

De acuerdo a los lineamientos particulares para la presentación y análisis de los proyectos de investigación ante el consejo divisional de ciencias naturales e ingeniería (CNI) de la unidad Cuajimalpa, aprobados por el consejo divisional en su sesión no. cua-dcni-109-15 del 12 de marzo de 2015, se presenta:

**1.- Título del proyecto.** “Estudio sobre el carácter oligomérico y polimérico de las proteínas”.

**2.- Línea de investigación.** Plegamiento de proteínas.

**3.- Responsable del proyecto, participantes y adscripción de cada uno de ellos.**

UAM-Cuajimalpa

Dr. Edgar Vázquez Contreras (responsable), Dr. Hugo Nájera, Dra. Mariana Peimbert, Dr. Gerardo Pérez.

Alumn@s mencionados en la sección de recursos humanos.

UNAM

Dr. Miguel Costas Fac. de Química, Dra. Gloria Saab IBT, Dr. Alejandro Sosa Fac. Medicina, Dr. Alfredo Torres IFC.

UMSNH

Dra. Bertha Fenton Navarro, Fac. de Ciencias Medicas y Biológicas.

**4.- Orientación:** Investigación básica.

**5.- Fecha de inicio y duración.** abril 2021 - abril 2025 (4 años).

**6.- Propuesta.**

**Resumen.**

Dada la relevancia de la estructura tridimensional de las proteínas en el metabolismo, en este proyecto se pretende aportar información sobre las propiedades de las proteínas para formar agregados oligoméricos o poliméricos, entendiéndose que los primeros se refieren a la agregación de algunas subunidades (como en el caso de los dímeros) y los segundos a muchas (como en las fibras amiloides o los agregados desordenados). El arreglo en forma de agregados está relacionado directamente con el plegamiento, que puede ser convencional por medio de la transición a una estructura con actividad biológica, un evento metabólico y vital o bien, no convencional en donde se llega a polímeros como las fibras amiloides que pueden estar relacionadas con enfermedades humanas de relevancia muy actual. Para aportar información en relación a esta situaciones, se propone estudiar el plegamiento de entre otras, enzimas

homólogas triosafosfato isomerasas (TIM) de origen silvestre y mutante, a través de diversas técnicas fisicoquímicas e *in silico*.

### **Antecedentes.**

A la fecha se ha estudiado la desnaturalización por medio de una variedad de enfoques experimentales de 10 especies de TIM; el responsable de este proyecto **Dr. Edgar Vázquez Contreras**, ha participado en la caracterización de tres de ellas, contribuyendo hasta la fecha con ocho artículos originales. Primero, como parte de los estudios de Doctorado del responsable del proyecto, se reportó la caracterización de la desnaturalización de la TIM de levadura (**Vázquez-Contreras y col., 2000**), trabajo original en donde se reportó por primera vez la presencia de un intermediario monomérico al equilibrio en la reacción de desplegamiento de esta enzima. Más adelante se publicó la desnaturalización de la enzima de *Trypanosoma brucei* (TbTIM) utilizando mutantes de residuos de triptofano (**Chávez-Cárdenas y col., 2002**) y también se realizó la comparación de los patrones de desnaturalización al equilibrio de esta enzima y su homóloga de *T. cruzi* (TcTIM) (**Chávez-Cárdenas y Vázquez-Contreras 2002**). Después se efectuó la caracterización fenomenológica de la reacción de desnaturalización de TcTIM (**Vázquez-Contreras y col., 2004**) y se publicó su caracterización termodinámica (**Chávez-Cárdenas y col., 2005**), así como las semejanzas que existen entre las reacciones de desplegamiento y replegamiento (**Vázquez-Contreras y col., 2005**). Como parte de los estudios del diseño de proteínas, se generaron resultados sobre los estudios de monomerización de TcTIM (**Zárate y Vázquez Contreras 2008**) y sobre los estudios para la construcción, la sobreexpresión y la purificación de una variante monomérica de TcTIM denominada monoTcTIM y que se ha caracterizado de forma parcial tanto funcional y como estructuralmente, en solución y en el cristal (**Zárate y col., 2009**); actualmente hemos incorporando a estas investigaciones, el uso de herramientas informáticas para el análisis de estos procesos. En cuanto al plegamiento no convencional de la TIM, en el año de 2016 el grupo de la Dra. Saab en el IBT de la UNAM reportó la identificación de regiones fibrillogénicas en la enzima de humanos (Carcamo-Noriega y Gloria Saab-Rincon 2016). Nosotros iniciamos los estudios de la fibrillogénesis en la enzima de *Trypanosoma cruzi*, posteriormente la de *T. brucei* y luego una variante monomérica de la primera. Desde hace aproximadamente 4 años se han incorporado a esta parte del trabajo alumn@s de proyecto terminal, servicio social, especialización, maestría y doctorado.

