.002.
- [9] S. A. Trammell and C. Brenner, “Targeted, Lcms-Based Metabolomics for Quantitative Measurement of Nad + Metabolites,” *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 4, no. 5, p. e201301012, 2013, doi:

- 10.5936/csbj.201301012.
- [10] T. G. Demarest *et al.*, "Assessment of NAD + metabolism in human cell cultures, erythrocytes, cerebrospinal fluid and primate skeletal muscle," *Anal. Biochem.*, vol. 572, no. February, pp. 1–8, 2019, doi: 10.1016/j.ab.2019.02.019.
- [11] K. Yaku, K. Okabe, and T. Nakagawa, "NAD metabolism: Implications in aging and longevity," *Ageing Res. Rev.*, vol. 47, no. May, pp. 1–17, 2018, doi: 10.1016/j.arr.2018.05.006.
- [12] S. ichiro Imai and S. Johnson, "NAD<sup>+</sup> biosynthesis, aging, and disease," *F1000Research*, vol. 7, no. 0, pp. 1–10, 2018, doi: 10.12688/f1000research.12120.1.
- [13] E. F. Fang *et al.*, "NAD<sup>+</sup> in Aging: Molecular Mechanisms and Translational Implications," *Trends Mol. Med.*, vol. 23, no. 10, pp. 899–916, 2017, doi: 10.1016/j.molmed.2017.08.001.
- [14] G. Noctor, J. Hager, and S. Li, *Biosynthesis of NAD and its manipulation in plants*, 1st ed., vol. 58. Elsevier Ltd., 2011.
- [15] Y. ; Yang and S. Anthony, "NAD<sup>+</sup> metabolism: Bioenergetics, signaling and manipulation for therapy," *Dtsch. Krankenpflegez.*, vol. 44, no. 7, pp. 492–494, 2016, doi: 10.1016/j.bbapap.2016.06.014.NAD.
- [16] C. Lau, "The NMN/NaMN adenylyltransferase (NMNAT) protein family," *Front. Biosci.*, vol. Volume, no. 14, p. 410, 2009, doi: 10.2741/3252.
- [17] I. Hanukoglu, "Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites," *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, vol. 43, no. 3, pp. 206–209, 2015, doi: 10.1002/bmb.20849.
- [18] S. Todisco, G. Agrimi, A. Castegna, and F. Palmieri, "Identification of the mitochondrial NAD<sup>+</sup> transporter in *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 3, pp. 1524–1531, 2006, doi: 10.1074/jbc.M510425200.
- [19] F. Palmieri *et al.*, "Molecular identification and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial and chloroplastic NAD<sup>+</sup> carrier proteins," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 45, pp. 31249–31259, 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.041830.

- [20] N. Linka *et al.*, “Phylogenetic relationships of non-mitochondrial nucleotide transport proteins in bacteria and eukaryotes,” *Gene*, vol. 306, no. 1–2, pp. 27–35, 2003, doi: 10.1016/S0378-1119(03)00429-3.
- [21] F. Palmieri, C. L. Pierri, A. De Grassi, A. Nunes-Nesi, and A. R. Fernie, “Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: A review with new insights,” *Plant J.*, vol. 66, no. 1, pp. 161–181, 2011, doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04516.x.
- [22] S. Saari, A. Näreaho, and S. Nikander, “Protozoa,” *Canine Parasites Parasit. Dis.*, pp. 5–34, 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-814112-0.00002-7.
- [23] A. Warren and G. F. Esteban, *Protozoa*, Fourth Edi. Elsevier, 2019.
- [24] C. Piña-Vázquez, M. Reyes-López, G. Ortíz-Estrada, M. de la Garza, and J. Serrano-Luna, “Host-Parasite Interaction: Parasite-Derived and -Induced Proteases That Degrade Human Extracellular Matrix,” *J. Parasitol. Res.*, vol. 2012, pp. 1–24, 2012, doi: 10.1155/2012/748206.
- [25] B. Van Der Pol, *Trichomonas vaginalis*, Fifth Edit. Elsevier Inc., 2018.
- [26] F. Mercer and P. J. Johnson, “Trichomonas vaginalis: Pathogenesis, Symbiont Interactions, and Host Cell Immune Responses,” *Trends Parasitol.*, vol. 34, no. 8, pp. 683–693, 2018, doi: 10.1016/j.pt.2018.05.006.
- [27] H. Zhang, T. Zhou, O. Kurnasov, S. Cheek, N. V. Grishin, and A. Osterman, “Crystal structures of E. coli nicotinate mononucleotide adenylyltransferase and its complex with deamido-NAD,” *Structure*, vol. 10, no. 1, pp. 69–79, 2002, doi: 10.1016/S0969-2126(01)00693-1.
- [28] C. H. Niño Rivers, “Identificación y caracterización de la Nicotinamida Mononucleótido Adenilil Transferasa (NMNAT) en Trypanosoma cruzi: Enzima clave en el metabolismo del NAD<sup>+</sup>. Carlos Hernando Niño Riveros,” 2014.
- [29] J. K. O’Hara *et al.*, “Targeting NAD<sup>+</sup> metabolism in the human malaria parasite Plasmodium falciparum,” *PLoS One*, vol. 9, no. 4, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0094061.
- [30] N. Forero-Baena, D. Sanchez-Lancheros, J. C. Buitrago, V. Bustos, and M.

