

UNIVERSIDAD
DE
BUENOS AIRES

FACULTAD DE Cs. Ex. y Nat.

SEMINARIO DE LICENCIATURA

TITULO: PARCIAL PURIFICACION Y CARACTERI-
ZACION DE UNA ENZIMA LISOSOMAL
DE T.CRUZI: α -MANOSIDASA

ALUMNO: NESTOR FERNANDO DEBENEDETTO

DIRECTOR: ARMANDO PARODI

AÑO: 1989

INDICE

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
MATERIALES	11
METODOS	14
RESULTADOS	20
DISCUSION	49
BIBLIOGRAFIA	53

AGRADECIMIENTOS

AL Dr. ARMANDO PARODI POR PERMITIR LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO EN SU LABORATORIO.

A MAIA POR EL TIEMPO DEDICADO, ENORME VOLUNTAD Y POR SU SONRISA.

AL LIC. SERGIO GAREGNANI, POR SU BUEN HUMOR Y POR HACER POSIBLE LA IMPRESION DE ESTE TRABAJO.

A MARCELA POR SUS CONSEJOS (NO SIEMPRE SEGUIDOS).

ABREVIATURAS

F P L C : fast pressure liquid chromatography

O.N : toda la noche

U.E : unidad enzimática

A.enz.: actividad enzimática

A.E : actividad específica

BSA : seroalbúmina bovina

SN : sobrenadante

U : unidades

RESUMEN

El desconocimiento acerca del mecanismo por el cual las proteínas lisosomales llegan a esta organela en Trypanosomatidos llevó a la idea de la purificación de la α -manosidasa lisosomal de *T. cruzi*. Esto permitiría luego de su secuenciación la comparación con otras enzimas lisosomales en *T. cruzi* en la búsqueda de secuencias en común que pudieran servir como señal para su transporte a la organela.

El trabajo con α -manosidasa se vio inicialmente dificultado por una fuerte pérdida de actividad durante su conservación, por esto, los primeros ensayos se orientaron a la búsqueda de condiciones de almacenamiento que evitara la rápida disminución de la capacidad catalítica. Mediante estos, se encontró que no habría actividad de proteasa en el material de partida y que la concentración de proteínas no afectaría la conservación de la actividad. Finalmente se encontró que la conservación de la α -manosidasa a 4 °C en presencia de 10 mM de β -mercaptopropano resultaba apropiada para el desarrollo del trabajo.

La α -manosidasa mostró afinidad por la Concanavalina-A, de lo que se deduce que es una glicoproteína de alta manosa.

El pH de máxima actividad fue de 4,5 lo que sugiere que la α -manosidasa estudiada es lisosomal. La enzima conservó gran parte de su actividad después de incubarse 2 h. a 0 °C y a 37 °C a pH superiores a 4. A pH inferiores a este la estabilidad cayó bruscamente luego de la incubación a las

dos temperaturas.

El cálculo del PM de la enzima nativa que se realizó por filtración molecular a través de dos columnas distintas no dio resultados coincidentes, aunque en ambos casos se obtuvieron dos picos de actividad. El FM correspondiente a la filtración en FPLC dio un pico de 200.000 y otro de 220.000.

Con el esquema de purificación seguido no se alcanzó a obtener la enzima purificada a homogeneidad.

El rendimiento fue del 2,2% y la α -manosidasa al final del proceso resultó con un grado de purificación igual a 35.

INTRODUCCION

El Trypanosoma cruzi, causante del MAL DE CHAGAS, es un protozoario, parte de cuyo ciclo de vida se desarrolla en un invertebrado; el parásito utiliza como vector para su transmisión al huésped mamífero, insectos hematófagos de la clase Reduviidae, subfamilia Triatominae, que habitan el continente Americano, especialmente desde el Río Grande, que separa México de los Estados Unidos, hasta el sur de Chile y Argentina.

En el huésped mamífero se multiplica intracelularmente, encontrándose también en la sangre (ver más adelante). A través de ésta pasa al hematófago cuando este pica a un mamífero infectado, completándose así el ciclo de vida. Durante éste, el T. cruzi pasa por distintos estadios morfológicamente distinguibles:

- EPIMASTIGOTE:** mide de 10 a 16 μ de largo. El flagelo emerge desde la región lateral anterior con respecto a la dirección de movimiento del parásito.
- TRYPOMASTIGOTE:** 20-25 μ de largo. El flagelo emerge desde el extremo apical posterior del parásito, con respecto a la dirección del movimiento.
- AMASTIGOTE:** de menor tamaño (6 a 8 μ). Es redondeado y corresponde a la forma intracelular del parásito. Presenta un flagelo muy corto, por esta razón hay autores que prefieren llamarlo esfe-

romastigote(1).

Puede describirse, entonces, el ciclo de vida en dos etapas:

A- Ciclo de vida en el vertebrado:

En este huésped existen dos formas del parásito: el amastigote y el trypomastigote.

Este último es la forma que aparece en la corriente sanguínea e infecta a un amplio rango de células, especialmente células musculares y de la glia. El trypomastigote no se divide. Despues de penetrar en la célula cambia rápidamente a amastigote, el que lleva a cabo una serie de fisiones binarias, aproximadamente una cada 12 h. El número final de amastigotes por célula varia entre 50 y 300 dependiendo del tamaño de la misma. La transformación en trypomastigotes parece comenzar cuando la célula está llena de amastigotes.

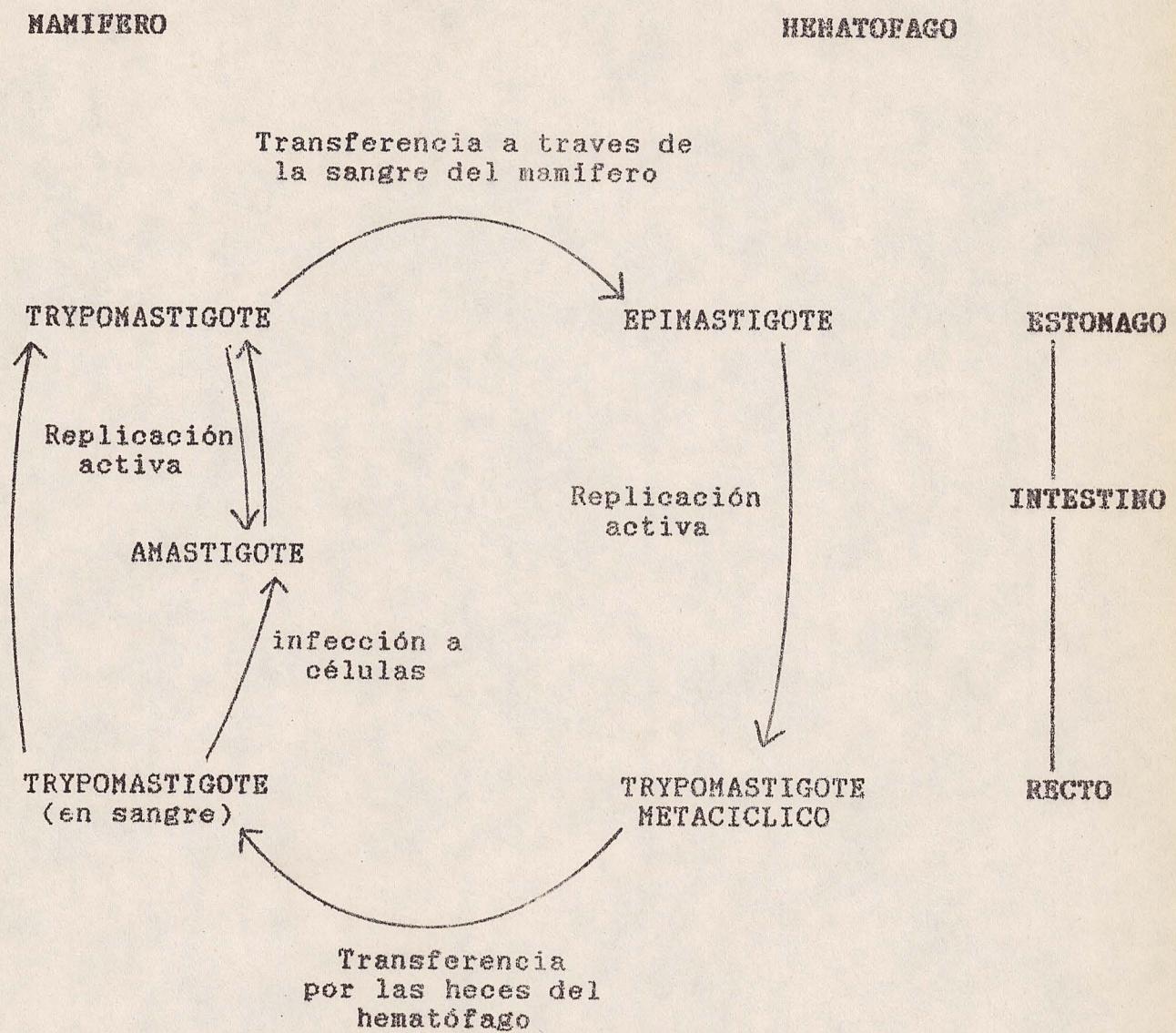
B- Ciclo de vida en el invertebrado:

Comienza con la incorporación de trypomastigotes a través de la sangre de un mamífero infectado.

Así, llega al tracto digestivo del vector en donde sufre una serie de transformaciones morfológicas irreversibles con una secuencia fija, dándose cada estado en un lugar particular.

En el estómago la mayoría de los trypomastigotes cambian rápidamente a epimastigotes. Estos se dividen activamente. En el recto los epimastigotes se diferencian en trypomastigotes metacíclicos infectivos que salen con las heces, permitiéndose así, la transferencia a los mamíferos picados por el hematófago infectado. (ver fig. 1).

Fig.1:ciclo de vida del T.cruzi.



En el *T. cruzi* se destacan:

1- Aparato de movimiento (mastigón): formado por el flagelo y el cuerpo basal o cinetosoma. El cuerpo basal es una estructura cilíndrica formada por nueve tripletes de microtúbulos que en su parte proximal es totalmente intracitoplasmática y en su parte distal se proyecta sobre el flagelo. La vaina flagelar es una extensión tubular de la membrana celular. En su parte distal el flagelo está compuesto por un círculo de nueve pares de microtúbulos.

2- Membrana plasmática: Presenta gran interés por su papel en la interacción huésped-parásito. La membrana tiene un espesor de 8 a 10 nm y se encuentra recubierta por una cobertura superficial de 5 nm de espesor en el epimastigote y 15 nm en el trypomastigote. La membrana presenta del lado citoplasmático un armazón de microtúbulos periféricos dispuestos en forma paralela entre si.