Para realizar estas investigaciones se ha recibido además del apoyo Institucional de la UNAM donde se iniciaron estas investigaciones, de la UAM, del CONACYT con los proyectos 40524M, 47310106 y 168177, los dos últimos con el responsable ya integrado como profesor-investigador en la UAM-Cuajimalpa.

## Objetivos.

### General.

Aportar información sobre las implicaciones del plegamiento *in vitro* para formar oligómeros o polímeros, que puedan relacionarse con situaciones metabólicas convencionales y no convencionales en forma de fibras amiloides.

### Particulares.

Generar información sobre la naturaleza oligomérica de las proteínas en particular la TIM. Estudiar si es posible producir heterodímeros TIM con sólo una asa tres. Caracterizar la estructura en solución y en el cristal de estos heterodímeros, así como su función y su estabilidad. Discutir sobre las implicaciones de estos resultados en torno a la naturaleza obligada del oligómero TIM.

Contribuir con información sobre el papel oligomérico de las proteínas en el plegamiento convencional, la agregación inespecífica y el plegamiento no convencional en la formación de fibras amiloides.

### Hipótesis.

Si se utilizan diversas técnicas fisicoquímicas y computacionales, entonces se podría generar información relevante sobre la oligomerización y polimerización proteínica, tratando de aportar información para el plegamiento convencional, la agregación inespecífica y el plegamiento no convencional en la formación de fibras amiloides utilizando enzimas TIM silvestres y mutantes.

### Metodología.

**0. Purificaciones.** De TbTIM de acuerdo a lo reportado en **Chávez-Cárdenas y col 2002** y de TcTIM y MonoTcTIM de acuerdo a lo reportado en Ostoa y col., 1997. En resumen estas purificaciones consisten en la ruptura de forma mecánica de las células de *Escherichia coli* que contienen a los respectivos plásmidos de sobreexpresión de las diferentes TIMs. La posterior centrifugación y ultracentrifugación a 40,000 rpm (el responsable ha sido beneficiado con el apoyo del CONACyT para adquirir este equipo, que es el único con el que cuenta la UAM) y la posterior cromatografía iónica y de exclusión molecular de las muestras. Todos los pasos, se pueden realizar en el laboratorio de Biofisicoquímica. En esta parte se aprovechará la experiencia del Dr. Nájera como purificador.

**1. Producción de los heterodímeros.** Se realizará el protocolo reportado por Zomoza y col., 2003, que consiste en la desnaturalización de las enzimas por separado en 6.0 M de Gdn-HCl y la posterior renaturalización por diálisis de las mismas pero juntas. La separación es por cromatografía de intercambio iónico y la verificación por medio de geles nativos.