- H. Ramirez-Hernandez, "Identification of a nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenylyltransferase in *Giardia lamblia* (GINMNAT)," *Biochim. Open*, vol. 1, pp. 61–69, 2015, doi: 10.1016/j.biopen.2015.11.001.
- [31] L. Luo *et al.*, "Regulation of mitochondrial NAD pool via NAD transporter 2 is essential for matrix NADH homeostasis and ROS production in *Arabidopsis*," 2019.
- [32] L. C. Villalobos Gonzalez, M. H. Ramirez, and A. Ayala Fajardo, "Estudio del metabolismo del NAD<sup>+</sup> en protozoos de vida libre y parásitos," 2018.
- [33] B. A. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., *Protein Identification and Analysis Tools on the Expasy Server*; Totowa, NJ: Humana Press, 2005.
- [34] Qiagen Digital Insights, "CLC Genomics Workbench." 2021, [Online]. Available: <http://www.clcbio.com/products/clc-genomics-workbench/>.
- [35] J. J. Almagro Armenteros, C. K. Sønderby, S. K. Sønderby, H. Nielsen, and O. Winther, "DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning," *Bioinformatics*, vol. 33, no. 21, pp. 3387–3395, Nov. 2017, doi: 10.1093/bioinformatics/btx431.
- [36] K.-C. Chou and H.-B. Shen, "A New Method for Predicting the Subcellular Localization of Eukaryotic Proteins with Both Single and Multiple Sites: Euk-mPLoc 2.0," *PLoS One*, vol. 5, no. 4, p. e9931, Apr. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0009931.
- [37] W.-Z. Lin, J.-A. Fang, X. Xiao, and K.-C. Chou, "iLoc-Animal: a multi-label learning classifier for predicting subcellular localization of animal proteins," *Mol. Biosyst.*, vol. 9, no. 4, p. 634, 2013, doi: 10.1039/c3mb25466f.
- [38] C. Zhang, P. L. Freddolino, and Y. Zhang, "COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein–protein interaction information," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. W1, pp. W291–W299, Jul. 2017, doi: 10.1093/nar/gkx366.
- [39] L. Kiemer, J. D. Bendtsen, and N. Blom, "NetAcet: Prediction of N-terminal acetylation sites," *Bioinformatics*, vol. 21, no. 7, pp. 1269–1270, 2005, doi: 10.1093/bioinformatics/bti130.