Los distintos estadios del parásito presentan diferencias estructurales en cuanto a la composición de la membrana lo que parece corresponderse con diferencias funcionales. Así, mientras los epimastigotes se lisan por acción directa del complemento, los trypomastigotes circulantes son resistentes (2).

3- El complejo cinetoplasto-mitocondria: Los miembros del orden Kinetoplastida (al cual el *T. cruzi* pertenece) se caracterizan por la presencia de una única mitocondria, considerablemente ramificada, que recorre toda la longitud del parásito y presenta una zona definida, llamada cinetoplasto,

donde se encuentra el DNA mitocondrial, llamado en este caso DNA del cinetoplasto.

El cinetoplasto se encuentra ubicado en la base del mastigón, y esta asociación se mantiene a través de todos los cambios morfológicos del Trypanosoma en su ciclo de vida. En los trypanosomatidos en general, los períodos de replicación del DNA nuclear y del K-DNA son sincrónicos.

4- Glicosomas: esta organela de simple membrana, descubierta en 1977, debe su nombre a que en ella se encontraron la mayoría de las enzimas de la vía glicolítica (3).

Esta ruta es fundamental para la forma trypomastigote ya que en ella se encuentra inhibida la biosíntesis de las enzimas de la cadena respiratoria y del ciclo de Krebs. (4).

El hecho de tener enzimas de esta vía en una organela es exclusivo de Trypanosomatidos, ya que el resto de los eucariotes tienen estas enzimas en el citoplasma.

En el glicosoma se encuentran también enzimas de la fijación del CO_2 , síntesis de lípidos y oxidación de ácidos grasos.

La importación de enzimas al glicosoma dependería de señales topológicas consistentes en un exceso de cargas positivas respecto a sus contrapartes citoplasmáticas, agrupadas en dos o más clusters (5).

5- Lisosoma: son organelas de membrana única que contienen hidrolasas ácidas. Estas enzimas actúan en la digestión intracelular del material ingerido (heterofagia), de partes no deseadas de la propia célula (autofagia) o de secreciones

celulares para controlar su salida (crinofagia). La ruptura de la membrana lisosomal resulta en la muerte celular por autolisis.

En mamíferos las enzimas lisosomales adquieren residuos fosfomanosilos, que son componentes esenciales de un marcador que permite la unión a un receptor específico (receptor Man.6-P) en el retículo de Golgi y la posterior traslocación a lisosoma (6,7).

Este marcador es generado por la acción secuencial de dos enzimas. Primero la N-acetilglucosaminilfosfotransferasa transfiere N-acetilglucosamina 1-P desde el UDP-GlcNAc a residuos de manosa específicos, presentes en oligosacáridos de enzimas lisosomales generando así el intermediario fosfodiester; luego, el residuo de N-acetilglucosamina es removido, quedando expuesto el grupo fosfomanosilo (8).

No se encontraron evidencias de un mecanismo similar en trypanosomátidos.

En homogenatos de epimastigotes de *T.cruzi* se detectó la presencia de doce hidrolasas ácidas y cuatro hidrolasas casi nuetras (9). Estos homogenatos tenían una fuerte actividad proteolítica; por el contrario las actividades de las glicosidases fueron muy débiles excepto para la α -glucosidasa y para α -manosidasa. Esto hace de *T.cruzi* una excepción entre los protozoarios, que en general están provistos de un amplio espectro de hidrolasas ácidas y neutras.

En este trabajo se encaró la purificación y caracterización parcial de una enzima lisosomal de *T.cruzi*: la α -manosidasa.

Esta es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces α -manosa. A diferencia de los vertebrados, en Tripanosomátidos no se conoce cual es el mecanismo por el cual las enzimas lisosomales alcanzan esta organela después de ser sintetizadas.

En 1977 Opperdoes y Borst descubren en *T. brucei* la existencia del glicosoma; este contiene la mayoría de las enzimas de la vía glicolítica asociadas a partícula además de la glicerol quinasa (3). La realización de modelos tridimensionales de tres enzimas glicosomales reveló que tenían en común dos "hot spots", cada uno incluyendo un par de aminoácidos básicos; estos fueron propuestos como señales topológicas que mediarian el transporte de la enzima al glicosoma (5).

La purificación de la α -manosidasa permitiría, mediante el conocimiento de su secuencia primaria, la comparación con otras enzimas lisosomales aisladas de Tripanosomátidos y la búsqueda de señales análogas a las descriptas para las enzimas glicosomales que pudieran relacionarse con la importación de proteínas al lisosoma en estos organismos.

Para su purificación se usaron métodos que permiten la separación de proteínas de una mezcla aprovechando las características de cada una, como por ejemplo, precipitación diferencial en distintas concentraciones de sulfato de amonio, afinidad por Concanavalina-A Sepharosa, carga aniónica a pH 7,4 y movilidad electroforética en geles de poliacrilamida. Se estudio, además, la estabilidad de la

enzima en distintas condiciones de temperatura, pH, concentración de sales, presencia de β -mercaptoetanol, etc. También se determinó el pH óptimo y el peso molecular en columnas de filtración molecular.

Las enzimas lisosomales de *T.cruzi*, a diferencia de lo ocurrido con las enzimas glicosomales que fueron purificadas y exhaustivamente estudiadas, solo fueron detectadas por medición de su actividad en un homogenato total de *T.cruzi*.(9)

MATERIALES

Como fuente de Trypanosomas se usaron epimastigotes de la cepa Tulahuen (stock Tul 2). Estos fueron crecidos entre 27 y 29 en el medio descripto por J.J Cazzulo y col.(10) que contiene:

	g/l
Infusión de cerebro y corazon	33
Triptosa	3
Na HPO .2H O	4
KCl	0,4
Glucosa	0,3
Hemina	0,02
pH=7,2-7,4	
Después de la esterilización se agregan:	
Suero fetal bovino inactivado	10%
Penicilina	100 U/ml (conc.final)
Estreptomicina	10 μ g/ml (conc.final)

Las centrifugaciones se hicieron en una centrifuga Sorvall RC2-B con un rotor SS 34, a excepción de la centrifugación hecha a 100.000 x g que se hizo en una ultracentrifuga Spinco L-2 con un rotor 50 Ty y la cosecha del cultivo de *T.cruzi* que se realizó en un rotor Sorvall GSA a 8.000 x g durante 10 min.

Las precipitaciones diferenciales se hicieron con sulfato de amonio de grado enzimatico.

La Concanavalina-A Sepharosa usada fue de Pharmacia.

La cromatografía de intercambio aniónico se realizó en una FPLC (fast pressure liquid chromatographer) con una columna comercial: Mono Q HR5/5 (Pharmacia).

La electroelución se hizo en elutrap (Shleider y Shull).

Para la determinación del peso molecular se usaron dos tipos de columnas:

A- Columna de Ultrogel ACA 22 LKB de 81 cm. de altura y 1.2 cm. de diámetro interno.

B- Superosa 12 de Pharmacia.

Para la determinación de proteínas se usaron los métodos de Lowry (11) y Bradford (12).

Para la determinación de actividad enzimática se usó p-Nitrofenil α -manopiranósido (Sigma) como sustrato.

Las determinaciones de absorbancia se hicieron en un espectrofotómetro Coleman Junior.

El α -metil manósido usado fue de Sigma.

Los buffers utilizados fueron:

A- Tris 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, pH=7.6

B- Buffer A + 1M final de metil manósido.

C- Tris ClH 50 mM, pH=7.2

D- Acetato de sodio 0.1 M pH=4, p-Nitrofenil α -manopiranósido 6 mM, (concentraciones finales en la mezcla de incubación).

E- Glicina 130 mM, NaCl 70 mM, CO₂ Na 80 mM, pH=11.

F- Tris ClH 50 mM, SDS 0.5%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.005%, mercaptoetanol 1%.

G- Tris ClH 50 mM, NaCl 200 mM, pH=7.2

H- Tris ClH 50 mM, NaCl 200 mM, Cl⁻ Mg 1 mM, pH=7.2

I- Tris ClH 50 mM, glicerol 20%, pH=7.2

J- Tris ClH 50 mM, lubrol 0.05%, pH=7.2

K- Tris ClH 50 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, pH=7.2

Las soluciones usadas fueron:

I- Sacarosa 0.25 M, mercaptoetanol 5 mM, EDTA-Na 5 mM, pH=7.2

II- Solución I + 0.1 M de TLCK (tosil-lysine clorometilcetona)

METODOS

I- Cosecha y ruptura del *T. cruzi*:

Cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial del crecimiento el material fue centrifugado a 3.000 x g 10 min.

El pellet se lavó dos veces con la solución I.

Los epimastigotes se rompieron por tres ciclos de congelamiento a -20°C y descongelamiento.

La ruptura se verificó al microscopio óptico.

II- Fraccionamiento subcelular:

El material roto se centrifugó 10 min. a 5.800 x g para bajar trypanosomas enteros, núcleos y grandes restos de membrana.

El sobrenadante se centrifugó 15 min. a 17.200 x g, con lo que se peletean fragmentos chicos de membrana y organelas no rotas.

Finalmente, el sobrenadante del paso anterior se centrifugó 60 min. a 100.000 x g para separar microsomas, ribosomas y pequeños restos de membrana.

El sobrenadante de último paso compuesto por material citoplasmático y material liberado de las organelas rotas, se utilizó como fuente de enzima y se lo llamó extracto crudo.

III- Purificación de la enzima:

1- Precipitación con sulfato de amonio:

El extracto crudo de la enzima se sometió a una precipitación diferencial con sulfato de amonio.

El rango de corte elegido fue entre 40% y 60% de la sal, porque allí la muestra precipita con mayor actividad específica.

Todo el procedimiento se realizó a 4 °C.

2- Afinidad a lectina: Concanavalina-A

El precipitado del paso anterior se resuspendió en un volumen de buffer A y se incubó con un volumen de Con-A Sepharosa en batch (previamente lavada con buffer A), durante 20 min. a 0 °C.

La elución se realizó por pasos incubándose a 37 °C 15 min. con buffer B.

3- Cromatografía de intercambio aniónico:

Antes de ser inyectado en la columna, el eluido de Con-A se dializó O.N contra el buffer III y luego se filtro a través de una membrana de Millipore de 0,25 μ m. La elución se realizó con un gradiente continuo de 0 a 0,5 M de NaCl en buffer III.

Se recogieron fracciones de 0,5 ml.

4- Segundo pasaje por columna de MONO Q:

Las fracciones de mayor actividad del primer intercambio aniónico se juntaron y se llevaron a 30 mM de NaCl para ser cromatografiadas en las mismas condiciones.