## 2. Caracterización de los heterodímeros.

- Determinación de parámetros cinético/funcionales (Km, Vmax).
- Inhibición por agentes derivatizantes de cisteína (MMTS y DTNB)
- Se obtendrá el contenido de estructura secundaria y terciaria a partir de los espectros de fluorescencia intrínseca y de dicroísmo circular.
- Se verificará Radio de Stokes del intermediario a partir de experimentos de cromatografía de exclusión molecular en presencia de desnaturizante (**Chanez-Cárdenas y col., 2002 y 2005**) y por experimentos de dispersión dinámica de luz.
- Se obtendrá el patrón de plegamiento del heterodímero por cambios en la actividad catalítica (estructura cuaternaria), la estructura terciaria (fluorescencia intrínseca) y la señal de dicroísmo circular (estructura secundaria) como función de la concentración del desnaturizante de acuerdo a las metodologías reportadas por **Vázquez-Contreras y col., 2000** y **Cháneez-Cárdenas y col., 2002 y 2005**. También se verificará el cambio en la exposición de áreas hidrofóbicas al solvente por medio de estudios de fluorescencia extrínseca utilizando al ANS (ácido anilino naphthaleno 1 sulfonato).
- *In silico* la alumna Tania Ramírez emprendió experimentos de acomplamiento molecular (Docking) con los monómeros de las enzimas silvestres y una mutante monomérica, durante su proyecto de especialización en el PCNI, que son muy motivadores para continuar utilizando herramientas computacionales para resolver esta pregunta.

## 3. Determinación de la estabilidad de los heterodímeros.

- A partir del patrón de plegamiento se puede determinar en caso de que los procesos sean reversibles, la estabilidad de los conformeros presentes en la vía de desplegamiento; el patrón de plegamiento de los heterodímeros puede parecerse al de TcTIM (4 estados), al de la enzima de levadura (YTIM) (3 estados), o bien ser un proceso de dos estados (Pace, 1986); los procesos matemáticos para la determinación de la estabilidad de los dos primeros han sido reportados por nuestro grupo para TcTIM, en donde el modelo fue desarrollado por el Dr Miguel Costas (**Cháneez-Cárdenas y col., 2005**) y por Nájera y col., 2003 para la YTIM.
- La energía asociada a los eventos de dimerización (o monomerización), se pueden verificar también por medio de experimentos de dilución, en los cuales se estudia la actividad catalítica como función de la concentración de proteína.
- Finalmente, la estabilidad se puede estudiar por medio de métodos calorimétricos. En esta parte del proyecto utilizaremos la experiencia del Dr. Pérez, quien domina el desarrollo y análisis de experimentos de calorimetría de barrido diferencial.

**4. Cristalización y obtención de la estructura tridimensional de la proteína heterodimérica por medio de difracción de rayos x.** Se utilizará la metodología reportada en **Zárate y col., 2009**.

**5. Análisis de las secuencias de aminoácidos.** La Dra. Mariana Peimbert es especialista en los experimentos *in silico* para analizar las secuencias de aminoácidos de las proteínas involucradas en este proyecto, con las bases de datos disponibles. A partir del análisis de alineamientos de secuencias y su correlación con las estructuras tridimensionales correspondientes podremos abundar sobre la información concerniente a los aminoácidos involucrados en el proceso de dimerización y polimerización de la triosafosfato isomerasa.

Bases de datos Genbank, PDB, swissprot, BRENDA; Para buscar las secuencias Blast y Psi-Blast (Altschul y col., 1990); Para alineamientos múltiples Mafft, Muscle (Kato y col., 2002); Para filtrar secuencias Cd-hit; Para visualizar alineamientos Jalview, Seaview; Para visualizar y alinear estructuras PyMol (DeLano y col., 2008).

**6. Estudio del plegamiento convencional, la agregación inespecífica y el plegamiento no convencional.** Para tratar de aportar información sobre la participación de las formas oligoméricas y monoméricas de la TIM, se realizarán estudios de denaturalización y renaturalización seguidos por cambios espectroscópicos, calorimétricos y microscópicos (Carcamo-Noriega y Gloria Saab-Rincon 2016). Los siguientes trabajos: Proyecto terminal de Miguel Rodríguez (finalizado), Daniel Cudney (finalizado), Paola Garduño (finalizado), Frida Argueta (en proceso), Andrea Martínez (en proceso); servicio social de Miguel Rodríguez (finalizado), Daniel Cudney (finalizado), Paola Garduño (en proceso) y Tesis de maestría de Janet Garduño (finalizada), Miguel Rodríguez (finalizada), Daniel Cudney (en proceso), así como tesis de Doctorado de Miguel Rodríguez están relacionados con la formación de fibras amiloides por las enzimas TIM de interés en este proyecto.