- [40] N. Blom, S. Gammeltoft, and S. Brunak, "Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites.," *J. Mol. Biol.*, vol. 294, no. 5, pp. 1351–62, Dec. 1999, doi: 10.1006/jmbi.1999.3310.
- [41] C. Wang *et al.*, "GPS 5.0: An Update on the Prediction of Kinase-specific Phosphorylation Sites in Proteins," *Genomics. Proteomics Bioinformatics*, vol. 18, no. 1, pp. 72–80, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.gpb.2020.01.001.
- [42] J. Ren, L. Wen, X. Gao, C. Jin, Y. Xue, and X. Yao, "CSS-Palm 2.0: An updated software for palmitoylation sites prediction," *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 21, no. 11, pp. 639–644, 2008, doi: 10.1093/protein/gzn039.
- [43] D. T. Jones, "Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices," *J. Mol. Biol.*, vol. 292, pp. 195–202, 1999, doi: 10.1006/jmbi.1999.3091.
- [44] D. Xu and Y. Zhang, "Improving the Physical Realism and Structural Accuracy of Protein Models by a Two-Step Atomic-Level Energy Minimization," *Biophysj*, vol. 101, no. 10, pp. 2525–2534, 2011, doi: 10.1016/j.bpj.2011.10.024.
- [45] P. Benkert, M. Biasini, and T. Schwede, "Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models," *Bioinformatics*, vol. 27, no. 3, pp. 343–350, Feb. 2011, doi: 10.1093/bioinformatics/btq662.
- [46] F. T. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." .
- [47] S. Kim *et al.*, "PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces," *Nucleic Acids Res.*, vol. 49, no. D1, pp. D1388–D1395, Jan. 2021, doi: 10.1093/nar/gkaa971.
- [48] M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, and G. R. Hutchison, "Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform," *J. Cheminform.*, vol. 4, no. 1, p. 17, Dec. 2012, doi: 10.1186/1758-2946-4-17.
- [49] J. Eberhardt, D. Santos-martins, A. F. Tillack, and S. Forli, "AutoDock Vina

- 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings,” 2021, doi: 10.1021/acs.jcim.1c00203.
- [50] A. C. Wallace, R. A. Laskowski, and J. M. Thornton, “LIGPLOT : a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions Clean up structure,” vol. 8, no. 2, pp. 127–134, 1995.
- [51] A. Untergasser, H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts, and J. A. M. Leunissen, “Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. Web Server, pp. W71–W74, May 2007, doi: 10.1093/nar/gkm306.
- [52] Promega, “Pfu DNA Polymerase Product Information 9PIM774,” *Promega, Corp.*, 2013.
- [53] Life Technologies (Invitrogen), “Champion pET SUMO Protein Expression System,” *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 5, no. January, pp. 1833–1839, 2010, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15263846> <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7366-8>.
- [54] PROMEGA, “pGEM(R)-T and pGEM(R)-T Easy Vector Systems Technical Manual TM042 - pgem-t and pgem-t easy vector systems protocol.pdf,” *pGEM(R)-T pGEM(R)-T Easy Vector Syst. Tech. Man. TM042 - pgem-t pgem-t easy vector Syst. Protoc.*, 2010, [Online]. Available: [https://www.promega.co.uk/~media/files/resources/protocols/technical\\_manuals/0/pgem-t\\_and\\_pgem-t\\_easy\\_vector\\_systems\\_protocol.pdf](https://www.promega.co.uk/~media/files/resources/protocols/technical_manuals/0/pgem-t_and_pgem-t_easy_vector_systems_protocol.pdf).
- [55] Insightful Science, “Software SnapGene.” 2021, [Online]. Available: <https://www.snapgene.com/>.
- [56] T. Sambrook, Joseph; Russell, David; Maniatis, *Molecular Cloning. A laboratory manual*, Thierth ed. 2001.
- [57] Invitrogen TM, “User Manual Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits,” *Invit. User Guid.*, no. 25, 2010.
- [58] P.-C. Yang, Z.-Q. Liu, and T. Mahmood, “Western blot: Technique, theory and trouble shooting,” *N. Am. J. Med. Sci.*, vol. 6, no. 3, p. 160, 2014, doi: 10.4103/1947-2714.128482.



