

Tesis de Licenciatura

Biosíntesis de porfirinas en *Trypanosoma cruzi*

Zallocchi, Marisa Laura

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en
Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Zallocchi, Marisa Laura. (). Biosíntesis de porfirinas en *Trypanosoma cruzi*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000681_Zallocchi

Cita tipo Chicago:

Zallocchi, Marisa Laura. "Biosíntesis de porfirinas en *Trypanosoma cruzi*". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires..
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000681_Zallocchi

EXACTAS

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

TESIS DE LICENCIATURA

"BIOSÍNTESIS DE PORFIRINAS EN
Trypanosoma cruzi"

Autor: MARISA LAURA ZALLOCCHI

Director: Dra. MARÍA ELISA LOMBARDO

Codirector: Dra. LIDIA SUSANA ARAUJO

Lugar de trabajo: Centro de investigaciones so-
bre porfirinas y porfirias
(CIPyP-CONICET).

Fecha de presentación: Noviembre de 1998

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y
NATURALES.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EPE u n BIBLIOTECA

Nº 06814

A Elisa y Lidia por haber sido mis guías y amigas.

ÍNDICE.

1- RESUMEN	1
2- INTRODUCCIÓN	3
3- MATERIALES Y MÉTODOS	27
4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
5- CONCLUSIONES	56
6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1- RESUMEN.

El *Trypanosoma cruzi* es un protozoario flagelado que necesita se le suministren compuestos hémicos como factores de crecimiento para su reproducción *in vitro*. Estos requerimientos nutricionales están asociados con su incapacidad para biosintetizar hemo. En estos hemoflagelados se ha encontrado que la hemina puede ser sustituida por Protoporfirina IX, último intermediario en la ruta biosintética del hemo, evidenciando la presencia de una ferroquelatasa activa. Por otro lado, ni el ALA ni el PBG, precursores de todas las porfirinas, pueden sustituir a este factor de crecimiento, sugiriendo la pérdida de actividad de una o más enzimas intermedias.

Estudios anteriores realizados sobre las distintas enzimas involucradas en la síntesis de hemo mostraron que 1) Existen niveles variables y bajos de ALA y PBG que dependen del medio de cultivo empleado para el crecimiento del parásito; 2) Existe una alta actividad de Succinil-CoA Sintetasa, enzima que provee uno de los sustratos para la formación de ALA; 3) Existe una actividad muy baja de ALA-S y DOVA-T, las dos enzimas que pueden sintetizar ALA; 4) Existe una baja actividad de ALA-D; 5) No se detecta actividad de PBGasa y Deaminasa y 6) Existe una ferroquelatasa funcional. En consecuencia, a partir de estos resultados, se podría sugerir que el *Trypanosoma cruzi* sólo conserva funcional una o las dos enzimas que sintetizan ALA (ALA-S y DOVA-T) y a la Ferroquelatasa (siendo todas estas enzimas mitocondriales).

Este trabajo tuvo como objetivo dilucidar la o las enzimas, pertenecientes a la ruta metabólica del hemo, que se encuentran en baja cantidad o ausentes, en *T. cruzi*. Los primeros ensayos fueron realizados con el fin de dilucidar si el parásito acumula precursores y/o metabolitos intermedios, para poder establecer la existencia de un posible bloqueo en esta ruta biosintética. Se encontró que si bien el parásito no acumula precursores ni porfirinas en forma intracelular, excreta al medio de cultivo gran cantidad de ALA y PBG. Cuando se midieron las actividades enzimáticas se encontró sólo actividad de Succinil-CoA Sintetasa y de DOVA-T. Esta última enzima, mostró mayor afinidad por el glutamato, como dador de grupos aminos, que por la alanina, el otro aminoáci-

do testeado. En cuanto al DOVA, su otro sustrato, se obtuvo una muy baja afinidad, por lo que se supone que la enzima puede estar inhibida o que la reacción de síntesis de ALA se esté llevando a cabo por alguna transaminasa inespecífica.

En el extracto libre de células de *T.cruzi*, se detectó la presencia de un inhibidor de la actividad ALA-S de otras fuentes enzimáticas (*Rhodobacter sphaeroides*). El inhibidor es un compuesto inestable al calor, de bajo peso molecular (distinto del ALA o el hemo), no relacionado con el mecanismo de regulación cistationasa-rodenasa y que se encuentra presente inicialmente en el homogenato. La inhibición se detectó en presencia de concentraciones saturantes de los sustratos, por lo que se descarta que se trate de una inhibición de tipo competitiva.

2- INTRODUCCIÓN.

	Página
2.1- Camino biosintético de las porfirinas	4
2.2- Biosíntesis de δ-aminolevúlico	8
2.2.1- Rutas biosintéticas	8
2.3- Fuente experimental empleada: <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
2.3.1- Clasificación	19
2.3.2- Ciclo de vida	21
2.3.3- Formas desarrolladas	23
2.3.4- Características celulares diferenciales	23
2.4- Biosíntesis del hemo en la familia Trypanosomatidae	25

A continuación realizaremos una breve descripción del camino biosintético de las porfirinas en general, enfocando luego nuestra atención específicamente a la formación del ácido δ -aminolevúlico (ALA). Finalmente completaremos con una descripción del *Trypanosoma cruzi* y un resumen de la poca información que se posee respecto al metabolismo del hemo en este parásito.

La enfermedad de Chagas es actualmente reconocida como una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en América del Sur y Central. Debe su nombre al Dr. Carlos Chagas (Instituto Nacional de Chagas "Dr. Mario Fatala Chabén, 1994) quien descubrió al microorganismo que la origina, el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*; los insectos vectores; identificó uno de los huéspedes reservorios y describió ya en el año 1911 la sintomatología correspondiente (Mundim y Roitman, 1977; Salzman y col., 1982).

El parásito es incapaz de reproducirse *in vitro* si no se le suministran compuesto hémicos como factores de crecimiento, convirtiéndolo en un blanco importante para nuestra área específica de investigación que es la biosíntesis de porfirinas.

Teniendo en cuenta que la relevancia de esta enfermedad se debe al gran número de personas y animales domésticos infectados en todo el mundo, a la frecuente carencia de una adecuada quimioterapia no tóxica y al desarrollo de la resistencia del parásito a las drogas; el objetivo global de este trabajo será dilucidar qué características presenta el agente causal de la enfermedad de Chagas, en el camino biosintético de las porfirinas, que lo hacen incapaz de sintetizar estos compuestos. La elucidación de la funcionalidad o defecto de esta vía metabólica, podría ser trascendente en el desarrollo de nuevos agentes tripanomicidas que, selectivamente, bloquearan la formación o utilización de compuestos hémicos por el parásito.

2.1 - Camino biosintético de las porfirinas.

Los tetrapirroles son compuestos ampliamente distribuidos entre los seres vivos, desempeñan un rol vital en el metabolismo celular porque constituyen, en la mayoría de las células vivientes, los dos principales pigmentos del protoplasma involucrados en los procesos fundamentales de respiración (cito-cromos) y fotosíntesis (clorofilas). Otros compuestos tetrapirróticos son los pigmentos biliares, grupos prostéticos, vitamina B₁₂ y ficobilinas.

Los distintos tetrapirroles se sintetizan siguiendo la secuencia de reacciones catalizadas enzimáticamente, que se muestran en la Figura 1 (Batlle, 1997).

Se ha comprobado que la misma ruta biosintética opera en todas las formas vivientes; es decir, todas las células aeróbicas de animales, plantas y bacterias son capaces de sintetizar sus tetrapirroles a través de un camino cuyas etapas, hasta la formación de Protoporfirina IX (Proto IX), son coincidentes; luego, dependiendo de cual fuere el producto final, se producen ramificaciones específicas.

La secuencia en la biosíntesis de porfirinas es la siguiente:

- 1) Formación de **ácido δ-aminolevulínico (ALA)**, que puede sintetizarse a partir de la condensación de glicina con succinil-Coenzima A (succinato activado por una unión de alta energía con la Coenzima A), o bien desde precursores de cinco átomos de carbono tales como glutamato, glutamina y α -acetoglutarato
- 2) Unión de dos moléculas de ALA por la enzima ALA-deshidrasa (ALA-D), para formar **porfobilinógeno (PBG)**.
- 3) La formación del primer tetrapirrol o porfirina, se lleva a cabo por la condensación de cuatro moléculas de PBG dando una molécula de **uroporfirinógeno (UROGEN)**, pudiéndose obtener los isómeros I y III, según la posición relativa de las cadenas laterales. Aunque esta condensación puede llevarse a cabo por simple calentamiento en medio ácido, en los tejidos es catalizada por enzimas específicas. La reacción para la obtención de **uroporfirinógeno III (UROGEN III)** a partir de PBG, es catalizada por la PBG-deaminasa y por la uroporfirinógeno III isomerasa. Ambas enzimas forman un complejo enzimático citoplasmático al que se lo denomina PBGasa.
- 4) El UROGEN III es convertido a **coproporfirinógeno III (COPROGEN III)** mediante decarboxilación sucesiva de los cuatro restos acetato del UROGEN III. Esta reacción es catalizada por la uroporfirinógeno descarboxilasa (URO-D).