5- Corrida en gel nativo en tubo

La fracción de mayor actividad de la segunda MONO Q

se llevó a 10% de glicerol y 0,002% de azul de bromofenol para someterla a electroforesis en gel de poliacrilamida de 7% en condiciones nativas (13,14). El gel se reveló por actividad sumergiéndolo en buffer D. La zona que indicaba actividad enzimática se cortó y se electroeluyó O.N a 100 V.

IV- Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS:

Las muestras a correr se llevaron a seco y se resuspendieron en buffer F. Luego se hirvieron 2 min. y se sembraron en gel de poliacrilamida-SDS 12,5% (15).

El gel se reveló según el método de Oakley et al(16).

V- Determinación de la actividad enzimática:

Se incubaron de 5 a 100 μ l de enzima con 400 μ l de buffer D a 37 °C durante tiempos variables.

La reacción se detuvo con el agregado de cuatro volúmenes de buffer E. El color formado debido al paranitrofenol liberado en medio alcalino se cuantificó por medición de absorbancia a 400 nm.

VI- Curva de calibración: Absorbancia a 400 nm. vs. moles de p-Nitrofenol.

Con el objeto de expresar la A.enz. como moles de p-Nitrofenol liberados por minuto, distintas masas de p-Nitrofenol se trataron de la misma manera que para las mediciones de A.enz. y se midió su absorbancia a 400 nm. Todas la mediciones de hicieron por cuadruplicado.

Una U.E convierte 1 mol de sustrato en producto en un

minuto a 37 °C.

VII- Determinacion del pH óptimo:

Con este objeto, una fracción parcialmente purificada de la α -manosidasa (eluido de Con-A) se incubó con el sustrato en un amplio rango de pH, para la cual se prepararon los siguientes buffers:

Buffers	pH
Tris ClH	8,5; 8; 7,5
Acetico/acetato	6,5; 6; 5,5; 5; 4,5; 4; 3,5
Glicina ClH	4; 3,5; 3; 2,5; 2

Las concentraciones finales de los buffers y el sustrato fueron 50 mM y 6 mM respectivamente.

Todas las mediciones se hicieron por duplicado.

VIII- Estabilidad frente al pH y la temperatura:

Se midió incubando la enzima parcialmente purificada (eluido de Con-A) a 37 °C y 0 °C en los buffers señalados en el punto anterior. Luego de dos horas se llevó la solución a pH 4, se agregó el sustrato (p-Nitrofenil α -manopiranósido), se incubó a 37 °C y se midió la actividad enzimática.

Las concentraciones finales de buffer y sustrato fueron iguales a las indicadas en el item VII.

IX- Estimaciones del peso molecular:

A- En ULTROGEL ACA 22.

Rango de fraccionamiento: 100.000 a 3.000.000

Velocidad de flujo: 0,2 ml/minuto

Volumen muerto: 36 ml.

Volumen de exclusión: 41 ml. Determinado por
pasaje de azul dextrano.

Para la calibración de la columna se corrieron los
siguientes marcadores de PM en forma independiente:

Tiroglobulina: 670

Catalasa: 230-250

Las corridas se hicieron en buffer G.

El volumen de elución de los marcadores se determinó
con el método de Bradford y el de la α -manosidasa
por actividad enzimática.

B- Filtración molecular en FPLC:

Para ajustar el cálculo del PM obtenido por
filtración molecular, la enzima se sometió a una
cromatografía de fraccionamiento molecular en FPLC
con una columna comercial: Superosa 12 de Pharmacia.

Rango de fraccionamiento: 1.000 - 300.000

Velocidad de flujo: 0,5 ml / minuto.

Volumen de fracción: 0,3 ml

El volumen de elución de la α -manosidasa se
determinó por actividad enzimática.

La columna se calibró corriendo los siguientes
marcadores en forma independiente:

MARCADOR	PM	METODO DE DETECCION
CATALASA	230-250	ENZIMATICO
ALDOLASA	145.000	ENZIMATICO
BSA	67.000	MEDICION DE PROTEINAS
QUIMOTRIPSINOGENO	25.000	MEDICION DE PROTEINAS

RESULTADOS

1- Curva de calibración:

Para convertir las unidades de absorbancia en moles de p-Nitrofenol liberado se construyó la siguiente curva de calibración (figura 2)

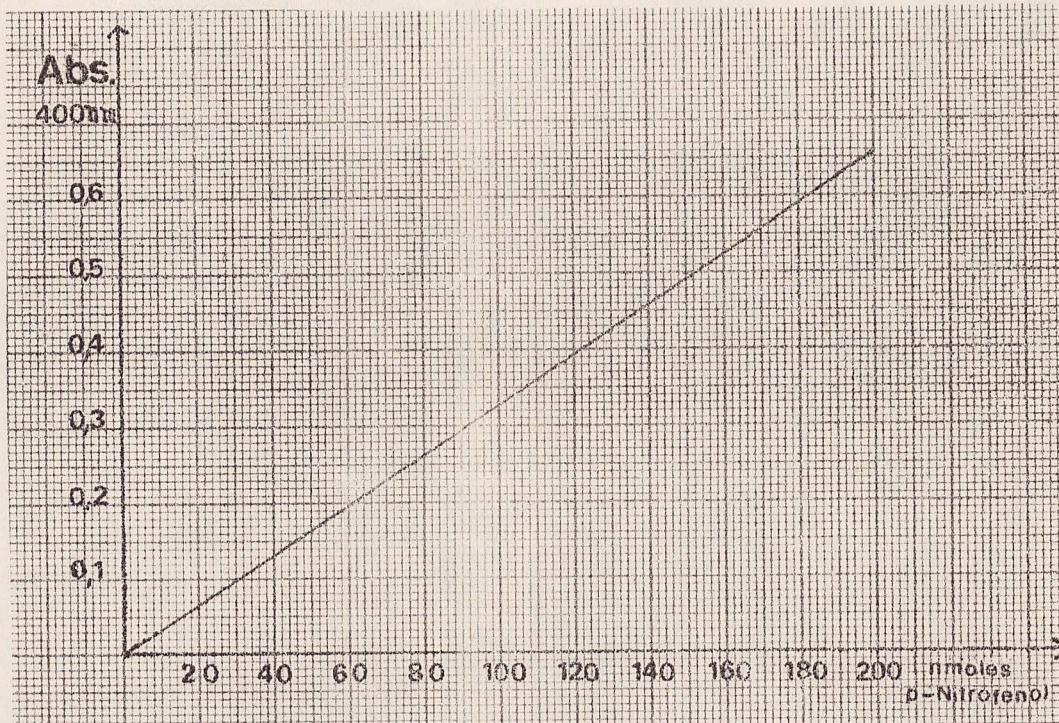


Figura 2: a partir de una solución 10 mM de p-Nitrofenol en buffer acetato 0,1 molar, pH=4, se hicieron diluciones en el mismo buffer para tener distintas masas de p-Nitrofenol. Luego se agregaron 2 ml de buffer E por tubo y el color formado se cuantificó por medición de absorbancia a 400 nm.
En abscisas se representan los n-moles de p-Nitrofenol en solución.
En ordenadas se grafica la absorbancia registrada a 400 nm por las distintas soluciones.

Una unidad de actividad convierte un mol de sustrato en producto en un minuto a 37 °C.

2- Estabilidad de la enzima:

Durante los primeros ensayos de este trabajo se detectó una fuerte pérdida de A.enz. durante la conservación de distintas fracciones de la enzima.

La purificación de la α -manosidasa requería como trabajo previo un estudio sobre las condiciones en las que se pudiera guardar la enzima a fin de evitar la fuerte disminución de la actividad que se observaba tanto en extractos crudos como en fracciones parcialmente purificadas de la misma durante su almacenamiento.

Para ver si había actividad de proteasa en la mezcla o bien si la dilución de proteínas, producida durante la purificación de la muestra, afectaba la conservación de la actividad se hicieron diluciones 1/10 y 1/30 de un sobrenadante de 100.000 x g en tres medios en los que se la guardó congelada durante 48 h. La conservación de la actividad de la α -manosidasa en cada dilución se comparó con un control en el que la concentración de proteínas se elevó mediante el agregado de BSA.

Los resultados se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Medio	Dilución	BSA	U.E luego del		% de actividad
			0 h.	48 h.	
luego de 48 h.					
Solución I	1/10	+	28,8	19	65
		-	31,2	15,6	50
	1/30	+	12	3,6	30
		-	14,4	4,5	31
Buffer G	1/10	+	33,6	24,8	63
		-	28,8	21,2	73
	1/30	+	18	7,5	42
		-	16,8	8,9	53
Buffer H	1/10	+	33,6	15	44
		-	28,8	21,2	73
	1/30	+	16,8	7,1	42
		-	21,6	6,9	32

La fuente de enzima fue un extracto crudo de 324 U.E/ml que tenía 9,5 mg/ml de proteína.

El agregado de BSA se hizo hasta 6 mg/ml de concentración final de proteínas.

De acuerdo a los resultados no habría una relación importante entre la conservación de la actividad

enzimática y la concentración de proteínas en diluciones 1/10 y 1/30. Además, el hecho de que se perdiera más actividad en diluciones mayores, en una primera aproximación, sería contrario a la existencia de una proteasa activa.

En la actividad medida antes de congelar se observa una menor actividad enzimática en la solución I, respecto a los buffers G y H; este efecto es más notable en la dilución 1/30, podría deberse a la presencia de β -mercaptoetanol en la solución I.

De acuerdo a la actividad luego de 48 h. de congelamiento, en la dilución 1/10 habría una mayor estabilidad que en la dilución 1/30. Se estudió entonces, si esto podía deberse a la dilución de algún factor que estuviera presente en el extracto crudo y contribuyera a la conservación de la actividad enzimática.

Con este objetivo, a la dilución 1/30 se le agregó una fracción del sobrenadante de 100.000 x g previamente inactivado por calentamiento a 100 °C durante 10 min.

Los resultados se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Medio	Dilución	Solución inactivada	U.E luego del tiempo de con- gelamiento		% actividad luego de 48h de congel.
			0 h.	48 h.	
Solución I	1/10	-	21	19,6	94,2
	1/30	+	6	7,2	120
	1/30	-	4,4	7,5	170
Buffer G	1/10	-	23	17,6	76,5
	1/30	+	11	7,3	64
	1/30	-	7	2,6	38
Buffer H	1/10	-	30	13,7	45,7
	1/30	+	8,8	4,8	54
	1/30	-	9,2	5,8	63

La fuente de enzima fue la misma que la usada en el experimento de la Tabla 1, pero al momento de este ensayo (7 días después) tenía 300 U.E/ml.