- [59] Gold Bio, "Affinity His-Tag Purification," no. 800, pp. 4–8, 2019, [Online]. Available: [https://www.goldbio.com/documents/1013/Affinity His-Tag Purification Troubleshooting.pdf](https://www.goldbio.com/documents/1013/Affinity%20His-Tag%20Purification%20Troubleshooting.pdf).
- [60] E. Balducci *et al.*, "Assay Methods for Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase of Wide Applicability," *Anal. Biochem.*, vol. 228, no. 1, pp. 64–68, Jun. 1995, doi: 10.1006/ABIO.1995.1315.
- [61] E. Balducci *et al.*, "NMN adenylyltransferase from bull testis: Purification and properties," *Biochem. J.*, vol. 310, no. 2, pp. 395–400, 1995, doi: 10.1042/bj3100395.
- [62] W. A. Amro, W. Al-Qaisi, and F. Al-Razem, "Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk," *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, vol. 16, no. 1, pp. 99–103, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.jgeb.2017.10.003.
- [63] W. E. Werner, "Ferguson plot analysis of high molecular weight glutenin subunits by capillary electrophoresis," *Cereal Chem.*, vol. 72, no. 3, pp. 248–251, 1995.
- [64] A. Rath, F. Cunningham, and C. M. Deber, "Acrylamide concentration determines the direction and magnitude of helical membrane protein gel shifts," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 39, pp. 15668–15673, 2013, doi: 10.1073/pnas.1311305110.
- [65] S. Sabui *et al.*, "Characterization of oligomeric assembly of colonization factor CS6 from enterotoxigenic *Escherichia coli*," *Microbiol. (United Kingdom)*, vol. 162, no. 1, pp. 72–83, 2016, doi: 10.1099/mic.0.000180.
- [66] S. M. Simon, F. J. R. Sousa, R. Mohana-Borges, and G. C. Walker, "Regulation of *Escherichia coli* SOS mutagenesis by dimeric intrinsically disordered umuD gene products," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 4, pp. 1152–1157, Jan. 2008, doi: 10.1073/pnas.0706067105.
- [67] M. A. Ruggiero *et al.*, "A higher level classification of all living organisms," *PLoS One*, vol. 10, no. 4, pp. 1–60, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0119248.
- [68] T. Knudsen, B. Knudsen, "CLC Main Workbench 8.1.2." 2020.

- [69] I. Erb and C. Notredame, "How should we measure proportionality on relative gene expression data?," *Theory Biosci.*, vol. 135, no. 1–2, pp. 21–36, 2016, doi: 10.1007/s12064-015-0220-8.
- [70] J. D. Thompson, D. G. Higgins, and T. J. Gibson, "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice," *Nucleic Acids Res.*, vol. 22, no. 22, pp. 4673–4680, 1994, doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
- [71] A. Marchler-Bauer *et al.*, "CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. D1, pp. D200–D203, 2017, doi: 10.1093/nar/gkw1129.
- [72] J. Ma, J. Peng, S. Wang, and J. Xu, "A conditional neural fields model for protein threading," *Bioinformatics*, vol. 28, no. 12, pp. 59–66, 2012, doi: 10.1093/bioinformatics/bts213.
- [73] J. Ma, S. Wang, F. Zhao, and J. Xu, "Protein threading using context-specific alignment potential," *Bioinformatics*, vol. 29, no. 13, pp. 257–265, 2013, doi: 10.1093/bioinformatics/btt210.
- [74] S. M. Cacciò, M. Lalle, and S. G. Svärd, "Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 66, no. October 2017, pp. 335–345, 2018, doi: 10.1016/j.meegid.2017.12.001.
- [75] A. Volkamer, D. Kuhn, F. Rippmann, and M. Rarey, "DoGSiteScorer: a web server for automatic binding site prediction, analysis and druggability assessment," *Bioinformatics*, vol. 28, no. 15, pp. 2074–2075, Aug. 2012, doi: 10.1093/bioinformatics/bts310.
- [76] S. E. Wang, A. S. Amir, T. Nguyen, A. M. Poole, and A. Simoes-Barbosa, "Spliceosomal introns in *Trichomonas vaginalis* revisited," *Parasit. Vectors*, vol. 11, no. 1, p. 607, Dec. 2018, doi: 10.1186/s13071-018-3196-7.
- [77] J. M. Carlton *et al.*, "Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*," *Science (80-. )*, vol. 315, no. 5809, pp. 207–212, Jan. 2007, doi: 10.1126/science.1132894.
- [78] C. Lau, C. Dölle, T. I. Gossmann, L. Agledal, M. Niere, and M. Ziegler,