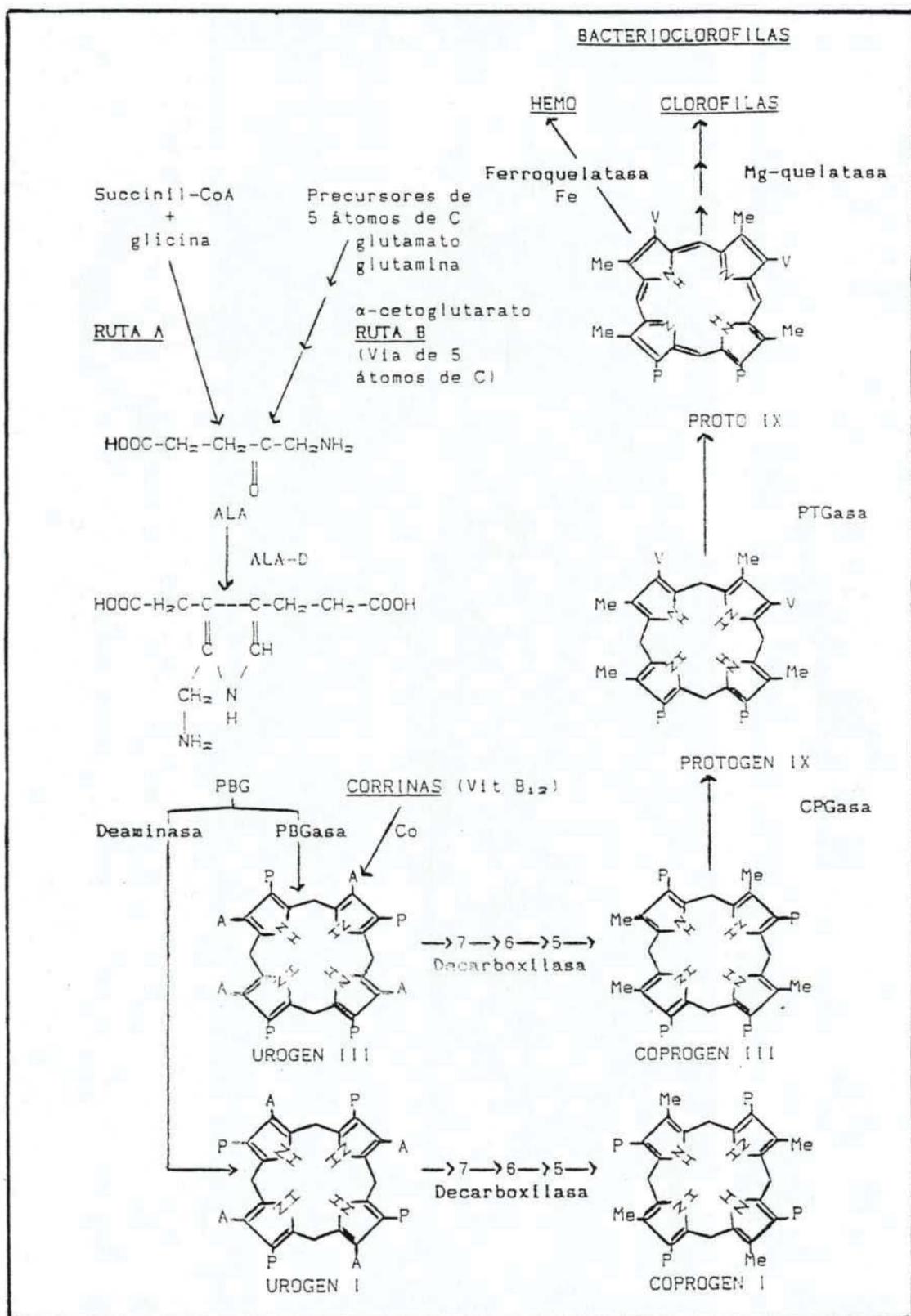


FIGURA 1: Diagrama del camino biosintético de las porfirinas. A= acetilo, Me= metilo, P= propionato, V= vinilo.

5) El COPROGEN III sufre decarboxilación oxidativa, por acción de la coproporfirinógeno oxidasa o coprogenasa, dando **protoporfirinógeno IX (PROTOGEN IX)**.

6) El PROTOGEN IX, es oxidado a **protoporfirina IX (Proto IX)** por la protoporfirinógeno oxidasa (progen oxidasa).

7) El paso final en la síntesis del hemo, comprende la incorporación de hierro ferroso (reducido) a la protoporfirina mediante una reacción catalizada por la hemo sintetasa o ferroquelatasa.

En cuanto a la localización celular, la primera y tres últimas transformaciones ocurren en la mitocondria, el resto de las reacciones ocurren en citoplasma.

Se ha comprobado que en toda la secuencia de reacciones, los verdaderos intermediarios son los porfirinógenos, los cuales se oxidan fácilmente a porfirinas. La PROTO IX y las porfirinas en general, se combinan con distintos iones metálicos (hierro, magnesio, zinc, níquel, cobalto y cobre) para formar quelatos tetradentados que dan origen a una gran gama de derivados de las porfirinas. Los complejos de los tetrapirroles con el hierro reducido se denominan **hemos** o **hierroporfirinas**. El más conocido es el protohemo o **hierro-protoporfirina**, que constituye el grupo prostético de la hemoglobina. Complejos similares, con el hierro en estado oxidado, dan lugar a la hemina, hematina o ferriprotoporfirina. Los quelatos de magnesio o **magnesio-porfirinas**, van a dar origen a las clorofilas. A partir del UROGEN III y con cobalto como ion metálico, se biosintetizan las **corrinas**, que participan en la síntesis de la vitamina B₁₂. Es importante aclarar que los grupos cromóforos de las ficobilinas son, también, tetrapirroles pero de cadena abierta que poseen una estructura similar a los pigmentos biliares provenientes de la degradación hepática del hemo.

Con respecto a las propiedades físicas y químicas, las porfirinas, debido a su estructura relativamente grande, planar y aromática, se caracterizan por ser predominantemente hidrofóbicas, tener alta capacidad de resonancia, intensa fluorescencia roja bajo luz ultravioleta y un espectro de absorción característico en la zona del visible y del ultravioleta.

2.2- Biosíntesis de ácido δ -aminolevínico.

2.2.1- Rutas biosintéticas.

El ALA es el primer precursor específico en la biosíntesis de todos los tetrapirroles. Estudios de marcación isotópica demostraron que los átomos de carbono y nitrógeno presentes en el hemo (Shemin y Russell, 1953), anillo corrínico de la vitamina B₁₂ (Shemin y Bray, 1964), porción tetrapirrólica de la clorofila (Granick, 1954; Manetas y Akoyunoglu, 1975) y grupos cromóforos de las ficolobilinas (Troxler y Lester, 1967), provienen del ALA. En estos mismos trabajos, también se verifica la relación molar estequiométrica de 8:1, existente entre el ALA y el tetrapirrol correspondiente.

Según el esquema de la Figura 1, el ALA puede sintetizarse por dos vías diferentes, ambas catalizadas enzimáticamente, partiendo en un caso de glicina y succinil Coenzima A (SuccCoA) (**Ruta A**), y en el otro, de precursores de cinco átomos de carbono, como pueden ser el glutamato, glutamina y α -cetoglutarato; (**Ruta B**). A continuación se describirá en forma detallada cada una de estas rutas.

Ruta A: A partir de glicina y succinil-Coenzima A.

El ALA se obtiene por condensación de una molécula de glicina con una molécula de succinil-Coenzima A, esta reacción es catalizada por una enzima clave en la biosíntesis de tetrapirroles, llamada **δ -aminolevúlico sintetasa (ALA-S)**, la cual requiere fosfato de piridoxal como cofactor (Figura 2).

Se ha encontrado actividad de ALA-S en bacterias fotosintéticas, levaduras, insectos, algas y diversas fuentes de origen animal (Lascelles, 1964; Marks, 1966; De Matteis, 1967, Lombardo y col., 1988).

Si bien en casi todos los tejidos estudiados el ALA-S se encuentra asociada a la fracción particulada, también se midió actividad de esta enzima en la fracción soluble. La enzima citosólica correspondería a una forma inmadura de la proteína en tránsito hacia la matriz mitocondrial (Nakakuki y col., 1980; Yamuchi y col., 1980; Srivastava y col., 1983).

El ALA-S se caracteriza, además, por ser una proteína inestable y de corta vida media (Marver y col., 1966; Sassa y Granick, 1970; Woods, 1974). La vida media del ALA-S citosólica es menor aún que la de la enzima

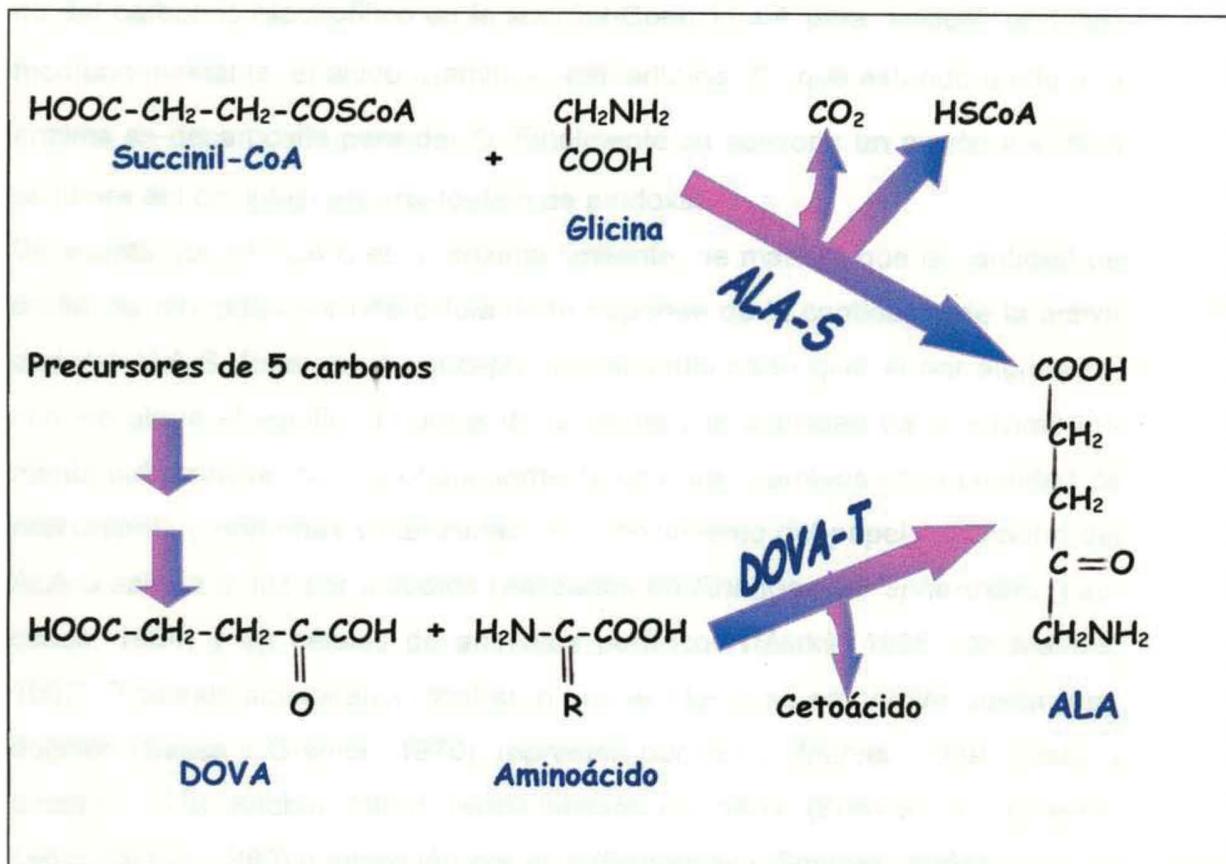


FIGURA 2: Biosíntesis de ALA. Se esquematizan las dos vías de síntesis, catalizadas por el ALA-S y DOVA-T, respectivamente. Ambas reacciones utilizan fosfato de piridoxal como cofactor.

mitocondrial (Hayashi y col., 1969). Esta característica es importante pues posibilita la regulación del ALA-S por inducción o represión de su síntesis. La enzima purificada requiere de la presencia de compuestos sulfhidrílicos para manifestar su actividad y es altamente específica para sus sustratos.

La ubicación mitocondrial del ALA-S le permitiría situarse, no sólo cerca de la fuente de sus sustratos, sino también de las últimas etapas del camino biosintético del hemo, lo cual es importante desde el punto de vista de su regulación por producto final.