No se detectó A.enz. en la solución usada como fuente del supuesto factor.

A pesar de que los valores de conservación de la A.enz. en solución I no concuerdan con lo esperado, ya que siempre se perdía A.enz. luego de un congelamiento, puede verse que la adición de la solución inactivada no

contribuye a la estabilización de la α -manosidasa durante el congelamiento de 48 h.

Al igual que la Tabla 1, puede verse una menor A.enz. en la solución I, respecto a los buffers G y H.

La presencia de Mg^{2+} en concentración 1 mM no modifica la actividad ni la estabilidad de la α -manosidasa.

Posteriormente se ensayó como afectaban a la estabilidad de la A.enz. el tiempo de congelamiento y el número de pasos de congelamiento y descongelamiento, comparándose los resultados con los obtenidos con la enzima guardada a 4 °C.

Estas incubaciones se hicieron en distintos medios para probar el efecto del glicerol, el lubrol y el β -mercaptoetanol.

Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

A.enz. EN LAS FRACCIONES

DIA	C.a	C.b	C.c	I.a	I.b	I.c	J	K
0	56	56	56	51	51	51	42	45
2	50	43	-	42	42	-	36,5	39
5	36	46	-	44	38,5	-	42	39
8	42	25	41	33	26	42	25	38

Fuente de enzima: precipitado con sulfato de amonio.

C.a - I.a: enzima en buffers C e I conservada a 4 °C.

C.b - I.b: enzima en buffers C e I congelada y descongelada los días de ensayo.

C.c - I.c: enzima en buffers C e I congelada y descongelada el ultimo dia de ensayo.

J: enzima en buffer J guardada a 4 °C.

K: enzima en buffer K guardada a 4 °C.

Como puede verse comparando las fracciones C.b con C.c y la I.b con I.c los pasos de congelamiento y descongelamiento disminuyen la A.enz., no asi el tiempo de congelamiento.

Surge de estos resultados la conveniencia de mantener la enzima guardada a 4 °C para evitar el congelamiento (comparar actividad en el dia 8 de las fracciones C.a y C.b y de la I.a con la I.b)

El glicerol al 20% y el lubrol al 0.05% no fueron útiles para la conservación de la A.enz. a 4 °C en ese tiempo.

En cambio, el uso de β -mercaptoetanol, si bien causó un descenso inicial en la A.enz., contribuyó a mantenerla a lo largo del experimento.

Para saber si la parcial inactivación de la enzima por la presencia de mercaptoetanol era reversible, se diluyó 20 veces la fracción K luego de la medición del día 8. La A.enz. resultante, corrigiendo por el factor de dilución resultó ser de 48 U.E/ml, lo que indica que la inactivación es parcialmente reversible.

De acuerdo a estos resultados las fracciones de α -manosidasa fueron conservadas a 4°C en β -mercaptoetanol 10 mM.

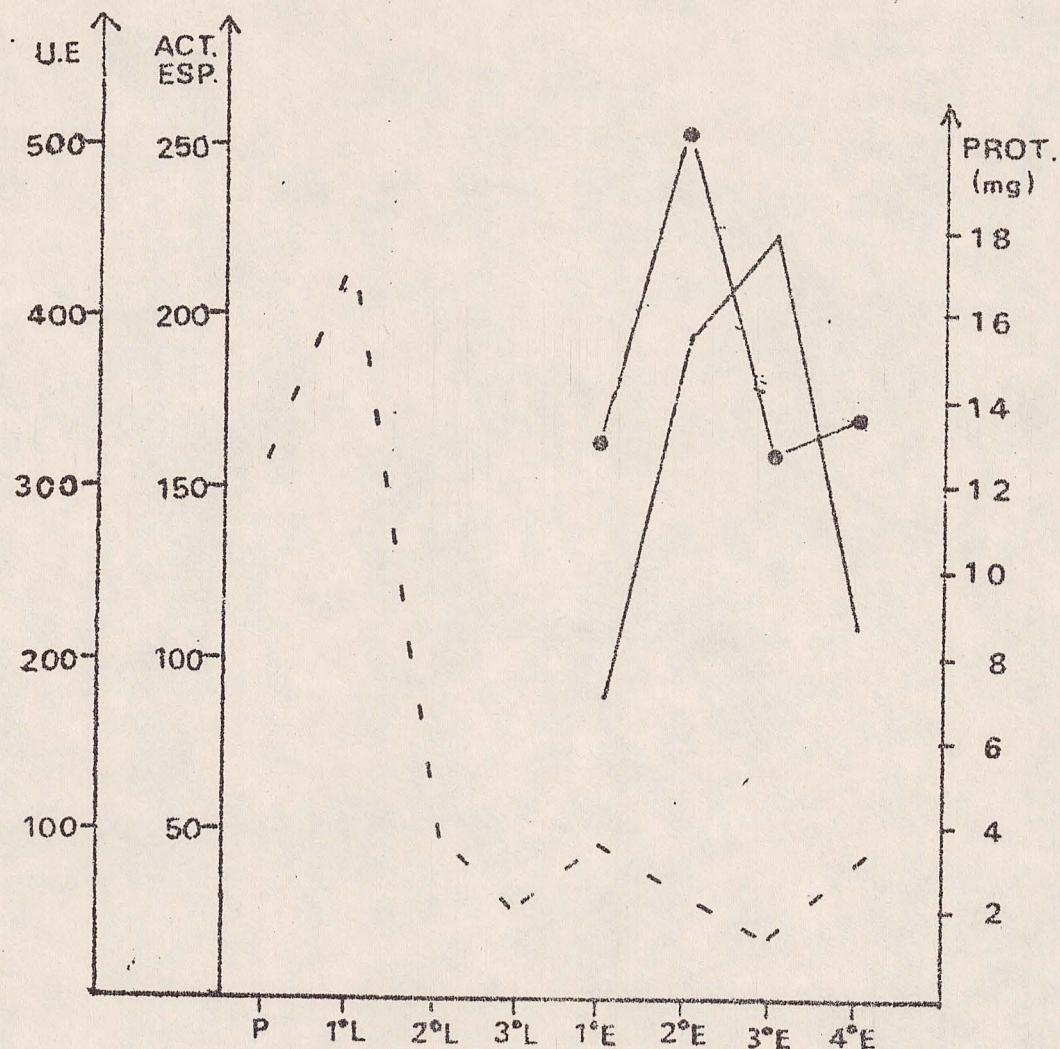
A pesar de que en el día 8 la A.enz. en la fracción C.a resultó algo superior a la encontrada en la fracción K, todos los ensayos realizados en medios conteniendo α -manosidasa guardada a 4°C revelaron una rápida pérdida de A.enz. en ausencia de β -mercaptoetanol.

3- Caracterización de la enzima:

A- Para estudiar si la α -manosidasa es una glicoproteína, una fracción de la misma se incubó con Con-A Sepharosa y se analizó su capacidad de pegado como se describe en METODOS (la glicoproteínas de alta manosa tienen afinidad por Con-A).

Los resultados se ven en la Figura 3.

Fig. 3: afinidad de la α -manosidasa por Con-A.



Fuente de enzima: precipitado de sulfato de amonio

Actividad total: 2.757 U.E

Proteína total: 34,2 mg.

Actividad específica: 80,6 U.E/mg.

P: percolado.

1° L, 2° L, 3° L: lavados.

1° E, 2° E, 3° E, 4° E: pasos de elución.

----- proteína total.

—●— actividad enzimática total.

——— actividad específica.

No se detectó A.enz. durante los pasos de lavado lo que indica que la α -manosidasa permaneció unida a la Con-A hasta el momento de realizar las eluciones. Además, las proteínas distintas de α -manosidasa sin afinidad por Con-A se despegaron durante los pasos de lavado.

De su afinidad por Con-A se concluyó que la α -manosidasa es una glicoproteína de alta manosa.

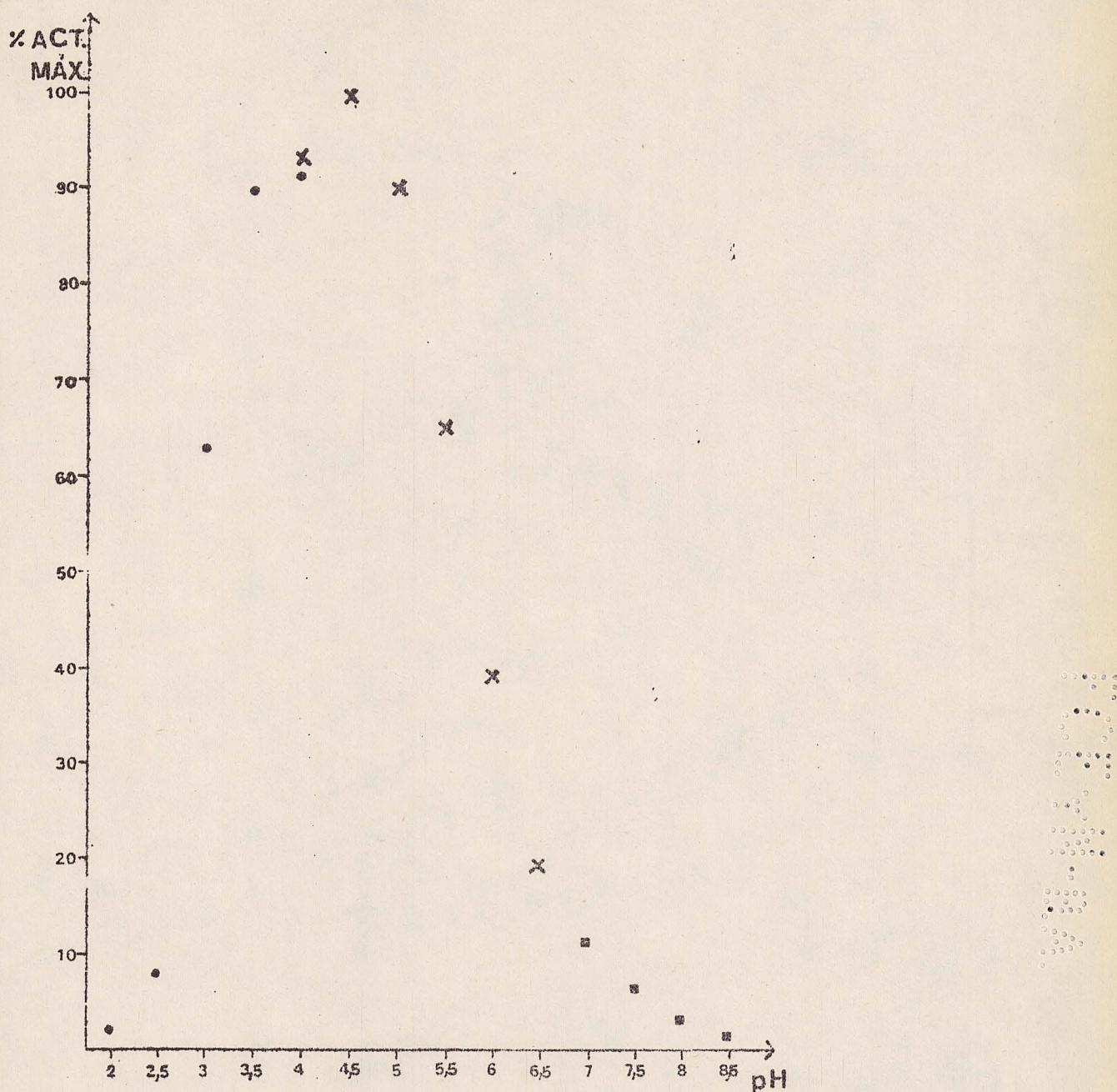
Debido a esto se decidió usar al pasaje por Con-A como un paso de purificación de la enzima.