- “Isoform-specific Targeting and Interaction Domains in Human Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferases,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 24, pp. 18868–18876, Jun. 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.107631.
- [79] K. Fujiwara, H. Toda, and M. Ikeguchi, “Dependence of  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -sheet amino acid propensities on the overall protein fold type,” pp. 6–15, 2012.
- [80] F. Berger, C. Lau, M. Dahlmann, and M. Ziegler, “Subcellular Compartmentation and Differential Catalytic Properties of the Three Human Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase Isoforms,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 43, pp. 36334–36341, Oct. 2005, doi: 10.1074/jbc.M508660200.
- [81] T. Croft, C. J. T. Raj, M. Salemi, B. S. Phinney, and S. J. Lin, “A functional link between NAD<sup>+</sup> homeostasis and N-terminal protein acetylation in *Saccharomyces cerevisiae*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 293, no. 8, pp. 2927–2938, 2018, doi: 10.1074/jbc.M117.807214.
- [82] D. T. Jones, “Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices 1 Edited by G. Von Heijne,” *J. Mol. Biol.*, vol. 292, no. 2, pp. 195–202, Sep. 1999, doi: 10.1006/jmbi.1999.3091.
- [83] I. Hanukoglu, “Rossmann Fold : A Beta-Alpha- Beta Fold at Dinucleotide Binding Sites,” pp. 206–209, 2014, doi: 10.1002/bmb.20849.
- [84] R. J. Anderson, Z. Weng, R. K. Campbell, and X. Jiang, “Main-Chain Conformational Tendencies of Amino Acids,” vol. 689, no. March, pp. 679–689, 2005, doi: 10.1002/prot.20530.
- [85] V. Saridakis, D. Christendat, M. S. Kimber, A. Dharamsi, A. M. Edwards, and E. F. Pai, “Insights into Ligand Binding and Catalysis of a Central Step in NAD<sup>+</sup> Synthesis,” vol. 276, no. 10, pp. 7225–7232, 2001, doi: 10.1074/jbc.M008810200.
- [86] X. Zhang, O. V Kurnasov, S. Karthikeyan, N. V Grishin, A. L. Osterman, and H. Zhang, “Structural Characterization of a Human Cytosolic NMN / NaMN Adenylyltransferase and Implication in Human NAD Biosynthesis \* □,” *J.*

- Biol. Chem.*, vol. 278, no. 15, pp. 13503–13511, 2003, doi: 10.1074/jbc.M300073200.
- [87] J. Hon *et al.*, “SoluProt: prediction of soluble protein expression in *Escherichia coli*,” *Bioinformatics*, vol. 37, no. 1, pp. 23–28, Apr. 2021, doi: 10.1093/bioinformatics/btaa1102.
- [88] C. A. Nieto Clavijo, N. Forero Baena, and M. H. Ramírez Hernández, “Diseño y producción de diversas proteínas fusión de la nicotinamida/nicotinato mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT) de *Plasmodium falciparum*,” *Rev. Colomb. Química*, vol. 46, no. 3, pp. 5–10, Sep. 2017, doi: 10.15446/rev.colomb.quim.v46n3.63492.
- [89] M. Fakruddin, R. Mohammad Mazumdar, K. S. Bin Mannan, A. Chowdhury, and M. N. Hossain, “Critical Factors Affecting the Success of Cloning, Expression, and Mass Production of Enzymes by Recombinant *E. coli*,” *ISRN Biotechnol.*, vol. 2013, no. 3, pp. 1–7, 2013, doi: 10.5402/2013/590587.
- [90] T. Panavas, C. Sanders, and T. R. Butt, “SUMO Fusion Technology for Enhanced Protein Production in Prokaryotic and Eukaryotic Expression Systems,” vol. 497, no. 6, pp. 303–317, 2009, doi: 10.1007/978-1-59745-566-4.
- [91] H. Saitoh, J. Uwada, and A. Kawasaki, “Strategies for the Expression of SUMO-Modified Target Proteins in *Escherichia coli*,” vol. 497, pp. 211–221, 2009, doi: 10.1007/978-1-59745-566-4.
- [92] J. A. Bornhorst and J. J. Falke, “Purification of proteins using polyhistidine affinity tags,” 2000, pp. 245–254.
- [93] G. Orsomando *et al.*, “Simultaneous Single-Sample Determination of NMNAT Isozyme Activities in Mouse Tissues,” *PLoS One*, vol. 7, no. 12, p. e53271, Dec. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0053271.
- [94] M. Kato and S. J. Lin, “YCL047C/POF1 is a novel nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) in *Saccharomyces cerevisiae*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 22, pp. 15577–15587, 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.558643.