En la Figura 3 se encuentra descripto el mecanismo de la reacción, propuesto por Zaman y col., 1973. En primer lugar la glicina reacciona con el fosfato de piridoxal, que se encuentra formando parte de la enzima, para originar

una base de Schiff (**A**). Luego se produce la pérdida de un protón de la glicina, originándose un carbanión estable (**B**), que reacciona con un átomo de carbono del carbonilo electrofílico de la succinil-Coenzima A para producir un intermediario inestable, el ácido α -amino- β -cetoadípico (**C**), que estando unido a la enzima se decarboxila para dar **D**. Finalmente se adiciona un protón y el ALA se libera del complejo enzima-fosfato de piridoxal.

Se acepta que el ALA-S es la enzima limitante, de manera que la cantidad de porfirinas formadas por una célula dada depende de la cantidad y de la actividad del ALA-S. Este es un concepto fundamental dado que, si por alguna razón, se altera el equilibrio normal de la célula y la actividad de la enzima aumenta o disminuye, correspondientemente ocurrirán cambios en la cantidad de precursores y porfirinas sintetizadas. El conocimiento del papel regulatorio del ALA-S salió a la luz por estudios realizados en *Rhodobacter sphaeroides* (Lascelles, 1964) y en células de animales porfíricos (Marks, 1966; De Matteis, 1967). Trabajos adicionales mostraron que el ALA-S se encuentra sujeta a inducción (Sassa y Granick, 1970), represión por hemo (Marver, 1969; Sassa y Granick, 1970; Kitchin, 1983), retroinhibición por hemo (Bumham y Lascelles, 1963; Kitchin, 1983) e inhibición por ALA (Bottomley y Smithee, 1968).

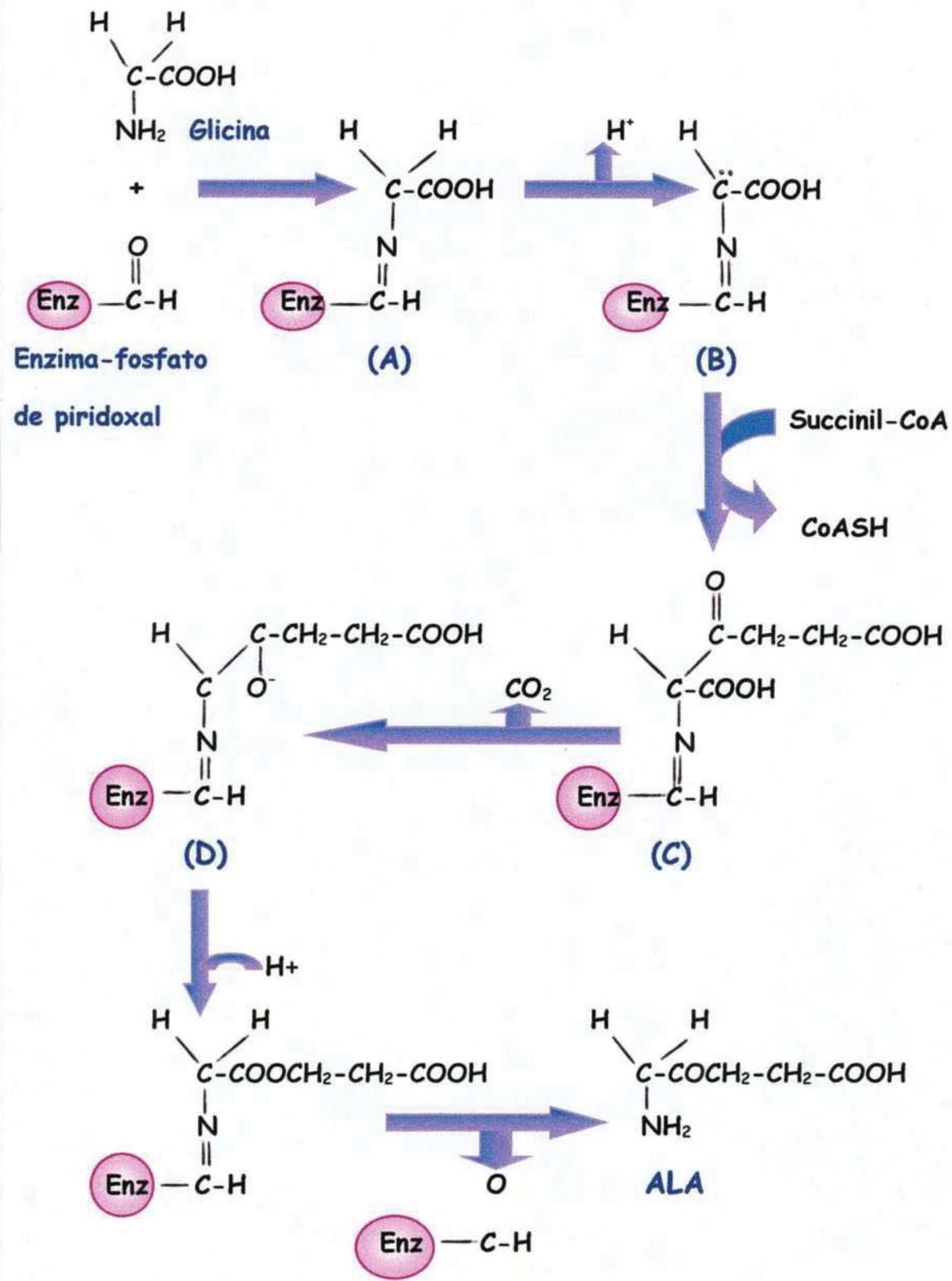


Figura 3: Mecanismo propuesto para la formación de ALA por la vía del ALA-S.

Como ya dijimos el control de la actividad del ALA-S ocurre a distintos niveles, los cuales se enumeran más detalladamente a continuación:

- 1) **Control por glicina** (Figura 4): El ALA-S muestra una afinidad muy baja por la glicina, con valores de K_m que van de 5 a 20mM. Sabiendo que la concentración intracelular de este aminoácido es significativamente menor (del orden de 1 mM) (Neuberger, 1980), se postula la posibilidad de que la concentración de este sustrato constituya un factor limitante para la actividad de la enzima.
- 2) **Inhibición por ALA** (Figura 4): Tanto para el ALA-S proveniente de *Rhodobacter sphaeroides* (Lascelles, 1960) como para la proveniente de mitocondrias de médula ósea de conejo (Bottomley y Smithee, 1968), se observó inhibición por ALA. En este último caso se encontró una inhibición del 20% para una concentración de ALA de 0,025mM, mientras que con concentraciones mayores a 0,20mM se obtuvo inhibición total de la actividad enzimática.
- 3) **Represión por hemo** (Figura 4): Existe un pool de hemo (hemo libre regulador) intracelular que al aumentar sus niveles citoplasmáticos, regula la expresión genética o la síntesis *de novo* del ALA-S. El hemo como represor puede actuar a nivel de transcripción (Srivastava y col., 1988), traducción (Yamamoto y col., 1983) y translocación de la enzima desde el citosol hacia la mitocondria (Hayashi y col., 1983; Srivastava y col., 1983). Las concentraciones de hemo necesarias para reprimir la síntesis de ALA son del orden de 10^{-7} M (Wolfson y col., 1979).
- 4) **Inhibición por hemo** (Figura 4): Las concentraciones de hemo que se necesitan para producir inhibición de la actividad enzimática, son del orden de 10^{-5} M (Wolfson y col., 1979).

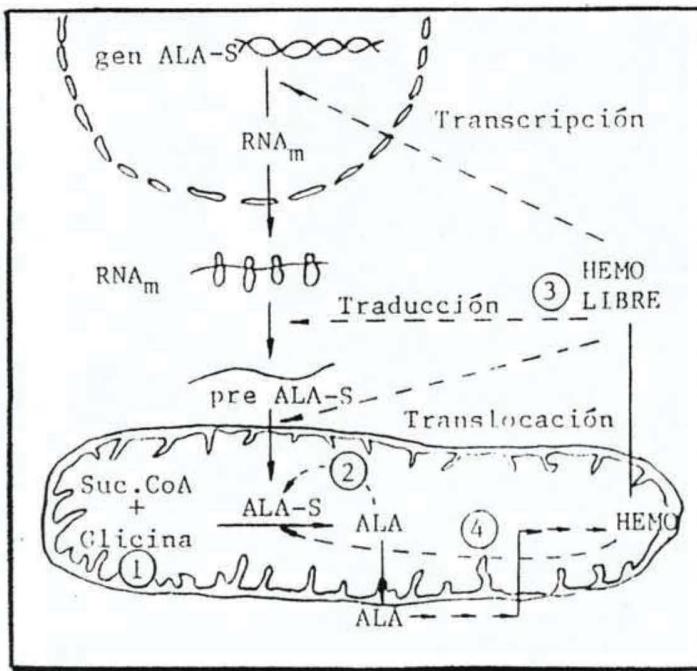


FIGURA 4: Mecanismos de control que actúan sobre el ALA-S. 1) Control por glicina, 2) Inhibición por ALA, 3) Represión por hemo, 4) Inhibición por hemo.

5) Inducción por compuestos de diversas estructuras, incluyendo insecticidas, carcinógenos, drogas porfirinogénicas y medicamentos: La mayor parte de estas sustancias son metabolizadas por un sistema en el hígado que utiliza una hemoproteína específica, el citocromo P-450. Durante el proceso de metabolización de estas sustancias, el consumo de hemo por el citocromo P-450 está aumentado, lo cual a su vez disminuye la concentración del hemo intracelular. En consecuencia se produce una desrepresión del ALA-S con un aumento correspondiente de la velocidad de síntesis del hemo para cubrir las necesidades de la célula. Otros compuestos no actúan aumentando la utilización del hemo libre, sino aumentando su degradación, lo que lleva, en definitiva, a una disminución del hemo citosólico y a un aumento en la actividad del ALA-S (Batlle y col., 1981; Marks y col., 1988).

6) Activación por trisulfocistina: Mecanismo de control hallado en *Rhodobacter sphaeroides* (Yamanishi y col., 1983). La trisulfocistina es un metabolito de bajo peso molecular que puede actuar directamente con la enzima, produciendo la conversión de una forma prácticamente inactiva (forma b) en

otra de alta actividad (forma a). Este activador se sintetiza y degrada *in vivo* por acción de la cistationasa y rodenasa, respectivamente (Figura 5). Se han encontrado evidencias de la existencia de este sistema de regulación en callos de soya (Vázquez y col., 1980) y en *Rhodopseudomonas palustris* (Viale y col., 1980).

7) **Modulación en la estabilidad del mRNA de ALA-S:** Un aumento en la concentración de hemo libre o, en forma indirecta, de metaloporfirinas, produce una disminución en la estabilidad del mRNA del ALA-S (Cable y col., 1994; Cable y col., 1996).