La α -manosidasa es una glicosidasa ácida.

Para determinar el pH óptimo de acción, se hicieron incubaciones de una fracción parcialmente purificada de la enzima con el sustrato en distintos buffers de manera de cubrir un amplio rango de pH.

Los resultados obtenidos están graficados en la Figura 4.

Fig. 4: actividad enzimática a distintos pH.



Fuente de enzima: eluido de Con-A.

Las A.enz. se expresan como porcentajes de la A.enz. obtenida a pH=4,5

- reacción en buffer glicina - ClH.
- X reacción en buffer acetato/acético.
- reacción en buffer Tris - ClH.

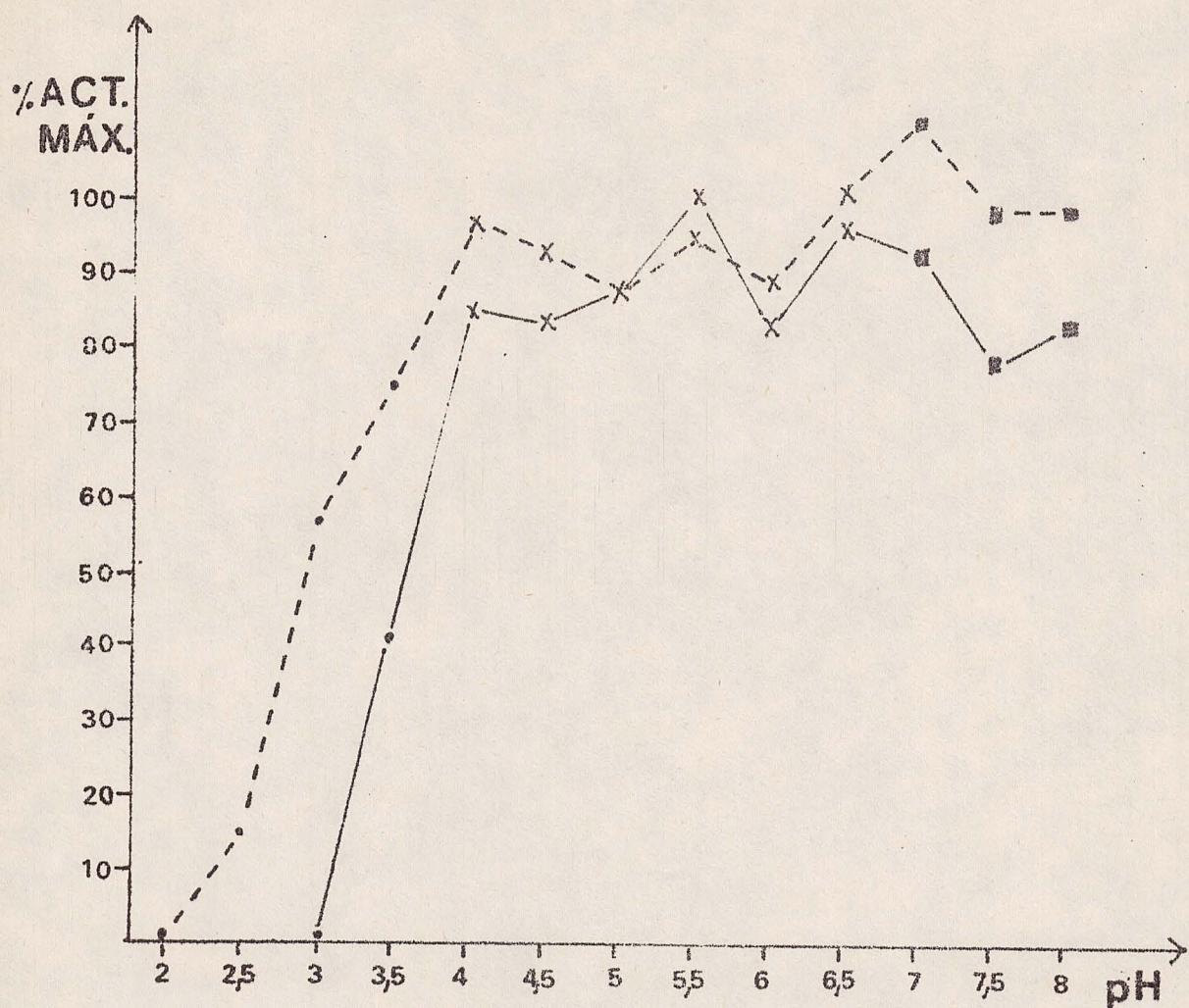
El pH óptimo de catalisis de la α -manosidasa de *T.cruzi* es 4,5 ;esto sugiere que la ubicación de la enzima es lisosomal.

C- Estabilidad de la α -manosidasa a distintos pH a 0 $^{\circ}$ C y a 37 $^{\circ}$ C.

Para estudiar el efecto del pH sobre la conservación de la A.enz., se incubó la enzima en diferentes pH durante 2 h., a 0 y 37 $^{\circ}$ C, luego de lo cual se llevó la solución a pH=4 y se midió la A.enz. Esta se comparó con la obtenida al mismo pH sin incubación previa.

Los resultados se muestran en la Figura 5.

Fig. 5: estabilidad de la enzima a distintos pH a 0 y 37 $^{\circ}$ C.



Fuente de enzima: idem Figura 3.

Las A.enz. se expresan como porcentajes de la A.enz. obtenida sin incubación previa.

• reacción en buffer glicina - ClH.

x reacción en buffer acetato/acético.

■ reacción en buffer Tris - ClH.

— 37 $^{\circ}$ C

- - - 0 $^{\circ}$ C

La enzima conservó gran parte de su capacidad catalítica luego de 2 h. de incubación a 0 °C y a 37 °C a pH=4. Lo mismo ocurrió a pH mayores. En cambio, la α -manosidasa perdió rápidamente A.enz. cuando se incubó a pH extremadamente ácidos.

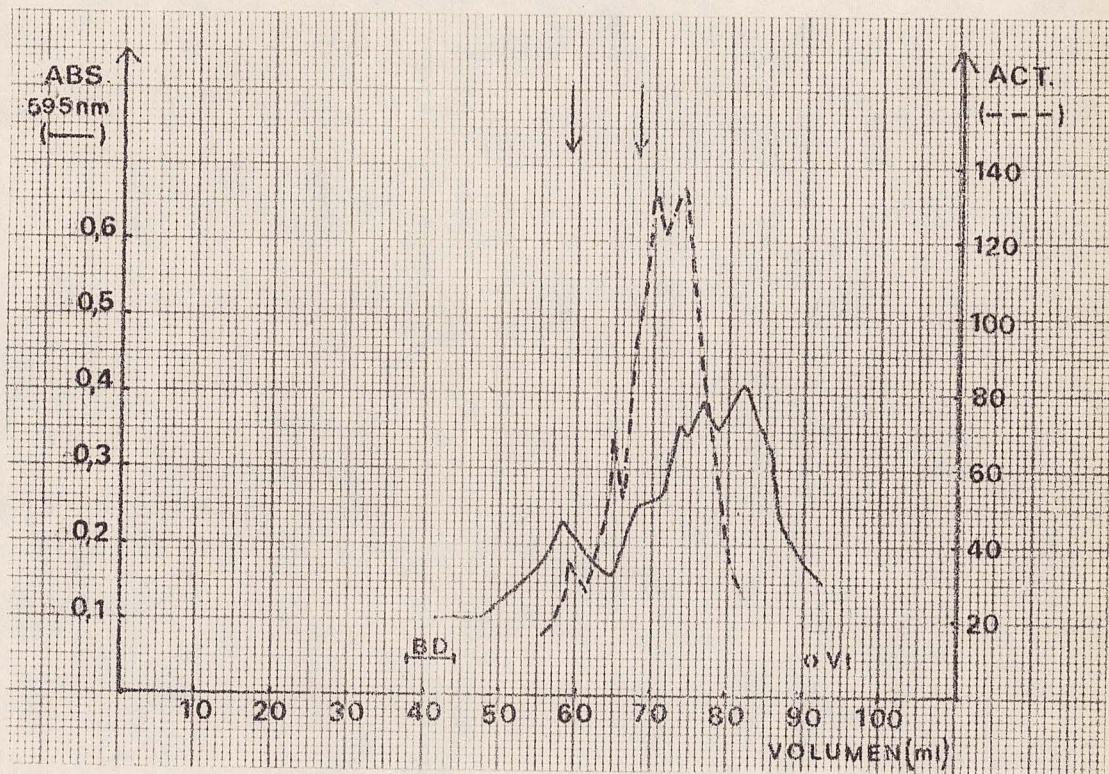
En el rango de pH estudiado la estabilidad a 0 °C fue ligeramente superior a la obtenida a 37 °C.

D- Determinación del PM.

El PM aproximado de la enzima nativa se determinó inicialmente mediante una cromatografía de filtración molecular en ULTROGEL ACA 22 LKB.

En la Fig.6 se muestra el perfil de elución de proteínas y de la α -manosidasa, así como el volumen de elución de los marcadores usados para calibrar la columna.

Fig.:6



Las flechas señalan los volúmenes de elución de la tiroglobulina (59 ml) y de la catalasa (68 ml).

━ : volumen de exclusión total.

○ : volumen total de la columna.

La medición de proteínas se realizó por el método de Bradford.

Como se ve en la figura, la α -manosidasa eluyó en dos picos bien diferenciados (70 y 74 ml); este resultado se repitió en otra corrida por la misma columna, realizada en las mismas condiciones.