### **Formación de recursos humanos.**

En sus inicios el desarrollo de este proyecto generó una tesis de licenciatura y un proyecto de especialización en el PCNI, así como cinco proyectos terminales. La alumna que cursó la especialización Reyna Miriam Bastida Santoyo, recibió la medalla al mérito Universitario; uno de los alumnos que ha participado en los proyectos terminales, Misraim Enrique Gurrola Acosta de la LBM, presentó sus resultados del proyecto terminal en un congreso internacional pero desarrollado en México y ganó una beca para hacer lo mismo en el Congreso de la Protein Society en San Diego CA, USA. En enero de 2017 terminó su servicio social que fue una continuación de las investigaciones que venía desarrollando.

La alumna Tania Rojas de la LBM que realizó el proyecto terminal dentro de los objetivos del presente proyecto; en el 2016 desarrolló su servicio social. Los

avances de las investigaciones en las que ha participado, se presentaron en dos congresos internacionales (uno en México y el otro en Baltimore, USA), presentó sus datos en el simposio de la LBM en 2016. Junto con el responsable publicó un libro sobre el pH como parte de los trabajos del consejo editorial de la DCNI y participó en la impartición de un taller para alumnos de la LBM sobre ese tema. Realizó la especialización en el PCNI bajo la dirección del responsable en el laboratorio de Biofísicoquímica, donde empenó experimentos *in silico* sobre la posibilidad del acoplamiento molecular (Docking) de los monómeros silvestres de Tc y TbTIM con la mutante monomérica MonoTcTIM, mismos que forman parte de la ICR que finalizó en el 2019.

La alumna Angélica Janet Garduño terminó la maestría del PCNI, con un proyecto relacionado con los objetivos del que aquí se presenta.

El alumno Miguel Rodríguez de la LBM realizó el proyecto terminal dentro de los objetivos del presente proyecto, cuyos avances se presentaron en un congreso internacional en México; posteriormente finalizó el servicio social e ingreso a la maestría en PCNI misma que terminó en el 2020. Posteriormente ingresó al Doctorado en PCNI en ese mismo año. También participó en la impartición de un taller sobre pH para alumnos de la LBM.

El alumno Daniel Cudney Widcab de la LBM realizó el proyecto terminal dentro de los objetivos del presente proyecto, finalizó el servicio social, ingresó a la maestría del PCNI y está terminando lo necesario para obtener el grado. En fechas muy recientes recibimos la carta de aprobación de un libro sobre soluciones que trabajamos el responsable de este proyecto y el citado alumno.

La alumna Paola Edith Garduño Chávez de la LIB, realizó dentro de este proyecto los proyectos terminales y actualmente está terminado el servicio social, es posible que esta alumna se integre a los estudios de maestría en el PCNI.

Actualmente las alumnas Frida Argueta y Andrea Martínez Zayas de la LBM cursan los proyectos terminales y emprenderán los servicios sociales con miras a ingresar en cuanto terminen sus créditos a la Maestría en PCNI.

El alumno Pablo Simón Juárez Arellano de la LBM, está realizando un estudio con los puentes de hidrógeno que se presentan entre las subunidades de las TIM de interés en este proyecto y tiene miras a ser el inicio de una parte de divulgación de la ciencia que estamos emprendiendo. Él tiene la idea de terminar sus créditos e ingresar al PCNI.

Otros alumnos de las LBM e IB me han comentado su interés por participar en estos estudios.