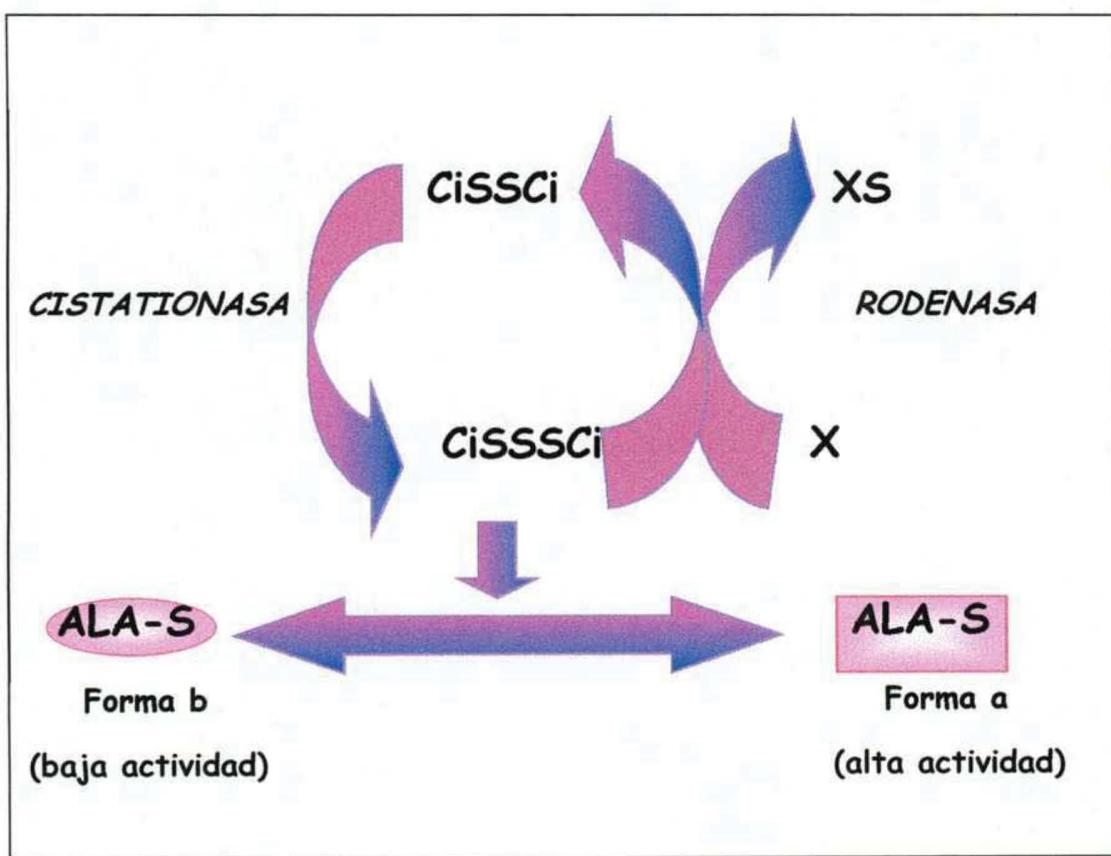


FIGURA 5: Activación por trisulfocistina. Esquema postulado para el control del ALA-S en *Rb.sphaeroides*. X: anión tiofílico. CiSSCi: cistina. CiSSSCi: trisulfocistina.

8) Control por constituyentes del medio ambiente y celular (Figura 6):

- La tensión de oxígeno y el estado de óxido-reducción de la célula influyen sobre las distintas etapas del camino biosintético de las porfirinas. El oxígeno estaría actuando indirectamente sobre el ALA-S, modificando la formación de producto final (hemo) y por lo tanto, la regulación que el mismo ejerce sobre esta enzima (Batlle y col., 1981). Estudios efectuados en bacterias fotosintéticas, demostraron que en estos organismos la acción inhibitoria del oxígeno podría deberse tanto a una disminución del contenido celular de trisulfocistinas como a la estimulación de un compuesto con propiedades inhibitorias.
- Trabajando con bacterias fotosintéticas, se observó que una elevada intensidad lumínica, tenía efectos inhibitorios sobre el ALA-S (Batlle y col., 1981).
- Existen evidencias que avalan dos comportamientos diferentes para el ATP en la regulación del ALA-S. En *Rb.sphaeroides*, el ATP induciría la formación de un inhibidor que llevaría a la inactivación de la enzima mitocondrial, mientras que en hígado de rata, el ATP se uniría a un sitio alostérico del ALA-S citoplasmática, produciendo un aumento de su actividad (Batlle y col., 1981).

Resumiendo, en bacterias fotosintéticas, los resultados experimentales concuerdan en postular que el efecto inhibitorio producido por altos niveles de oxígeno, iluminación y ATP, se debería a la estimulación de la síntesis de un inhibidor.

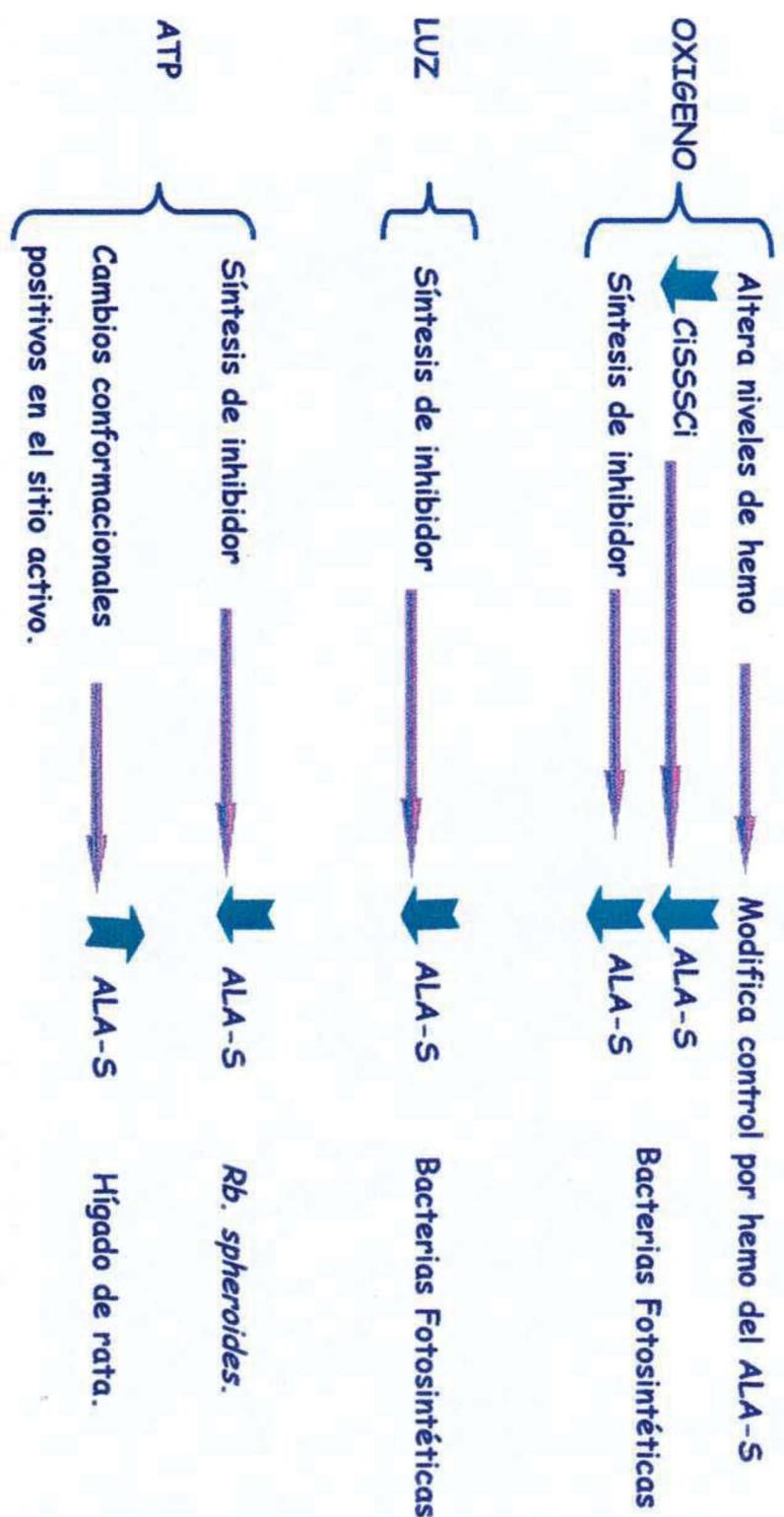


FIGURA 6: Control de la actividad de ALA-S por el medio ambiente o celular. Niveles altos de oxígeno, luz y ATP, producen una disminución de la actividad enzimática en bacterias fotosintéticas; mientras que un aumento en los niveles de ATP en ratas, produce un aumento de la actividad del ALA-S hepática.

Ruta B: A partir de precursores de cinco átomos de carbono: glutamato, glutamina o α -cetoglutarato.

Teniendo en cuenta las dificultades encontradas para detectar actividad de ALA-S en plantas superiores y algas, y sabiendo que el ALA es necesario para la síntesis de porfirinas en estos organismos, varios investigadores trataron de hallar vías alternativas para la formación de ALA. Las únicas fuentes de origen vegetal en las que se midió actividad de ALA-S fueron: callos de soya (Wider de Xifra y col., 1971) y cáscaras blancas de papa (Ramaswamy y Nair, 1973), ambos sistemas incapaces de sintetizar clorofila.

Beale y Castelfranco, trabajaron con cotiledones de pepinos enverdecidos (Beale y Castelfranco, 1973) y con hojas enverdecidas de cebada y poroto (Beale y Castelfranco, 1974). Midieron radioactividad en el ALA formado cuando se incubaba en presencia de glutamato, glutamina o α -cetoglutarato, como precursores radioactivos, y observaron que los compuestos de cinco átomos de carbono se incorporaban en el ALA sin que se produjera ruptura del esqueleto carbonado. Esta incorporación era más eficiente que la obtenida a partir de succinato y glicina, en los mismos organismos. Sobre la base de estos resultados, se postuló la existencia, en plantas superiores, de una ruta alternativa de síntesis de ALA que emplea como sustratos compuestos de cinco átomos de carbono; además de la conocida ALA-S, que no sería la enzima predominante.

Desde entonces, distintos grupos intentaron establecer la secuencia de reacciones que permitiesen el pasaje de estos precursores a ALA, manteniendo intacto el esqueleto carbonado. Varias posibles rutas, desde el punto de vista de síntesis orgánica, fueron analizadas (Beale y Castelfranco, 1974).

Considerando una serie de trabajos anteriores, en los que se demostraba la conversión de ácido τ , δ -dioxovalérico (DOVA) en ALA, tanto para fuentes de origen animal (Nemeth y col., 1958; Neuberger y Turner, 1963), como para bacterias fotosintéticas (Gibson y col., 1961; Neuberger y Turner, 1963) y algas (Gassman y col., 1968), surgió el DOVA como el intermediario más probable, a partir del glutamato.