Con estos volúmenes de elución se calcularon los K_{av} y los PM correspondientes, de acuerdo a la calibración previa. Estos fueron:

A- 190 (Ve=70 ml)

B- 120 (Ve=74 ml)

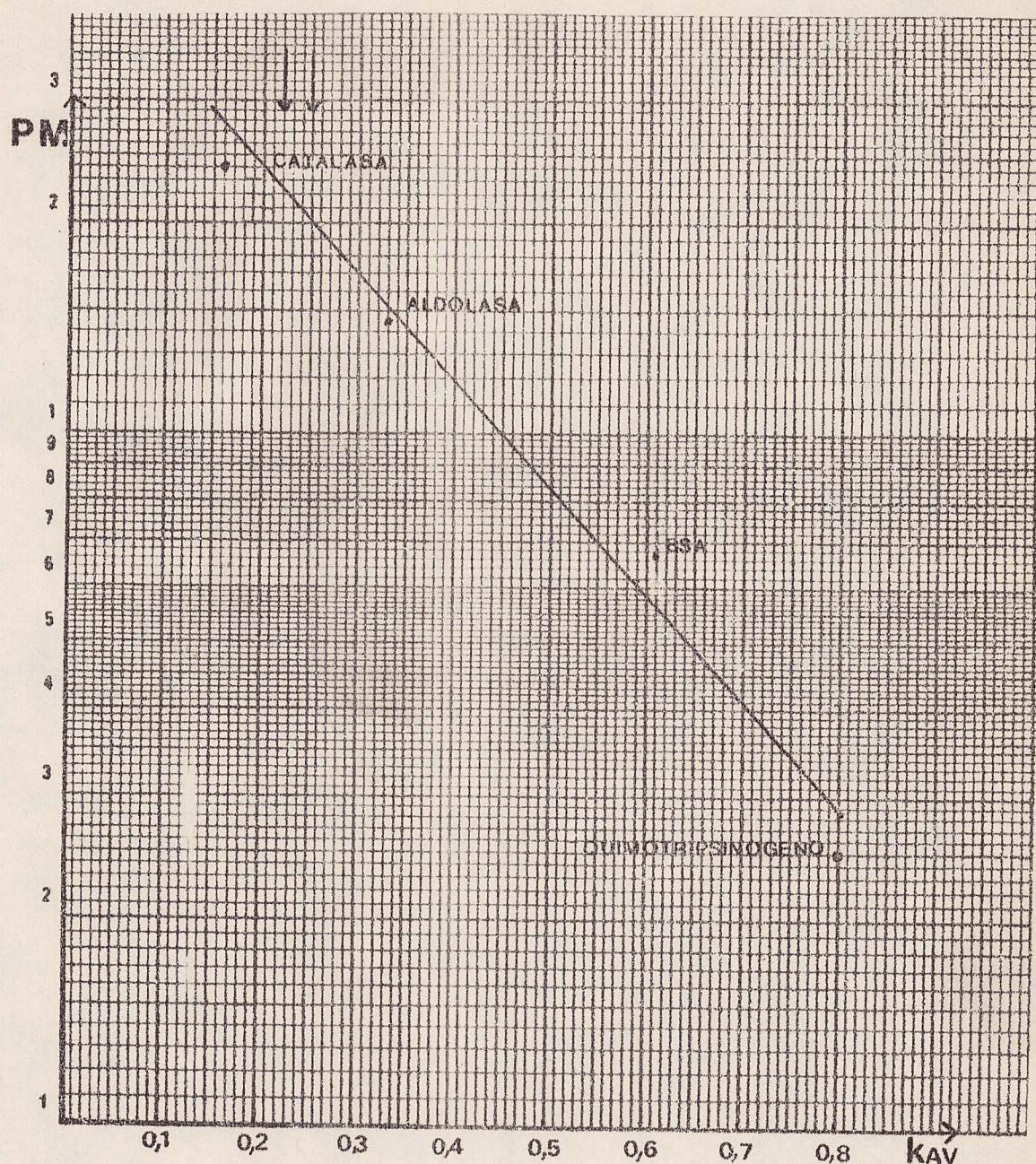
Para ajustar el cálculo del PM de la enzima nativa se realizó una cromatografía de filtración molecular en FPLC. La muestra se inyectó en una columna con rango de fraccionamiento apropiado para el PM molecular estimado anteriormente: Superosa 12. Luego de la cromatografía solo se detectaron dos fracciones con A.enz. En la Fig. 7 se muestra la calibración de la columna y los K_{av} correspondientes a los dos volúmenes de elución detectados.

De acuerdo a esta calibración los PM obtenidos fueron:

A- 220 (K_{av} = 0.22)

B- 200 (K_{av} = 0.25)

Fig. 7



Las flechas indican los Kav correspondientes a los volúmenes de elución de las fracciones con A.enz.

E- Purificación de la α -manosidasa.

E.1: Método de ruptura del material.

Para obtener una fuente de enzima a partir del cultivo de *T.Cruzi* debían romperse las membranas del parásito. Esto comenzó haciéndose por congelamiento y descongelamiento según se describe en Métodos. Ante la evidencia de que estos pasos disminuían la A.enz. se comparó el método descripto con la ruptura por fricción con arena en un mortero. Para ello, un cultivo de epimastigotes fue separado en dos fracciones que se sometieron a los dos métodos de ruptura.

Los resultados se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

	Masa de <i>T.cruzi</i> (g)	Vol.de solución (ml)	A.enz. (U.E)	Prot. (mg)	A.E (U.E/mg)	A.enz./masa <i>T.cruzi</i> (U.E/g)
A	2,2	9	210,6	12	17,6	95,4
B	1,5	7	343	44	7,8	228,7

A: roto por arena.

B: roto por congelamiento.

Si bien se tuvo una mayor actividad específica rompiendo con arena, se obtuvo mayor cantidad de enzima

activa con la ruptura por los pasos de congelamiento y descongelamiento, como puede verse en los valores de A.enz./masa de *T.cruzi*. En base a los resultados, se utilizó este método para la obtención de α -manosidas a partir de cultivos de *T.cruzi*.

E.2: Precipitación con sulfato de amonio.

Para determinar el corte con sulfato de amonio más apropiado para purificar una fracción cruda, un SN de 100.000 x g se precipitó con distintos porcentajes de sulfato de amonio y en estos precipitados se midió la actividad específica, tal como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5

% de sulfato de amonio	A.enz. total (U.E)	Prot.total (mg)	A.E (U.E/mg)
0-40	2.2	1	2.2
40-60	32.6	3.4	9.3
60-80	N.D	3.6	-

El material de partida (S.N 100.000 x g) tenía una A.E=1.5

N.D= no detectado.

En base a estos resultados se decidió el uso de la precipitación entre 40 y 60 % de sulfato de amonio, ya que permitía una mayor purificación en el primer paso

del e quema.

E.3:Afinidad por lectina:Concanavalina-A

El precipitado del paso anterior se resuspendió en el mínimo volumen de buffer A y se pasó por Con-A en batch como se describe en **Métodos**.

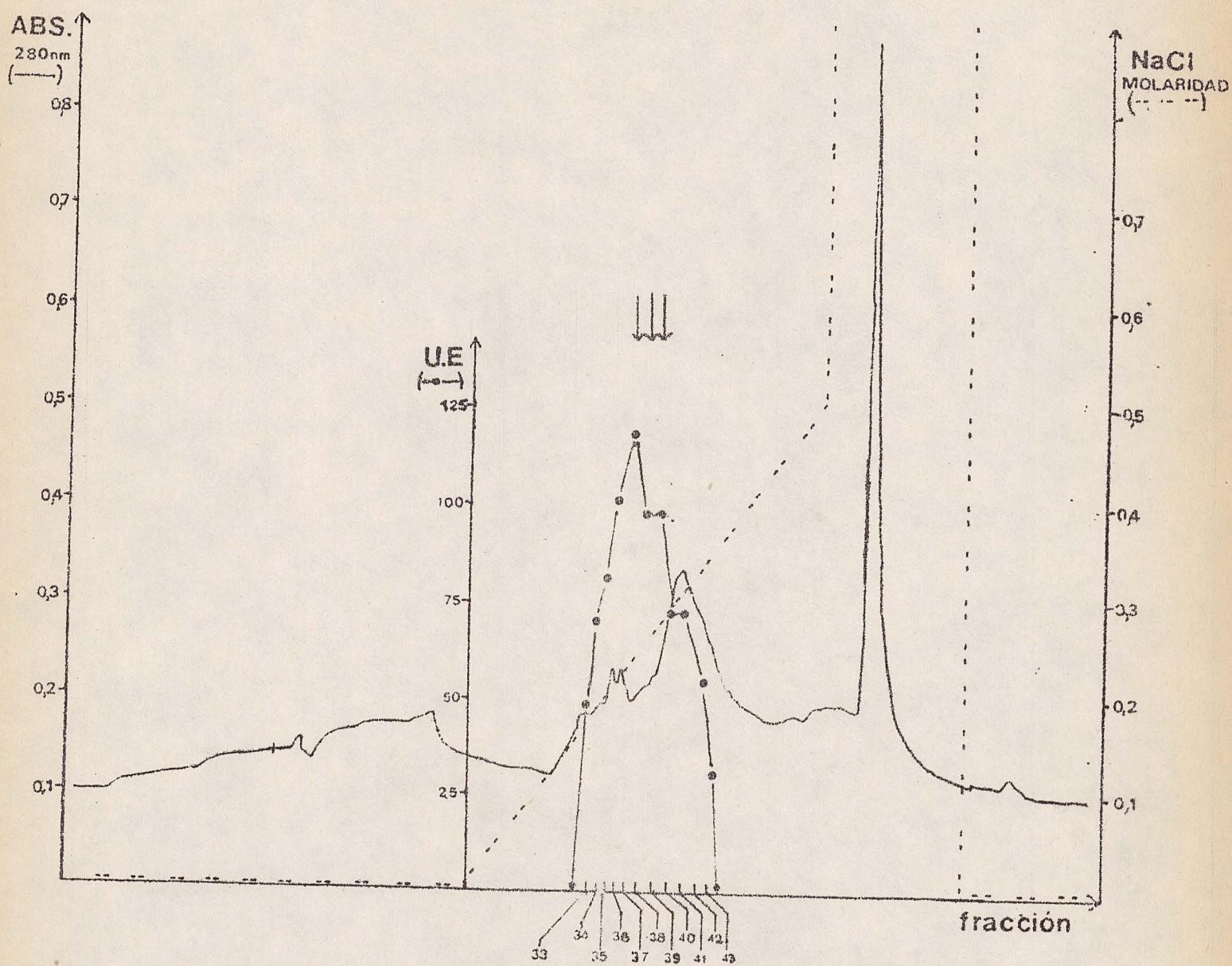
Como se ve en la Fig.2, la mayoría de las proteínas salen antes de los pasos de elución con α -metilmanosido, mientras que solo se detectó A.enz. durante la elución. Esto hace del pasaje por la lectina un buen paso de purificación.