- [95] W. Konigsberg, "Reduction of Disulfide Bonds in Proteins with Dithiothreitol," *Methods Enzymol.*, vol. 25, no. C, pp. 185–188, 1972, doi: 10.1016/S0076-6879(72)25015-7.
- [96] M. C. Alliegro, "Effects of dithiothreitol on protein activity unrelated to thiol-disulfide exchange: For consideration in the analysis of protein function with cleland's reagent," *Anal. Biochem.*, vol. 282, no. 1, pp. 102–106, 2000, doi: 10.1006/abio.2000.4557.
- [97] N. Raffaelli, L. Sorci, A. Amici, M. Emanuelli, F. Mazzola, and G. Magni, "Identification of a novel human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 297, no. 4, pp. 835–840, 2002, doi: 10.1016/S0006-291X(02)02285-4.
- [98] L. E. Contreras Rodríguez, M. Ziegler, and M. H. Ramírez Hernández, "Kinetic and oligomeric study of *Leishmania braziliensis* nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase," *Heliyon*, vol. 6, no. 4, p. e03733, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03733.
- [99] J. Rodrigues, J. Caldeira, and B. Vaidya, "A Novel Intra-body Sensor for Vaginal Temperature Monitoring," *Sensors*, vol. 9, no. 4, pp. 2797–2808, Apr. 2009, doi: 10.3390/s90402797.
- [100] G. Johnson and M. H. Trussell, "Physiology of Bacteria-free *Trichomonas vaginalis*. VII: Temperature in Relation to Survival and Generation Time.," *Exp. Biol. Med.*, vol. 57, no. 2, pp. 252–254, Nov. 1944, doi: 10.3181/00379727-57-14771.
- [101] S. M. Gelbart, J. L. Thomason, P. J. Osypowski, A. V Kellett, J. A. James, and F. F. Broekhuizen, "Growth of *Trichomonas vaginalis* in commercial culture media," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 28, no. 5, pp. 962–964, May 1990, doi: 10.1128/jcm.28.5.962-964.1990.
- [102] A. Chang *et al.*, "BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: new developments and updates," *Nucleic Acids Res.*, vol. 49, no. D1, pp. D498–D508, Jan. 2021, doi: 10.1093/nar/gkaa1025.
- [103] J. J. Babcock and L. Brancalion, "International Journal of Biological

- Macromolecules Bovine serum albumin oligomers in the E- and B-forms at low protein concentration and ionic strength,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 53, pp. 42–53, 2013, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.10.030.
- [104] R. Dro, “Lysozyme Oligomers as a Molecular Mass Standard for Sodium Dodecyl Gel Electrophoresis,” vol. 422, pp. 419–422, 1988.
- [105] R. Li, Z. Wu, Y. Wangb, L. Ding, and Y. Wang, “Role of pH-induced structural change in protein aggregation in foam fractionation of bovine serum albumin,” *Biotechnol. Reports*, vol. 9, pp. 46–52, 2016, doi: 10.1016/j.btre.2016.01.002.
- [106] G. V Barnett, M. Drenski, V. Razinkov, W. F. Reed, and C. J. Roberts, *Identifying protein aggregation mechanisms and quantifying aggregation rates from combined monomer depletion and continuous scattering*, vol. 511. 2017.
- [107] C. Seok, M. Baek, M. Steinegger, H. Park, G. R. Lee, and J. Won, “Accurate protein structure prediction: what comes next?,” *BIODESIGN*, vol. 9, no. 3, pp. 47–50, Sep. 2021, doi: 10.34184/kssb.2021.9.3.47.
- [108] K. Hashimoto and A. R. Panchenko, “Mechanisms of protein oligomerization, the critical role of insertions and deletions in maintaining different oligomeric states,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 47, pp. 20352–20357, Nov. 2010, doi: 10.1073/pnas.1012999107.
- [109] J. M. Brazill, C. Li, Y. Zhu, and R. G. Zhai, “NMNAT: It’s an NAD + synthase... It’s a chaperone... It’s a neuroprotector,” *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 44, pp. 156–162, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.gde.2017.03.014.
- [110] L. Skipper, “PROTEINS | Overview,” vol. 8, p. 101983, 2005.
- [111] W.-W. Zhang, “The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery,” *Drug Discov. Today*, vol. 8, no. 8, pp. 364–371, Apr. 2003, doi: 10.1016/S1359-6446(03)02655-2.
- [112] Y. Xu *et al.*, “Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: A review,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 6, pp. 860–868, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.003.
- [113] D. Thirumalai, S. Visaga Ambi, R. S. Vieira-Pires, Z. Xiaoying, S. Sekaran,