Posteriormente, se confirmó la presencia de una transaminasa (Figura 2), la τ , δ -dioxovalerato transaminasa (DOVA-T), capaz de producir ALA, utilizando DOVA y un aminoácido, como sustratos, en algas (Kipe-Nolt y Stevens Jr., 1980; Foley y Beale, 1982; Lombardo y col., 1989); levaduras (Hoare y Datta, 1990), bacterias (Bajkowski y Friedman, 1982) y mitocondrias de hígado de vaca (Varticovski y col., 1980). En plantas superiores se logró la purificación parcial de dos enzimas que catalizan la conversión de α -cetoglutarato a DOVA y de DOVA a ALA, respectivamente (Lohr y Friedman, 1976). Estudios más recientes han demostrado la presencia, en protozoarios hemoflagelados, de una enzima inmunológicamente diferente a la encontrada en mamíferos pero capaz de catalizar la misma reacción (Sagar y col., 1995).

En cuanto a las propiedades de la DOVA-T, se sabe que requiere fosfato de piridoxal como cofactor, éste forma una base de Schiff con un ϵ -amino de una lisina de la enzima; la unión es estable y sólo puede ser desplazada por un grupo amino de algún aminoácido libre. Puede sufrir inhibición por hematoxilina o metilglioxalato (Sagar y col., 1995). La reacción catalizada por esta enzima, difiere, en general, de la mayoría de las reacciones de transaminación en cuanto a su irreversibilidad. Hay quienes afirman que la reacción no tiene ningún significado fisiológico, ya que consideran que cualquier transaminasa, si bien con distinta afinidad, puede utilizar el DOVA como sustrato y convertirlo en ALA (Noguchi y Mori, 1981; Brumm y col., 1982). Trabajos posteriores habrían demostrado la existencia de una enzima específica para la conversión del DOVA en ALA (Kah y col., 1988; Lombardo y col., 1996).

Aún se desconoce la vía por la cual podría producirse DOVA *in vivo*, ya sea a partir de glutamato, glutamina o α -cetoglutarato. En todos los casos hasta ahora medidos, los niveles endógenos de DOVA son despreciables.

En un principio se pensó que la vía del ALA-S existía únicamente en tejidos animales y bacterias, mientras que la ruta de la DOVA-T operaría exclusivamente en plantas y algas. En la actualidad se sabe que tal afirmación, bajo ningún punto de vista, es valedera; y más aún, la existencia de una vía no excluye la presencia de la otra. Una mutante del alga *Scenedesmus obliquus*

(Klein y Senger, 1978), la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides* (Kikuchi y col., 1958; Gibson y col., 1961) y el alga *Euglena gracilis* (Lombardo y col., 1988) constituyen ejemplos de organismos en los que coexisten ambas vías de síntesis de ALA.

2.3- Fuente experimental empleada: *Trypanosoma cruzi*.

2.3.1- Clasificación.

La familia Trypanosomatidae, pertenece al orden Kinetoplástida y está compuesta por protozoarios flagelados que se caracterizan por la presencia en la base del flagelo, de una organela denominada cinetoplasto. Esta organela contiene una red de cadenas de DNA unidas entre sí (Vickerman y Preston, 1976; Camargo, 1979; Levine y col., 1980). Estructuras membranosas tubulares, asociadas con el cinetoplasto, forman una gran mitocondria en estos organismos.

Dependiendo de la presencia o ausencia del flagelo y del sitio a partir del cual se origina, de la membrana ondulante y de la posición del cinetoplasto relativa al núcleo, se caracterizaron las formas promastigotes, opimastigotes, epimastigotes, tripomastigotes, coanomastigotes, amastigotes, paramastigotes y esferomastigotes ; en los tripanosomátidos. (Vickerman y Preston, 1976; Camargo, 1979; De Souza, 1983). Ver Figura 7.

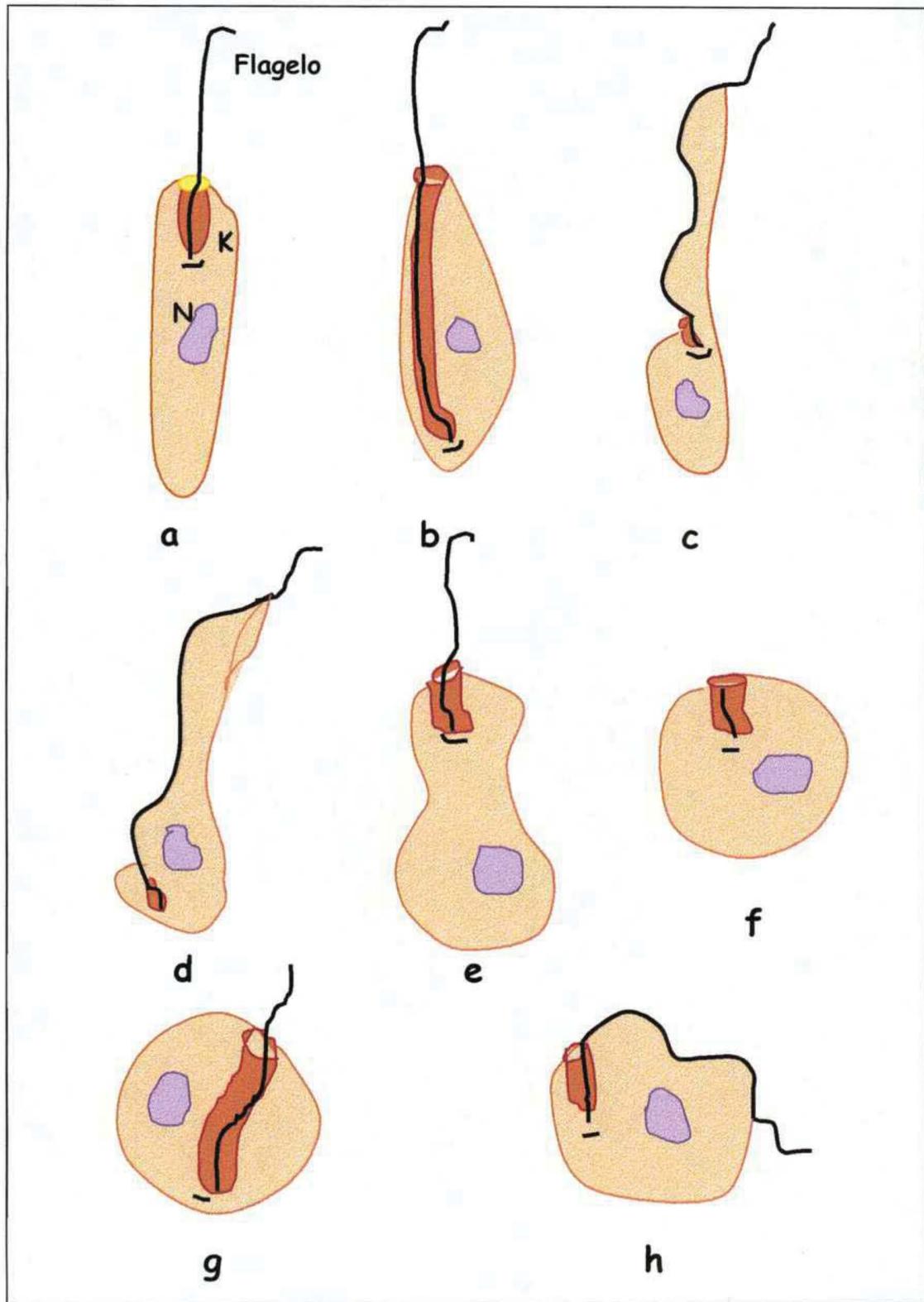


FIGURA 7: Diagrama de los tipos morfológicos de Trypanosomatidae (x 1300). (a) Promastigote, (b) Opistomastigote, (c) Epimastigote, (d) Tripomastigote, (e) Coanomastigote, (f) Amastigote, (g) Paramastigote, (h) Esferomastigote. K: cinetoplasto, N: núcleo.

2.3.2.-Ciclo de vida.

El *Trypanosoma cruzi* tiene un ciclo biológico complejo, caracterizado por una sucesión de diferentes formas adaptadas a los diferentes ambientes que éste encuentra tanto en el hospedador mamífero como en el vector *Triatoma infestans*. Este ciclo involucra transiciones entre los estadios de diferenciación y de proliferación ([Figura 8](#)) (Vanhamme y Pays, 1995); se inicia cuando los hospedadores invertebrados (insectos hematófagos pertenecientes a las familias Hemíptera y Rduvidae) se alimentan mediante la ingesta de sangre de mamíferos infectados.

Las formas sanguíneas ingeridas, evolucionan a través del tracto digestivo. En la luz del mesogastro del insecto, la mayoría de los tripomastigotes de la sangre se transforman en epimastigotes (forma replicativa). En el intestino, los epimastigotes se dividen repetidamente mediante fisión binaria y pueden adherirse a las células intestinales a partir de hemidesmosomas (Zeledon y col., 1977). En el recto, una parte de los epimastigotes se transforma en tripomastigote metacíclico (forma infectante no replicativa) que se eliminan por las heces (Brack, 1968; Brener, 1973; Brener y Alvarenga, 1976; Zeledon y col., 1977).

A través de lesiones en la piel o de las membranas mucosas normales, estas formas metacíclicas, penetran en las células sanguíneas de los vertebrados donde se transforman en amastigotes (forma en activa división). Mediante fisión binaria los amastigotes se multiplican y diferencian en tripomastigotes sanguíneos (forma no replicativa). Estas formas flageladas, recientemente formadas, son liberadas de la célula parasitada al espacio intercelular; pueden alcanzar la corriente sanguínea y, luego de circular por un cierto período de tiempo, pueden penetrar en otras células del hospedador para llevar a cabo un nuevo ciclo tisular o pueden quedar libres para ser ingeridas por otro insecto hematófago.