E.4:Primer intercambio aniónico.

El material dializado proveniente del paso anterior se inyectó en una columna de intercambio aniónico.

En la Fig.8 se muestran el perfil de proteínas y de actividad enzimática eluidas de la columna. En todas las cromatografías de intercambio aniónico realizadas el pico de A.enz. se obtuvo eluyendo con 0.25 M de NaCl.

Figura 8: perfil de corrida del primer intercambio aniónico



La abs. a 280 nm se usó como medida de la concentración de proteínas.

La actividad enzimática se expresa en unidades enzimáticas (U.E.).

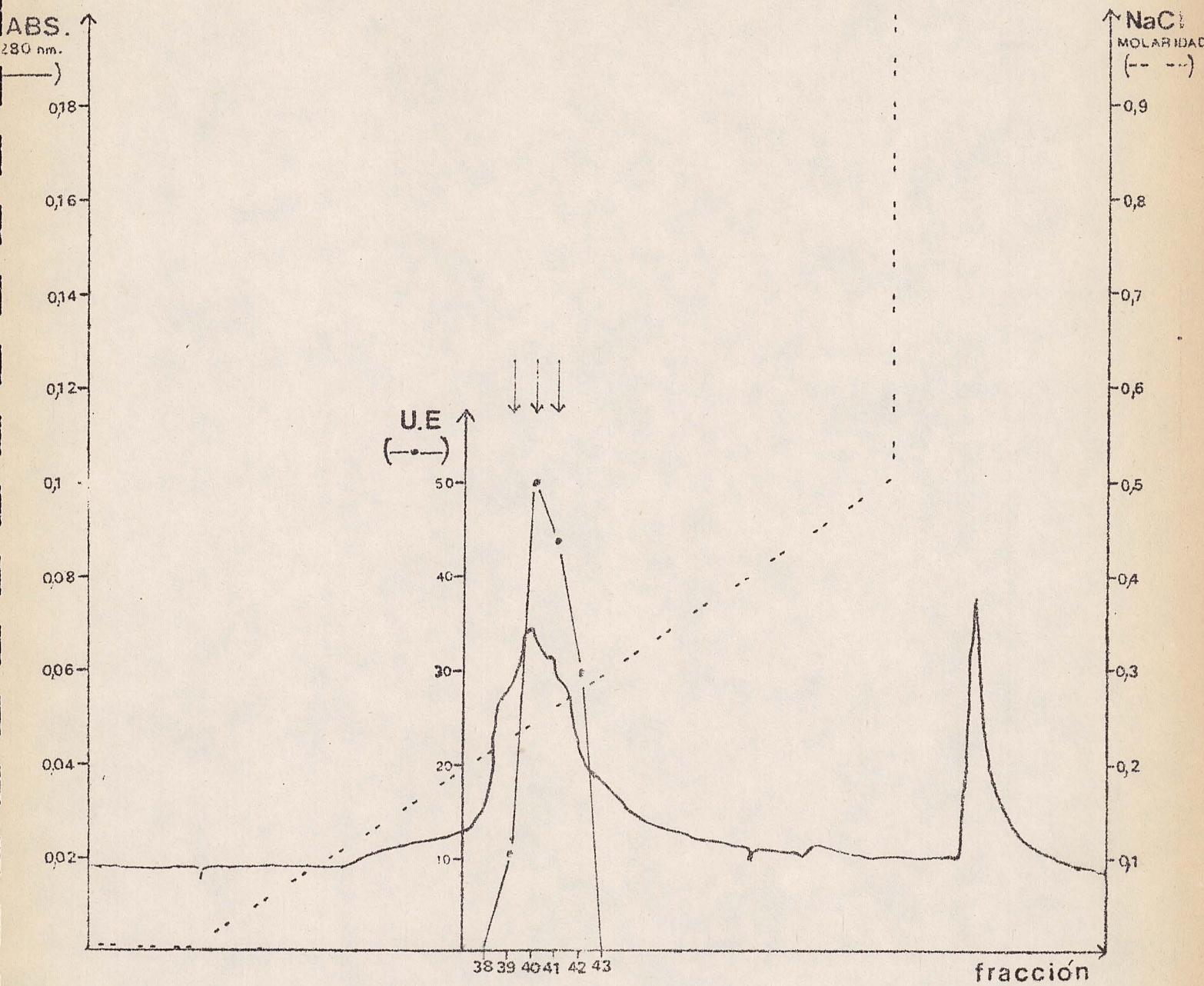
Las flechas señalan las fracciones que se recromatografiaron en la columna de intercambio aniónico.

En este gráfico puede verse un pico de proteínas a la altura del pico de actividad enzimática.

E.5:Segundo intercambio aniónico.

Las fracciones 37,38 y 39 se recromatografiaron en la misma columna. El perfil de elución se muestra en la Fig.9

Fig.9:segundo pasaje por intercambiador aniónico



La abs a 280 nm. se usó como medida de la concentración de proteínas.

La actividad enzimática se expresa en unidades enzimáticas (U.E.).

Las flechas señalan las fracciones que se corrieron en gel nativo.

Como muestra la Fig.9 a la altura de la elución de la α -manosidasa habría al menos cuatro proteínas.

E.6:Corrida en gel nativo.

Las fracciones 39,40 y 41 del paso anterior se corrieron en un gel nativo de poliacrilamida al 7%.

Solamente se detectó A.enz. en las fracciones 40 y 41. En ellas, el gel se cortó a la altura de donde se encontraba la enzima para electroeluirlo. El producto de estas electroeluciones se sembró en un gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE).

E.7: Tabla de purificación.

Para estudiar la eficiencia del esquema usado para purificar la enzima y la de cada paso en particular, se construyó una tabla de purificación a partir de las mediciones de A.enz. y proteínas de los distintos pasos del proceso (ver próx. pág.).

Fracción	Vol (ml)	Activ.tot. (U.E.)	Prot. tot. (mg.)	A.E (U.E/mg.)	Rend. (%)	Purif.
SN 100	25	4250	262,5	16,1	100	1
PP 40-60%	6	2757	34,2	80,6	64,9	5
Eluido Con-A	14,3	1503	10,8	139	35,3	8,6
Primer int. aniónico (f.37,38,39)	1,5	625	0,55(*)	1136	14,7	70,6
Segundo int. aniónico (f.40,41)	1	95	0,17(*)	558	2,2	34,7

(*) Estimado del perfil de proteínas eluidas de la columna.

No se pudo cuantificar A.enz. ni proteínas del gel nativo.

Como por ensayos anteriores se sabía que los pasos de purificación implicaban una pérdida de actividad, estos se realizaron en el menor tiempo posible (para minimizar la pérdida de actividad debida a la conservación de la enzima). Con el mismo propósito la dialisis realizada durante toda la noche del eluido de Con-A contra el buffer de corrida en Mono Q, se hizo en la presencia de β -mercaptoetanol 10 mM.

El paso con rendimiento mas alto fue el correspondiente a

la precipitación con sulfato de amonio (64,9%).

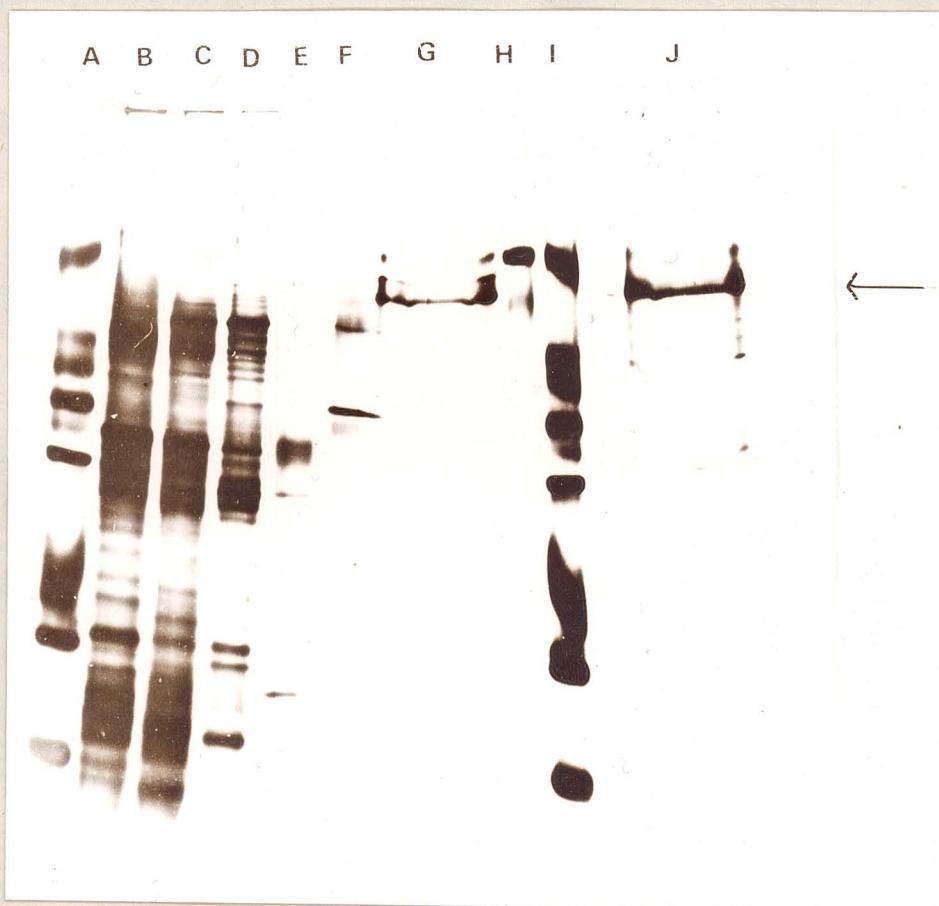
Durante el pasaje por Con-A se conservó un 55% de la A.enz.. En pasajes anteriores por la lectina, usando una menor relación de volumen de Con-A Sepharosa a volumen de precipitado se había recuperado solo el 30% de la A.enz.. Durante el primer pasaje por Mono Q, se perdió un 60% de la A.enz., en concordancia con pasajes anteriores. Sin embargo debe observarse que para este cálculo se usaron solo tres de las once fracciones en que se detectó actividad, esto es, la de mayor actividad específica. Además, este paso se hizo después de un dializado O.N durante el cual se detectó pérdida de A.enz.