- and U. Krishnan, "Chicken egg yolk antibody (IgY) as diagnostics and therapeutics in parasitic infections – A review," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 136, pp. 755–763, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.118.
- [114] E. P. V Pereira, M. F. Van Tilburg, E. O. P. T. Florean, and M. I. F. Guedes, "Egg yolk antibodies ( IgY ) and their applications in human and veterinary health : A review," no. January, 2020.
- [115] Barella, "Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies.," *International Journal of Science and Technology*, vol. 3, no. 4, p. 210, 2010, doi: 10.17485/ijst/2010/v3i4/29741.
- [116] D. Pauly, P. A. Chacana, E. G. Calzado, B. Brembs, and R. Schade, "IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation," *J. Vis. Exp.*, no. 51, May 2011, doi: 10.3791/3084.
- [117] D. M. Ostos Peña, "Aproximación a la regulación de algunas enzimas involucradas en el metabolismo del NAD<sup>+</sup> en *Giardia duodenalis*." pp. 1–128, 2019.
- [118] G. Garzón, "Estudio de un candidato a NAD quinasa en *Leishmania* spp.," *Adv. Opt. Mater.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, 2018.
- [119] S. E. Villamil-Silva, L. J. Ortiz-Joya, L. E. Contreras-Rodríguez, G. J. Díaz-Gonzalez, and M. H. Ramírez-Hernández, "Identificación de una triparedoxina peroxidasa citoplasmática en *Leishmania braziliensis*," *Rev. Colomb. Química*, vol. 50, no. 2, pp. 3–14, Aug. 2021, doi: 10.15446/rev.colomb.quim.v50n2.91721.
- [120] M. C. Jespersen, B. Peters, M. Nielsen, and P. Marcatili, "BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. W1, pp. W24–W29, Jul. 2017, doi: 10.1093/nar/gkx346.
- [121] D. S. Morales, L. E. Contreras, C. C. Rubiano, and M. H. R. Hern, "Identification and sub-cellular localization of a NAD transporter in *Leishmania braziliensis* ( Lb NDT1 )," *Helyion*, vol. 6, no. June, pp. 0–9,

- 2020, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04331.
- [122] V. S. Sharon Eliana, “Exploración de un transportador de NAD + y sus precursores en *Leishmania*.” pp. 1–181, 2021.
- [123] J. J. Ruprecht *et al.*, “The Molecular Mechanism of Transport by the Article The Molecular Mechanism of Transport by the Mitochondrial ADP / ATP Carrier,” pp. 435–447, 2019, doi: 10.1016/j.cell.2018.11.025.
- [124] A. Shiflett and P. Johnson, “Mitochondrion-related Organelles in Parasitic Eukaryotes,” no. 8, pp. 409–429, 2011, doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162826.Mitochondrion-related.
- [125] T. Lithgow, “Evolution of macromolecular import pathways in mitochondria , hydrogenosomes and mitosomes,” pp. 799–817, 2010, doi: 10.1098/rstb.2009.0167.
- [126] M. S. King, M. Kerr, P. G. Crichton, R. Springett, and E. R. S. Kunji, “Formation of a cytoplasmic salt bridge network in the matrix state is a fundamental step in the transport mechanism of the mitochondrial ADP/ATP carrier,” *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1857, no. 1, pp. 14–22, 2016, doi: 10.1016/J.BBABIO.2015.09.013.
- [127] R. E. Schneider *et al.*, “The *Trichomonas vaginalis* hydrogenosome proteome is highly reduced relative to mitochondria, yet complex compared with mitosomes,” *Int. J. Parasitol.*, vol. 41, no. 13–14, pp. 1421–1434, 2011, doi: 10.1016/j.ijpara.2011.10.001.
- [128] S. D. Dyall *et al.*, “Non-mitochondrial complex I proteins in a hydrogenosomal oxidoreductase complex,” vol. 28, pp. 1103–1107, 2004, doi: 10.1038/nature02918.1.
- [129] J. Kuan and M. H. Saier, “The Mitochondrial Carrier Family of Transport Proteins : Structural , Functional , and Evolutionary Relationships,” vol. 28, no. 3, pp. 209–233, 1993.