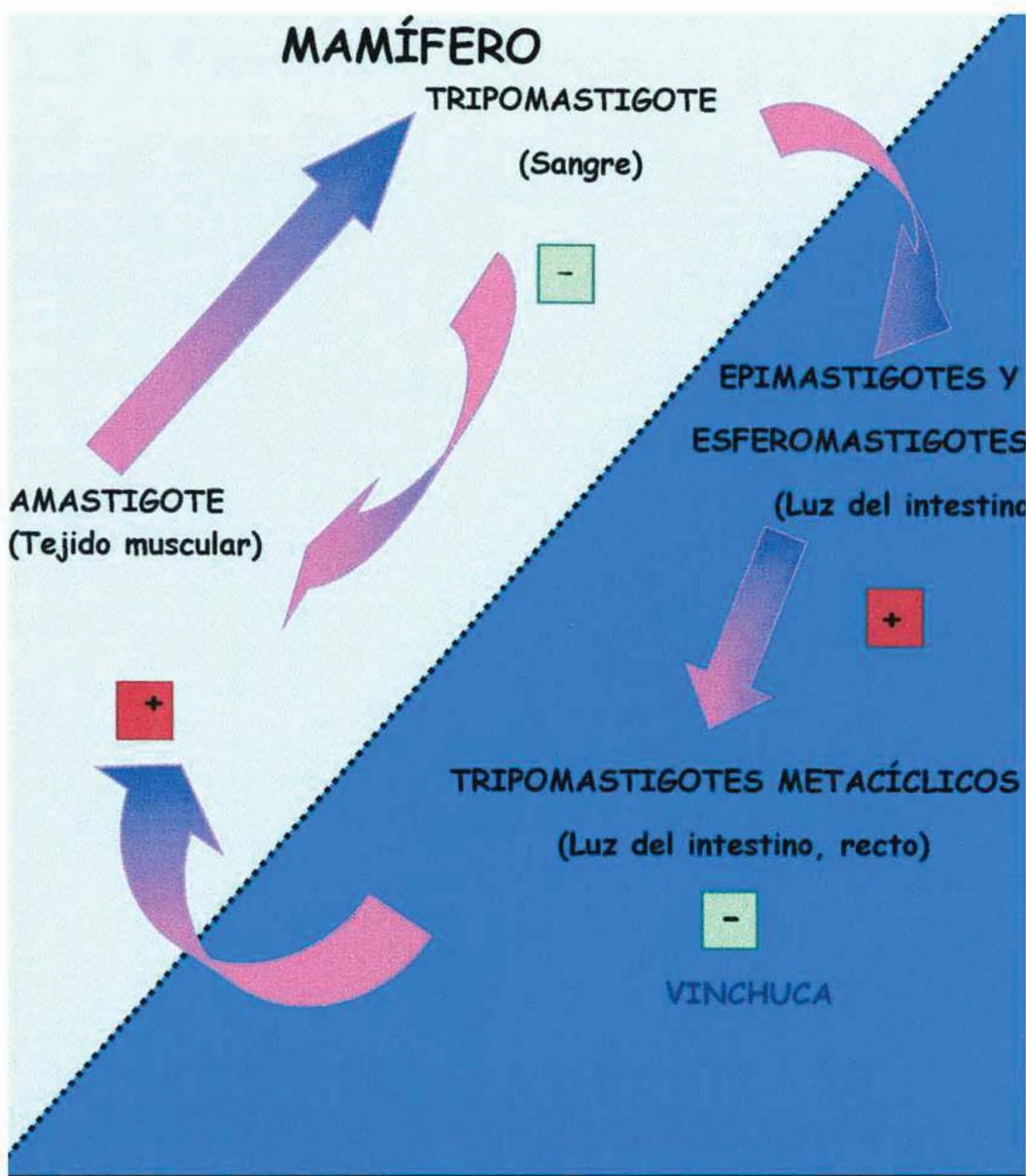


FIGURA 8: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Este ciclo alterna estados proliferativos (+) y estados quiescentes (-).

2.3.3.- Formas desarrolladas.

En *Trypanosoma cruzi* se identificaron tres formas morfológicamente distintas: amastigote, epimastigote y tripomastigote.

- **AMASTIGOTE** : Se la conoce, también, como esferomastigote, micromastigote, forma aflagelada o forma leishmania. Es una forma multiplicativa intracelular de *T.cruzi* en el mamífero. Existen observaciones con microscopía electrónica y de contraste de fase, que indicarían que estas formas presentan un corto flagelo (Meyer y De Souza, 1976).
- **EPIMASTIGOTES** : Se localizan en el intestino del hospedador invertebrado. Cuando *T.cruzi* se mantiene en cultivos acelulares, estas formas se observan en la fase logarítmica de crecimiento. Asimismo, pueden también encontrarse durante el final del ciclo intracelular, cuando los amastigotes se transforman en tripomastigotes o cuando al comienzo del nuevo ciclo, ocurre la transformación inversa (Meyer y De Oliveira, 1948). Son organismos alargados que pueden dividirse, tienen el flagelo libre en la posición extrema y el cinetoplasto localizado anterior al núcleo.
- **TRIPOMASTIGOTES** : Tienen un flagelo y una membrana ondulante todo a lo largo del organismo. El cinetoplasto está situado en la región posterior al núcleo. Este estadio se observa en: a) células de tejidos y sangre de los hospedadores mamíferos (forma circulante), b) intestino posterior, heces y orina del hospedador invertebrado (forma metacíclica), c) cultivos axénicos (forma estacionaria de crecimiento) y d) cultivos celulares (fase líquida) (De Souza, 1983). No son capaces de dividirse.

2.3.4- Características celulares diferenciales.

- La membrana plasmática y cubiertas externas tienen fundamental importancia en la interacción parásito-hospedador. Por microscopía electrónica, se ha observado que la cubierta superficial de los tripomastigotes sanguíneos

está compuesta por 5 a 10 millones de moléculas de una glicoproteína variable de superficie (VSG), distribuida uniformemente. Las VSGs forman una monocapa sobre la membrana plasmática, constituyendo una barrera física que evade la respuesta inmune del hospedador, debido a su gran variabilidad.

– Se designa como microtúbulos subpeliculares, a la capa de microtúbulos característica de los protozoos tripanosomátidos, que se localiza por debajo de la membrana plasmática. Se comprobó que los microtúbulos están conectados entre sí y con la membrana plasmática a través de cortos filamentos de naturaleza aún desconocida.

– Todos los miembros de la familia Trypanosomatidae, poseen un flagelo que emerge de una invaginación llamada bolsillo flagelar. El flagelo de *T.cruzi*, generalmente, está unido al cuerpo basal. Aunque los tripanosomátidos tienen un solo flagelo, poseen dos cuerpos basales localizados muy cerca, y compuestos de nueve tripletes de microtúbulos.

– *Trypanosoma cruzi*, al igual que otros miembros de la familia, posee una sola mitocondria de gran tamaño que recorre todo su cuerpo celular formando ramificaciones. En una de estas ramificaciones se encuentra el DNA mitocondrial que integra el conjunto cinetoplasto-mitocondria.

– El cinetoplasto está formado por un DNA que posee una configuración especial. El mismo ha sido estudiado en detalle y se estableció que el DNA cinetoplástico representa entre el 20 y 25% del DNA total de los epimastigotes. Por microscopía electrónica se demostró que el cinetoplasto consiste en una red de 20.000 a 30.000 moléculas de minicírculos asociadas unas con otras y con moléculas más grandes, también constituidas por DNA circular, llamadas maxicírculos.

– Poseen unas organelas especializadas, llamadas glicosomas, en donde la glucosa es metabolizada a piruvato.

– Poseen genes policistrónicos. Cada gen dentro del policistrón, se encuentra separado por pequeñas secuencias llamadas, secuencias intergénicas (Ben Amar y col., 1988). El procesamiento del transcripto primario permite la obtención de mRNAs individuales, a los cuales se les adiciona la caperuza en el extremo 5' y la cola de poly(A) en el extremo 3'. El capping es llevado a cabo por un mecanismo de *trans splicing*, en el cual se adiciona al extremo 5' del mRNA clivado, un oligoribonucleótido precapeado (de aproximadamente 39 nucleótidos de longitud) (Bruzik y Steitz, 1990).

– Varios genes para proteínas mitocondriales se encuentran en los maxiáculos cinetoplástidos, pero estos genes están, generalmente, incompletos. La obtención de mRNAs funcionales, involucra la adición o delección posttranscripcional de residuos de uracilo, mecanismo que se conoce como edición del RNA (Benne, 1994).

2.4- Biosíntesis del hemo en la familia Trypanosomatidae.

Los hemoflagelados requieren de hemo como factor de crecimiento esencial *in vitro*, el cual es suministrado, generalmente, como hemina, hematinia o hemoglobina (Lwoff, 1951; Chang y Chang, 1985). Estudios llevados a cabo con hemina marcada han demostrado, no sólo que los protozoarios tripanosomátidos, unen hemo en forma específica, sino que la unión es dependiente de la presencia de un receptor y que se encuentra regulada por la fase de crecimiento en la que se halla el parásito (Galbraith y McElrath, 1988).

Estos requerimientos nutricionales, están asociados con la incapacidad de biosintetizar hemo (Roitman y col., 1972; Chang y Sassa, 1975). Una excepción a esta incapacidad, la constituyen varias especies de tripanosomátidos flagelados que albergan entidades intracelulares autoproductoras, presumiblemente bacterias simbiontes. En *Blastocrithidia culicis* y *Critidium deanei* existen fuertes evidencias de la naturaleza procariota de estas entidades (Chang y col., 1975; Mundim y Roitman, 1977).

En los hemoflagelados libres, la hemina puede ser sustituida por Proto IX, debido a la presencia de una ferroquelatasa funcional (Salzman y col., 1985; Srivastava y col., 1997), pero no por otros precursores como ALA y PBG (Gaughan y Krassner, 1971). Las dos enzimas que intervienen en la síntesis de ALA, ALA-S y DOVA-T, fueron detectadas en miembros de la familia Trypanosomatidae (Salzman y col., 1982; Salzman y col., 1986; Sagar y col., 1995; Srivastava y col., 1997), no habiéndose detectado actividad para las enzimas ALA-D; Deaminasa y el complejo de la PBGasa (Salzman y col., 1982; Chang y Chang, 1985; Salzman y col., 1986).

Teniendo en cuenta la localización intracelular del camino biosintético del hemo, los resultados reportados hasta la fecha sugieren que *Trypanosoma cruzi* sólo conserva funcional las enzimas particuladas, que son las encargadas de sintetizar ALA y hemo.

Considerando que en la actualidad se dispone, tanto de mayor información con respecto a las características de las enzimas involucradas, como de métodos más sensibles para la cuantificación de las mismas, pensamos que es de fundamental interés rever y retomar la investigación del camino biosintético de las porfirinas en *T. cruzi*.

3- MATERIALES Y MÉTODOS.

	Página
3.1- Materiales	28
3.1.1- Síntesis de Porfobilinógeno	28
3.1.2- Síntesis de ácido τ , δ -dioxovalérico	29
3.1.3- Cultivo y mantenimiento de las cepas utilizadas	29
3.1.4- Medios de cultivo	30
3.1.4.1- Medios de cultivo para <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
3.1.4.2- Medio de cultivo para <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	31
3.1.5- Equipos	31
3.2- Métodos	32
3.2.1- Preparación de extractos enzimáticos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
3.2.2- Preparación de extractos enzimáticos de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	32
3.2.3- Determinación del contenido intracelular de los metabolitos del camino biosintético del hemo	33
3.2.4- Determinación del contenido extracelular de los metabolitos del camino biosintético del hemo	35
3.2.5- Ensayo de las actividades enzimáticas	36
3.2.6- Determinación del contenido proteico	40
3.2.7- Expresión de los resultados	40
3.2.8- Tratamiento estadístico	40

3.1- Materiales.

Todos las drogas fueron de la más alta pureza comercialmente disponible.

3.1.1- Síntesis de Porfobilinógeno.