Dado que en un ensayo anterior no pudo obtenerse la enzima purificada a homogeneidad luego del paso por el gel nativo, se decidió incluir en el protocolo de purificación una segunda corrida por Mono Q.

Como puede verse en la tabla, teniendo en cuenta las fracciones del eluido de la segunda Mono Q que usaron para correr en gel nativo, solo se recuperó un 15% de la A.enz.; resultando así el rendimiento final del 2,2%. Esta pérdida de A.enz. no fue acompañada en el último paso por la separación de otras proteínas por lo que la purificación final fue de 34,7 veces mientras que en el paso anterior había sido de 70,6 veces. Estos resultados indican que el segundo pasaje por el intercambiador aniónico resultó inapropiado para la purificación de la α -manosidasa.

F- Corrida en SDS-PAGE.

Alicuotas de los pasos de purificación se corrieron en un gel de poliacrilmida desnaturizante. El resultado se muestra en la siguiente fotografía.



- A e I: estándares de PM.
B: SN 100.000 g (30 μ g).
C: pp sulfato de amonio (30 μ g).
D: percolado de Con-A (15 μ g).
E: eluido de Con-A (25 μ g).
F: eluido de la 1^o Mono Q (25 μ g).
Pool de frac. 37, 38 y 39.
G: frac. 41 de la 2^o Mono Q eluida del gel nativo.
H: BSA (2.5 μ g).
J: frac. 40 de la 2^o Mono Q eluida del gel nativo.

En el precipitado con sulfato de amonio (C) puede verse que a pesar del gran número de polipéptidos hay una ligera disminución en su número e intensidad respecto del extracto crudo (B).

Observando los carriles D y E se ve que solo una reducida proporción de las proteínas precipitadas tiene afinidad por la Con-A. En la corrida del percolado de Con-A (D), a pesar de sembrarse menor cantidad de material que en E se observa una cantidad de proteínas apreciablemente mayor. El resultado confirma la utilidad del empleo de esta lectina en el esquema de purificación.

Durante el primer pasaje por Mono Q se produjo un enriquecimiento en polipéptidos de mayor PM, entre los que puede verse en la fotografía (F) la banda correspondiente a la α -manosidasa; este tipo de polipéptidos no se observan en el paso anterior debido a su menor abundancia relativa.

En G y en J se corrieron los eluidos del último paso de purificación. Puede verse aquí que la α -manosidasa no fue purificada a homogeneidad. A pesar de esto, hay una banda que se destaca en intensidad sobre las demás (flecha). Esta aparece más intensa en el eluido de la fracción 40 que en el de la 41 lo cual se corresponde con que el pico de actividad de α -manosidasa en el eluido de la segunda Mono Q se obtuvo sobre aquella fracción. En base a estos resultados es probable que la banda señalada sea la correspondiente a la α -manosidasa. Su PM no puede

calcularse con exactitud ya que los estándares de PM no corrieron de acuerdo a lo esperado. Sin embargo, teniendo en cuenta la corrida de la BSA (H) este es menor que 67.000.

DISCUSION

La ausencia en Trypanosomátidos del mecanismo de transporte de enzimas al lisosoma descripto para vertebrados (6,7) y la postulación de un mecanismo de importación de enzimas al glicosoma basado en señales topológicas llevaron a la idea del estudio de enzimas lisosomales en la búsqueda de un modo de transporte de proteínas análogo al descripto para glicosomas.

De acuerdo a su curva de actividad en función del pH, la α -manosidasa aquí estudiada es una enzima lisosomal. El trabajo con esta enzima se vio inicialmente dificultado por la fuerte pérdida de actividad observada durante su almacenamiento. Es por esto que los primeros ensayos se orientaron a la búsqueda de condiciones apropiadas para su conservación.

De la Tabla I surge que la conservación de la A.enz. no dependería de la concentración de proteínas. Si bien el hecho de tener menor conservación de actividad en diluciones mayores no es concordante con la existencia de una proteasa activa no puede descartarse la posibilidad de que la dilución de algún inhibidor permitiera la actividad de una proteasa. Como el TLCK ejerce una inhibición irreversible sobre la cistein proteasa purificada a partir de *T.cruzi* por Bontempi et al.(17), el resultado no puede deberse a la acción de esta enzima debida a la mayor dilución del TLCK. La menor estabilidad de la α -manosidasa en la dilución 1/30 tampoco resultó causada por la dilución de algún factor

termoestable (Tabla 2).

En cambio, la pérdida de actividad disminuyó apreciablemente cuando se conservó la enzima a 4 °C. Como se ve en la Tabla 3 los pasos de congelamiento y descongelamiento causaban gran parte de pérdida de actividad de la α -manosidasa.

Además del cambio en la temperatura, la conservación de fracciones de la enzima en presencia de 10 mM de β -mercaptoetanol permitió encarar un proceso de purificación sin una gran disminución de la actividad de la α -manosidasa más allá de la producida durante los pasos del esquema seguido.

De su afinidad por la Concanavalina-A se deduce que la α -manosidasa es una glicosidasa de alta manosa. Esta propiedad facilitó la purificación ya que como se ve en la fotografía una gran variedad de proteínas no se pegan a la lectina.

El pH de máxima actividad resultó similar al de otra enzima lisosomal, la cisteína proteasa, aunque en esta se encontraron ligeras variaciones del pH óptimo de acuerdo al sustrato utilizado (16).

La capacidad catalítica de la enzima, luego de dos h. de incubación disminuyó notablemente a pH inferiores a 4; no se apreciaron grandes diferencias en el tratamiento a 0 o a 37 °C a pH superiores a 4.

Para el cálculo del PM se utilizó la técnica de cromatografía de filtración molecular; si bien este no fue coincidente luego de la cromatografía en las dos columnas utilizadas en ambas se detectaron dos picos de actividad enzimática. Eso podría deberse a la existencia de dos formas

de la enzima. Para confirmar esta suposición debería obtenerse suficiente cantidad de enzima de los dos picos como para realizar estudios paralelos con los que buscar diferencias en el grado de glicosilación o en la estructura primaria.

Para la purificación de la α -manosidasa se usó como material de partida un sobrenadante de 100.000 x g del sobrenadante contenía solamente material soluble y en él se detectaba una fuerte actividad de la α -manosidasa en concordancia con lo descripto por J.L Avila et al. en 1979 (9). A pesar de que durante las centrifugaciones que se realizan luego de la ruptura del material (ver Métodos) se produce una purificación de la enzima, se considera como primer paso de esta a la precipitación con sulfato de amonio.

Al observar la tabla de purificación puede verse que la inclusión de un segundo pasaje por intercambiador aniónico no dió los resultados esperados. En cambio la primera cromatografía resultó apropiada ya que, como puede verse en la tabla de purificación en la fotografía posibilitó un importante enriquecimiento de la muestra en la α -manosidasa. Debe notarse que el porcentaje de recuperación obtenido en los pasajes por Mono Q nunca superó el 35%. Esto, sumado al hecho de que se trata de una enzima minoritaria en T.cruzi y que, si bien se mejoraron las condiciones de almacenamiento siguió detectándose pérdida de actividad, contribuyó a que al final del proceso el

rendimiento fuera solo del 2.2%.

Luego del último paso de purificación no pudo establecerse la actividad enzimática presente debido a la escasez de enzima activa; a pesar de esto la banda de α -manosidasa resultó claramente visible luego del revelado por actividad debido a su alta concentración dentro del gel.

BIBLIOGRAFIA

- (1)- Meyer,H. and Souza,W.(1976).Electronmicroscopy study of *Trypanosoma cruzi* periplast in tissue cultures.Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms of the parasite's life cycle.J Protozool.23,385-390.
- (2)- Kipnis,T.L,Sher,A.,Alper,C.A.,David,J.R.,Diaz da Silva,W.(1980).Enzymatic treatment converts trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of the alternative complement pathway.4 Int.Congress Immunology Abstract.N 12.1.06.Paris,France
- (3)- Opperdoes,F.R.and Borst,P.(1977).Localization of nine glycolitic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma Brucei* :the glycosome.Febs Letters .80,2,360-365.
- (4)- Bowman,I.B.and Flynn,I.W.(1976).Biology of the Kinetoplastida.(Lumsden,W.H. and Evans,D.A.;eds).Vol. 1,pp. 435-476.Academic Press.New York.
- (5)- Wieranga,R.K.,Swinkels,B.,Michels,P.A.,Osinga,K.,Misset,O.,Beeumen, J.,Gibson,N.C.,Postma,J.P.M.,Borst,P.,Opperdoes,F.R., and Hol,W.G.J.(1987).Embo J.6,215-221.
- (6)- Neufeld,E.F. and Ashwell,G.(1980).The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans.(Lennarz,W.J.,ed).pp 252-257.Plenum Press,New York.
- (7)- Creek,K.E. and Sly,W.S.(1984).Lysosomes in pathology and

biology.(Dingle,J.T.,Dean,R.T.and Sly eds)pp 63-88,Elsevier/North Holland,New York.

(8)- Golberg,D.,Gabel,C. and Kornfeld,S.(1984).Lysosomes in pathology and biology.(Dingle,J.T.,Dean,R.T.and Sly eds)pp 45-62 Elsevier/North Holland,New York.

(9)- Avila,J.L.,Casanova,M.A.,Avila,A. and Bretaña,A.(1979).Acid and neutral hydrolases in *Trypanosoma cruzi*.Characterization and assay.J.Protazool.26 (2),pp. 304-311.

(10)- Cazzulo,J.J.,Franke de Cazzulo,B.M.,Engel,J.C. and Cannata,J.J.B. 1985).End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in Trypanosomatids.Mol.Biochem.parasitol.16,329-343.

(11)- Lowry,O.H.,Rosebrough,N.J.,Farr,A.L and Randall,R.J.(1951).J.Biol.Chem.193,265-275.

(12)- Bradford,M.M.(1976).Anal.Biochem.72,248-254.

(13)- Ornstein,L.(1964).Ann.N.Y.Acad.Sci.121,321-324.

(14)- Davis,B.J.(1964).Ann.N.Y.Acad.Sci.121,104-132.

(15)- Laemmli,U.K.(1970).Nature 227,680-685.

(16)- Oakley,L.R.,Kirsh,D.R. and Morris,R.(1980).A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in poliacrylamide gels.105,361-363.

(17)- Bontempi,E.,Franke de Cazzulo,B.M.,Ruiz,A.M.and Cazzulo,J.J.

(1984). Purification and properties of an acidic protease from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol. 77B, 559-604.