## **Impacto esperado del proyecto.**

Es claro que la estructura tridimensional de la triosafosfato isomerasa tiene implicaciones directas en el metabolismo. Se ha reportado que la deficiencia de la TIM es la una única enzimopatía glucolítica de herencia autosómica recesiva que se caracteriza por anemia hemolítica crónica, miocardiopatía, susceptibilidad a las infecciones, grave disfunción neurológica y en muchos casos, la muerte en la infancia temprana. Hasta la fecha se han reportado 13 diferentes mutaciones en el gen TPI humano; estas mutaciones producen TIMs que están afectadas tanto en la unión del sustrato, como en la estabilidad del dímero. Incluso se sabe algunas mutaciones están relacionadas directamente con la imposibilidad de dimerizar (Markus y col., 2006). Debido a esta situación, los estudios aquí propuestos en el marco puramente básico, tienen un contexto aplicado a futuro. Así mismo estamos interesados en investigar si estas proteínas son capaces de formar fibras amiloides y como las tenemos en formas monoméricas y oligoméricas, estos experimentos pueden ser utilizados para conocer más sobre la naturaleza oligomérica de esta enzima y su eventual polimerización.

Además pensamos impactar produciendo recursos humanos, como se menciona en la sección correspondiente, impartir seminarios, dictar conferencias y presentar posters en eventos especializados nacionales e internacionales, publicar revisiones y artículos de investigación. En el futuro, participaremos con una propuesta para adquirir financiamiento externo a través del CONACyT.

## **7.- Recursos necesarios para el proyecto:**

### **Financiamiento e infraestructura física y humana actual en el proyecto.**

El proyecto ha contado con apoyo financiero del CONACyT (168177), además de los reactivos y otros materiales que se han adquirido por parte del DCN.

Contamos con las cepas bacterianas que contienen a los plásmidos de sobreexpresión para monoTcTIM, TcTIM y TbTIM. Además están a la venta TIMs silvestres de varias especies y el responsable ha construido para otros proyectos algunas otras TIMs mutantes, por si fuera necesario conseguir alguna característica en particular, para lograr el objetivo. Se tiene experiencia en la mutación del gen TPI que produce a la TIM, la Dra. Peimbert ha generado varias mutantes. El DCN de la UAM unidad Cuajimalpa que es el lugar donde se llevará a cabo el presente estudio, cuenta con la infraestructura para la sobreexpresión de las cepas mencionadas (ultracongelador, esterilizadora, campanas de flujo laminar, incubadoras), para cosechar las bacterias que han sobreexpresado las proteínas recombinantes y mutantes (centrífugas, refrigerador), con lo necesario para lisar a las bacterias (sonicador, potenciómetro), purificarlas (centrífugas, ultracentrífuga, FPLC, columnas cromatográficas, colectores, pipetas, balanzas), y caracterizarlas (espectrofluorómetro con peltier, espectropolarímetro con peltier y aditamento de stoped-flow, espectrofotómetro, nanocalorímetros de titulación

isotérmica, y de barrido diferencial (capilar), dispesor de luz dinámica). Se tiene conocimiento y práctica sobre el uso general de todos estos equipos, en algunos de ellos el responsable ha participado directamente en la selección e instalación.

Se colabora con el Dr. Miguel Costas de la Fac. de Química de la UNAM y con el Dr. Alfredo Torres del IFC UNAM para los análisis termodinámicos, estudios *in silico* y experimentos cristalográficos, respectivamente. Tanto el responsable técnico de esta propuesta, como el Dr. Nájera, la Dra. Peimbert y el Dr. Pérez, han publicado artículos de investigación relacionados con la sobre-expresión, purificación y caracterización en múltiples aspectos, incluido el plegamiento y la generación de mutantes de la triosafosfato isomerasa; se han generado también tesis a todos los niveles y colaboraciones múltiples entre los participantes y con otros investigadores alrededor de este modelo. Este grupo reúne experiencia a varios niveles de investigación de esta enzima, aunque también desarrolla otros múltiples proyectos con éste y otros modelos proteínicos. En resumen todos los reactivos e infraestructura experimental para realizar el presente proyecto se encuentran en la UAM-C, excepto aquellos necesarios para la determinación de la estructura tridimensional por cristalografía. La Dra Saab-Rincon ha tomado la delantera en los estudios del plegamiento no convencional de la TIM humana, por lo que su participación en este proyecto es fundamental para entender los aspectos relacionados con las enzimas aquí descritas. Finalmente, lo relacionado con los estudios *in silico* están a cargo de los Dres Pérez y Sosa quienes no solamente tienen el conocimiento para enfrentar estas preguntas, sino que cuentan con los programas de cómputo y licencias para desarrollarlos. La Dra Fenton es experta e cuantificación y tinción por colorantes específicos, mismos que se utilizarán para darle seguimiento a los estudios de formación de fibras amiloides por las enzimas TIM.