El PBG se sintetizó enzimáticamente según la metodología descripta por Sancovich y col. (1976), a partir de ALA (Sigma Chemical Co., USA) y ALA-D de hígado bovino. Para la obtención de ALA-D, el hígado fue cortado en trozos y se lavó con solución fisiológica. Se homogeneizó con 10% (p/v) de sacarosa 0,25M. El homogenato se centrifugó a 12.000 x g por 20 minutos y el sobrenadante se calentó a 58-60 °C en baño de María por 5 minutos. Se centrifugó a 12.000 x g por 20 minutos y al sobrenadante se lo sometió a una precipitación con sulfato de amonio 0-30%, llevando a pH 7 con NH₃ (c) y ácido acético glacial. Se centrifugó para eliminar el pellet y se realizó un nuevo fraccionamiento con sulfato de amonio 30-55%, llevando a pH 7. El precipitado de la fracción 30-50%, conteniendo actividad de ALA-D, se resuspendió en buffer fosfato de potasio 0,134M pH 6,8 (entre 35-45 ml). El sistema de incubación para la obtención de PBG contenía 0,2 ml de la fracción 30-55% de hígado bovino; 52 µmoles de cisteína; 6,37 µmoles ALA y buffer fosfato 0,134 M pH 6,8 hasta completar un volumen final de 2 ml. Se preincubó por 30 minutos a 37-38 °C en ausencia del ALA. Luego se incorporó el ALA y se incubó en las mismas condiciones por 60 minutos adicionales. La reacción se frenó por agregado de solución saturada de sulfato de cobre. Se centrifugó para eliminar la proteína desnaturizada y se cuantificó el PBG sintetizado (Moore y Labbe, 1964). Para ello se tomó 1 ml del sobrenadante desproteinizado y se le adicionó 1 ml del reactivo de Ehrlich. Se leyó absorbancia a 553 nm.

$$\text{nmoles de PBG/ ml sobrenadante} = A_{553} \times 10^6 / f \times 226$$

Factor de conversión (*f*) = 113,6 (Moore y Labbe, 1964).

Masa molar del PBG = 226

Preparación del reactivo de Ehrlich (modificado).

Este reactivo se prepara en el momento de usar. Contiene 1 g de p-dimetil aminobenzaldehído disuelto en 16 ml de ácido perclórico y 34 ml de ácido acético glacial. Una vez adicionado a la solución que se desea cuantificar, el complejo coloreado que se forma, es estable a temperatura ambiente entre los 10 y 30 minutos. Se registra la absorbancia a 553 nm.

3.1.2- Síntesis de ácido τ , δ -dioxovalérico.

El DOVA fue preparado a partir de la hidrólisis del ácido 3,5-dibromolevulínico (Porphyrin Products, Logan, UT), según el método descripto por Varticovsky y col. (1980). A 100 ml de agua destilada se le agregan 1,37 g de ácido 3,5-dibromolevulínico. Se hierve en forma lenta durante 3 horas, manteniendo el volumen constante. Una vez frío se extrae con 30 ml de acetato de etilo. La fase acuosa se lava con 30 ml de éter etílico y se descarta la fase orgánica. El éter residual que pudo haber quedado en la fase acuosa se evapora por calentamiento a 40 °C, burbujeando con nitrógeno por 15 minutos. Finalmente se lleva a pH 4,2 con NaOH 3N y se guarda fraccionado a -20 °C.

La cuantificación del DOVA sintetizado se realiza en el siguiente sistema: 3 ml de ácido perclórico 1N; 45 µl de o-fenilendiamina (0,3% p/v disuelta en ácido sulfúrico 0,1 N) y 0,15 ml del DOVA (diluciones 1:15 y 1:30, hechas en ácido perclórico 1N). Se deja 1 hora a temperatura ambiente y se registra la absorbancia a 336 nm (Jerzykowsky y col., 1973).

$$\text{DOVA moles/l} = \{(A_{336\text{nm}} - B_l) \times 3,195 \text{ ml} \times \text{factor de dilución}\} / (\epsilon^M \times 0,15 \text{ ml})$$

$$\epsilon^M = 9 \times 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

3.1.3- Cultivo y mantenimiento de las cepas utilizadas.

Cepas utilizadas.

Los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, cepa Tulahuén, stock Tul 2 (Segura y col., 1980), fueron suministrados por el Instituto Nacional de Chagas "Dr. Mario Fatala Chabén". Los cuales provenían de un crecimiento en medio bifásico a 28 °C (Gerez de Burgos y col., 1976) y sin agitación.

Las células de *Rhodobacter sphaeroides* provenían de una colección de la Unidad Microbiológica de la Facultad de Agronomía, de la Universidad de Buenos Aires. Éstas fueron crecidas en el medio S de Lascelles (Lascelles, 1960), en forma anaeróbica, con luz, a 30 °C, por 2-3 días.

3.1.4- Medios de cultivo.

3.1.4.1- Medios de cultivo para *Trypanosoma cruzi*.

Medio bifásico con sangre.

Base: Se disuelven 31 g de Nutrient Agar (1,5%) en agua destilada c.p.s. (pH 7,4), a baño María. Una vez disuelto se fracciona en caliente 25/30 ml de medio por erlenmeyer de 250 ml. Se esteriliza en autoclave 10 minutos a 1 atmósfera. Se deja enfriar hasta que llegue a 42 °C, aproximadamente, y antes de que solidifique se le agrega con pipeta estéril, 1,5 ml de sangre de conejo desfibrinada.

Sobrenadante: Se disuelven 37 g de Brain Heart Infusion en 1.000 ml de agua destilada c.p.s (pH 7,4), a baño María. Se esteriliza en autoclave durante 10 minutos a 1 atmósfera. Se fracciona en 100 ml de medio por cada erlenmeyer que contiene la base solidificada.

Sangre de conejo desfibrinada: Sangrar por punción cardíaca un conejo, hasta obtener 50 ml de sangre. Agregar en forma estéril a un erlenmeyer que contiene 50 ml de Brain Heart Infusion (37g/l) y perlas de vidrio. Agitar efectuando círculos, por lo menos durante 45 minutos, hasta desfibrinar totalmente la sangre. Agregar penicilina y estreptomicina, a una concentración final de 1.000 UI/ml y 1 mg/ml, respectivamente. Utilizar en el día.

Caldo de investigación (Medio monofásico).

Se disuelven los siguientes componentes en 1.000 ml de agua destilada c.p.s., a baño María (pH 7,2-7,4): 3,0 g Extracto de levadura; 9,0 g Tryptose; 4,0 g Glucosa p.a.; 10,0 g Na₂PO₄:2H₂O p.a; 3,6 g NaCl p.a.; 0,4 g KCl p.a.; 1,5 g Hígado en polvo (Bacto Liver) y 5,0 g Brain Heart Infusion. Agregar 0,02 g de hemina disuelta con unas gotas de NaOH 1N. Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 10 minutos. Concentración final de hemina en el caldo de investigación 30,67 µM.

3.1.4.2- Medio de cultivo para *Rhodobacter sphaeroides*.

Se disuelven los siguientes componentes en 1.000 ml de agua destilada c.p.s. (pH 6,8): 3,86 g Na-L-Glutamato:1H₂O; 2,76 g D-L-Ácido Málico; 0,5 g KH₂PO₄; 0,5 g K₂HPO₄; 0,8 g (NH₄)₂HPO₄; 0,2 g MgSO₄:7H₂O; 0,02 g CaCl₂; 0,004 g (SO₄)Fe(NH₄)₂; 0,001 g MnCl₂; 0,5 mg Ácido Fólico; 0,05 mg Biotina; 2,0 mg Glicina; 0,1 g Mioinositol; 5,0 mg Ácido nicotínico; 0,5 mg Clorhidrato de piridoxina y 0,5 mg Clorhidrato de tiamina. Esterilizar en autoclave a 1,4 atmósferas durante 15-20 minutos.

3.1.5- Equipos.

Para llevar a cabo este trabajo se empleó el siguiente instrumental:

- Autoclave Ghilon
- Flujo laminar Labconco
- Sonicador Soniprep 150 MSE
- Centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B
- Centrífuga Rolco modelo CM-36
- Baño de incubación Precision Scientific C.O.
- Balanzas Mettler PC 2000 y AK 160
- Espectrofotómetro Hewlett Packard
- pHmetro Beckman Ö 12 pH/ISE Meter
- Bomba peristáltica Perista Pump SJ-1215

3.2- Métodos.

3.2.1- Preparación de extractos enzimáticos de *Trypanosoma cruzi*.

Todos los pasos fueron realizados a 2-4 °C. Las células fueron cosechadas cuando se encontraban en la fase exponencial tardía de crecimiento (generalmente luego de los 6 días), por centrifugación a 12.000 x g por 10 minutos y fueron lavadas una vez con buffer Tris:HCl 0,05M pH 7,4. Las células provenientes de 400 ml de cultivo, fueron resuspendidas en 8-10 ml de buffer Tris :HCl 0,05 M pH 7,4 o buffer fosfato de sodio 0,05M pH 7,4, dependiendo de la enzima en estudio. Las células en suspensión fueron rotas por sonicación a 10 µ por 45 segundos. El homogenato resultante, fue centrifugado a 5.000 x g por 15 minutos y el sobrenadante (**S**) utilizado para medir niveles intracelulares de los distintos metabolitos y actividades enzimáticas.

3.2.2- Preparación de extractos enzimáticos de *Rhodobacter sphaeroides*.

Todos los pasos se realizaron a 4 °C. Las células fueron cosechadas en la fase exponencial de crecimiento, por centrifugación a 12.000 x g por 15 minutos y se resuspendieron en buffer Tris:HCl 0,05M pH 7,4 hasta llegar a una absorbancia (680 nm) de 0,980. La preparación del extracto enzimático se llevó a cabo siguiendo la metodología descripta por Tuboi y col. (1970): las células fueron rotas por sonicación a 12 µ durante 3 minutos, y diluidas con Tris:HCl 0,05 M pH 7,4 en una relación 1:3. El homogenato resultante fue centrifugado a 5.000 x g durante 25 minutos. El sobrenadante fue sometido a fraccionamiento con sulfato de amonio, separándose las fracciones que precipitan en los rangos 0-40% y 45-65%.

La mayor parte de la actividad del ALA-S del extracto crudo, se encuentra en la fracción 0-40% de saturación con sulfato de amonio. Esta fracción dializada toda la noche contra buffer fosfato de sodio 0,05M pH 7,4 conteniendo 2-mercptoetanol 0,01M, fue utilizada como fuente de ALA-S. La fracción 45-65% de saturación con sulfato de amonio, obtenida a partir del mismo extracto enzimático, fue utilizada como fuente de Suc.CoA-S.

3.2.3- Determinación del contenido intracelular de los metabolitos del camino biosintético del hemo.

Las siguientes determinaciones fueron llevadas a cabo resuspendiendo las células de *T.cruzi* en buffer Tris :HCl 0,05M pH 7,4.

ALA y PBG.

1 ml del sobrenadante S, fue tratado con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Las proteínas precipitadas fueron separadas por centrifugación y ambos precursores, ALA y PBG, se midieron en el sobrenadante.