En la sección de recursos humanos se mencionan los nombres de los alumnos que actualmente participan en el proyecto.

### **Presupuesto calendarizado.**

Con los recursos que se obtuvieron gracias al patrocinio del CONACyT, se adquirieron los equipos, los materiales y los consumibles para la purificación, la desnaturalización y otros estudios por lo que se considera que son suficientes para continuar las actividades propuestas en esta investigación por al menos dos años. Finalmente también hay apoyo de recursos con los que cuenta el área de biofísicoquímica (presupuesto, otros proyectos financiados PRODEP).

### **Fuentes de financiamiento externas.**

No hay en este momento.



## 8.- Calendario de actividades en períodos trimestrales.

A continuación enlisto las actividades que deseablemente se propone emprender, pero que dadas las circunstancias de la pandemia por la COVID-19 no se puede asegurar que se sigan al pie de la letra.

### 2021

Otoño	invierno	primavera
Expresión y purificación de proteínas recombinantes silvestres.	Expresión y purificación de proteínas recombinantes mutantes.	Generación del heterodímero, análisis <i>in silico</i> .
Localización de proteínas en el pdb.	Análisis de las secuencias de las proteínas.	Análisis de las regiones fibrillogénicas.

### 2022

Otoño	invierno	primavera
Caracterización del heterodímero: estudios cinéticos y calorimétricos	Caracterización del heterodímero: estudios espectrométricos y de función	Caracterización de la interfase de las mutantes monoméricas disponibles
Incubación de las proteínas en diferentes perturbantes	Localización de las fibras amiloides por tinción con tioflavina t	Caracterización de las fibras amiloides

Es muy probable que en este momento se someta una propuesta para la obtención de recursos financieros por parte de alguna instancia patrocinadora. Lo que es un hecho es que esta propuesta se realizará con base en los resultados obtenidos en la primera parte del proyecto.

### 2023

Otoño	invierno	primavera
Expresión y purificación de proteínas recombinantes mutantes. Análisis <i>in silico</i>	Expresión y purificación de proteínas recombinantes mutantes.	Estudio del efecto de la urea en el plegamiento no convencional de la TIM

### 2024

Otoño	invierno	primavera
Estudio del efecto del clorhidrato de guanidina en el plegamiento no convencional de la TIM	Seguimiento del proceso de plegamiento no convencional con sondas fluorescentes. Análisis <i>in silico</i>	Seguimiento del proceso de plegamiento no convencional con microscopía

## **9.- Información para el seguimiento del proyecto:**

### **Calendarización de productos esperados a lo largo del proyecto.**

#### **2021**

##### **Recursos humanos, asistencia a congresos y publicaciones**

2 Servicios sociales  
un Proyecto terminal  
graduar maestría  
Congreso Protein Society  
publicación revisión

#### **2022**

##### **Recursos humanos, asistencia a congresos y publicaciones**

Servicio social  
Ingreso al PCNI (maestría)  
Dos Proyectos terminales  
Congreso Protein Society  
publicación revisión  
Publicar artículo

#### **2023**

##### **Recursos humanos, asistencia a congresos y publicaciones**

1 Servicios sociales  
un Proyecto terminal  
Ingreso al PCNI (maestría)  
graduar maestría  
Congreso Protein Society  
Publicación revisión

#### **2024**

##### **Recursos humanos, asistencia a congresos y publicaciones**

Servicio social  
Proyectos terminales  
graduar maestría  
Congreso Protein Society  
Publicar artículo  
Seguimiento alumna de doctorado.  
Seguimiento alumno de maestría

## Referencias

- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. (1990). "Basic local alignment search tool". *J Mol Biol* 215 (3): 403–410.
- Carcamo-Noriega, E.N. and Saab-Rincon, (2016). Identification of fibrillogenic regions in human triosephosphate isomerase. *PeerJ* 4:e1676; DOI 10.7717/peerj.1676.
- DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System. (2008) DeLano Scientific LLC, Palo Alto, CA, USA. <http://www.pymol.org>
- Cháñez-Cárdenas, M.E., Fernández-Velasco, D.A., **Vázquez-Contreras, E.**, Coria, R. Saab-Rincón, R. and Pérez Montfort, R. (2002). Unfolding of triosephosphate isomerase (TIM) from *Trypanosoma brucei*: Identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 399, 117–129.
- Cháñez-Cárdenas, M.E. and **Vázquez-Contreras, E.** (2002), Two notably similar proteins follow different unfolding pathways. *Revista de la Sociedad Química de México*. 46, Núm. 3 219-222.
- Cháñez-Cárdenas, M.E. Pérez-Hernández, G., Sánchez-Rebollar, B.G. Costas, M. and **Vázquez-Contreras, E.** (2005). The Reversible Equilibrium Unfolding of Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* Involves Stable Dimeric and Monomeric Intermediates. *Biochemistry*. 44, 10883-10892.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. (2002). "MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform". *Nucleic Acids Res* 30 (14): 3059–3066.
- Nájera, H., Costas, M. Y Fernández-Velazco, A. (2003). Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reason for the oligomeric nature of enzyme. *Biochem. J.* 370, 785-792.
- Ostoa-Saloma, P.; Garza-Ramos, G.; Ramírez, J.; Becker, I.; Berzunza, M.; Landa, A.; Gómez-Puyou, A.; Gómez-Puyou, M. T.; Pérez-Montfort, R. (1997). Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* 244, 700-705.
- Pace C.N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* 131, 266-280.
- **Vázquez-Contreras, E.**, Zubillaga, R.A., Mendoza-Hernández, G., Costas, G. and Fernández-Velasco, A. (2000). Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: a monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea. *Protein and Peptide Letters*. 7, 57-64.
- **Vázquez-Contreras, E.**, Sánchez-Rebollar, B.G. and Cháñez-Cárdenas, M.E. (2004). The Equilibrium Folding of Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* is a four state process. Intrinsic fluorescent studies. *Revista de la Sociedad Química de México*. 48, 287-290.
- **Vázquez Contreras, E.**, Pérez Hernández, G., Sánchez-Rebollar B.G. and Cháñez-Cárdenas, M.E. (2005). The unfolding and refolding reactions of Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* follow similar pathways. Guanidinium hydrochloride studies. *American Institute of Physics*. 757, 156-167.

- Zárate-Pérez, F. Chánez-Cárdenas, M.E. and **Vázquez-Contreras, E.** (2008). The Folding Pathway of Triosephosphate Isomerase. In Progress in Molecular Biology and Translational Science (P. Michael Conn, Ed.) Burlington: Academic Press, , Vol. 84, pp. 251-267. ISBN: 978-0-12-374595-8 © Copyright 2008 Elsevier Inc.
- Zárate-Pérez, F. Chánez-Cárdenas, M.E., Arreola, R. Torres-Larios, A. and **Vázquez-Contreras, E.** (2009). Different catalytic properties of two highly homologous triosephosphate isomerase monomers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382, 626-630.
- Zomosa-Signoret, V., Hernández-Alcántara, G., Reyes-Vivas, H., Martínez-Martínez, E., Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gómez-Puyou, M and Gómez-Puyou, A. (2003). Control of the Reactivation Kinetics of Homodimeric Triosephosphate Isomerase from Unfolded Monomers. *Biochemistry.* 42, 3311-3318.