Para la cuantificación de ALA, 1 ml del sobrenadante se lleva a pH 4,6 con 0,1 ml de NaOH 3N, se adiciona 1 ml de buffer acetato de sodio 1M pH 4,6 y 0,05 ml de acetilacetona (2-4 pentanodiona). Se calienta a 100 °C durante 10 minutos en baño de agua, se deja enfriar y luego se agrega igual volumen del reactivo de Ehrlich modificado (Mauzerall y Granick, 1956). El ALA presente se cuantifica espectrofotométricamente a 553 nm.

$$\text{nmoles ALA/ml S} = (\text{A553} - \text{B1}) \times 10^3 \times V_f / \epsilon^M$$

Vf = volumen final del sistema de cuantificación.

$$\epsilon^M = 72 \text{ M}^{-1}$$

El PBG se cuantifica en 1 ml del sobrenadante desproteinizado, según lo especificado en el punto 2.1.1.

PORFIRINAS.

1 ml del sobrenadante **S**, fue tratado con HCl concentrado, hasta alcanzar una concentración final de 5% (p/v). Las proteínas precipitadas fueron separadas por centrifugación y en una alícuota del sobrenadante se cuantifican espectrofotométricamente en base a la banda de Soret, leyendo absorbancias a 380 nm, 430 nm y a la longitud de onda de máxima absorción (Rimington, 1960). El contenido de porfirinas se determinó mediante la siguiente expresión:

$$\text{nmoles de porfirinas / ml S} = 2 \times A_{\text{máxima}} - (A_{380\text{nm}} + A_{430\text{nm}}) \times f \times V$$

f (factor de conversión) = 1,008 para uroporfirina en solución ácida al 5%

V = volumen de la solución desproteinizada.

HEMO libre.

El hemo fue medido por el método del piridin hemocromógeno (Porra y col., 1963) en el sobrenadante **S**, desproteinizado previamente con HCl, hasta una concentración final de 5% (p/v). Una alícuota de este sobrenadante se lleva a un volumen final de 4,2 ml con HCl 5% p/v. Se agrega 0,5 ml de NaOH 1N; 1,0 ml de piridina y 1 ml de agua destilada. Se agita y se divide en dos partes iguales, a una se le agrega 2 mg de ditionito de sodio (A) y a la otra 50 μ l de Ferricinauro de potasio (1 mg/ml) (B). Se agita. El tubo (A) se lee a 557 nm y el (B) a 541 nm. Los nmoles de hemina se calculan de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{nmoles de hemina} = (A^{557} - A^{541}) - \Delta A_{BR} \times V / 20,7 \times \text{dilución} \times 1000$$

V = volumen final del sistema de cuantificación.

A^λ = absorbancia a la longitud de onda correspondiente.

ΔA_{BR} = diferencia de absorbancia de los blancos de reactivo, para cada longitud de onda.

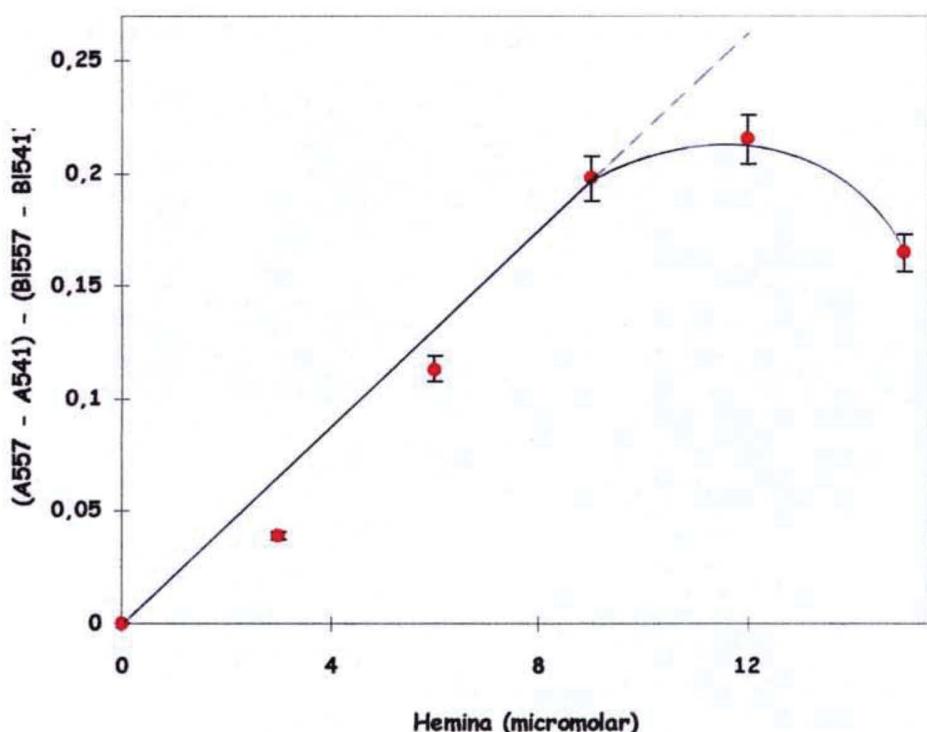


FIGURA 9 : Cuantificación de hemina por el método del piridin hemocromógeno. A partir de un standard de hemina pura ($50\mu M$), se vario la concentración de ésta entre 3 y $15\mu M$. El resto de la metodología corresponde a la descripta en el texto.

3.2.4- Determinación del contenido extracelular de metabolitos del camino biosintético del hemo.

Las siguientes determinaciones fueron llevadas a cabo en el medio de cultivo luego de que las células de *T. cruzi* fueron cosechadas.

ALA y PBG excretados.

Ambos precursores de las porfirinas, ALA y PBG, fueron separados y medidos en una alícuota del medio de cultivo (llevado previamente a un pH por encima de 5) por la metodología descripta por Mauzerall y Granick en 1956.

Una alícuota del medio se pasa a través de una columna de intercambio iónico (DOWEX 2X-8) con la resina en su forma acetato. El PBG quedará retenido en la columna mientras que el ALA será excluido. El PBG, es luego eluído con ácido acético (c) y se determina colorimétricamente con el reactivo de Ehrlich (Ver punto 2.1.1).

El ALA excluido de la primer columna es retenido por una columna de intercambio iónico (DOWEX 50X-8) con la resina en su forma ácida. Éste, luego es eluído con acetato de sodio y condensado con acetilacetona a pH 4,6, para que el pirrol resultante pueda ser determinado colorimétricamente con el reactivo de Ehrlich modificado (Ver punto 2.2.3).

HEMO libre.

El hemo fue medido por el método del piridin hemocromógeno (Porra y col., 1963).

3.2.5- Ensayo de las actividades enzimáticas.

A) SUCCINIL-CoA SINTETASA

El sistema standard de incubación contenía 50 µmoles de Tris:HCl 0,05M pH 7,4 ; 5 µmoles de ATP ; 0,12 µmoles de SHCoA ; 10 µmoles de glutatión (en su forma reducida) ; 20 µmoles de MgCl₂; 100 µmoles de succinato de sodio ; 960 µmoles de hidroxilamina (adicionado como una mezcla de hidroxilamina hidrocloruro-KOH, pH 7,4) ; el sobrenadante **S** (3-5 mg de proteína) y se llevó a un volumen final de 2 ml con buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4. Se incubó a 37 °C en oscuridad, con agitación constante y en aerobiosis, durante 30 minutos. La reacción fue detenida por la adición de 1 ml de mezcla desproteinizante (TCA 25%, HCl 3N, FeCl₃ 5% en HCl 1N; relación 1:1:1). Se centrifugó y en el sobrenadante se cuantificó espectrofotométricamente el succinil hidroxamato formado leyendo a 540nm.

En este caso al igual que para el resto de las enzimas que mencionamos a continuación, se realizaron todos los blancos y controles correspondientes.

$$\mu\text{moles succinilhidroxalato/ml S x hora} = (\text{A540-BI}) \times 2 / f \times V_e$$

$$f = 0,283 \mu\text{moles}^{-1}$$

V_e = volumen del extracto enzimático.

B) ALA-S.

El sistema standard de incubación contenía 50 μmoles de buffer Tris-HCl pH 7,4; 10 μmoles de MgCl_2 ; 2,5 μmoles de ATP; 50 μmoles de succinato de sodio; 100 μmoles de glicina; 0,12 μmoles de SHCoA; 3 μmoles de glutatión; 0,27 μmoles de fosfato de piridoxal; 2 μmoles de EDTA; 50 μl de una suspensión de succinil-CoA sintetasa de *Rb. sphaeroides* (1 ml de esta suspensión fue capaz de catalizar la formación de 58 μmoles de succinil hidroxamato por hora a 37 °C); el extracto enzimático (generalmente, 3-5 ó 0,15-0,20 mg de proteínas del sobrenadante **S** de *T. cruzi* o de la fracción ALA-S de *Rb.sphaeroides*, respectivamente) y buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 hasta completar un volumen de 1,55 ml. Se incubó a 37°C, con agitación constante, en oscuridad y en aerobiosis durante 1 hora. La reacción se detuvo por el agregado de 0,39 ml de TCA al 25% (p/v), la proteína precipitada se separó por centrifugación y en el sobrenadante se cuantificó el ALA formado (Mauzerall y Granick, 1956).

$$\text{nmoles ALA/ml S} = (\text{A553 - BI}) \times 10^3 \times V_f \times V / \epsilon^M \times V_e$$

V = volumen del sistema de incubación desproteinizado.

V_f = volumen final del sistema de cuantificación.

V_e = volumen de extracto enzimático.

$$\epsilon^M = 72 \text{ M}^{-1}$$

C) DOVA TRANSAMINASA (DOVA-T).

Las condiciones utilizadas fueron aquellas descriptas por Lombardo y col. (1989). El sistema standard de incubación contenía 100 μmoles de buffer fosfato de sodio pH 7,4; 166,67 μmoles de L-glutamato de sodio; 4,0-5,5 μmoles de DOVA; el extracto enzimático **S** (generalmente, entre 5-7 mg de proteínas) y

buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 hasta completar un volumen de 1 ml. Se incubó a 37 °C, con agitación constante, en aerobiosis y en presencia de luz, por 1 hora. La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de TCA al 10% (p/v), la proteína precipitada se separó por centrifugación y en el sobrenadante se cuantificó el ALA (Mauzerall y Granick, 1956). Para la obtención de los nmoles de ALA formados, se utiliza la misma ecuación que en la medición de actividad de ALA-S.

D) ALA-D.

El sistema standard de incubación contenía 100 µmoles de buffer fosfato de sodio pH 7,0; 5 µmoles de ALA; 20 µmoles de 2-mercptoetanol; el extracto enzimático **S** (3-5 mg de proteína) y agua destilada hasta completar un volumen de 1 ml. Se incubó a 37 °C, en oscuridad, con agitación constante y en aerobiosis durante 1 hora. La reacción se detuvo adicionando 0,1 ml de solución saturada de CuSO₄, la proteína precipitada se separó por centrifugación y en el sobrenadante se determinó la cantidad de PBG formado (Mauzerall y Granick, 1956).

$$\text{nmoles de PBG/ml S} = \text{A553} \times \text{dilución} \times 10^6 / f \times 226 \times V_e$$

Factor de conversión (*f*) = 113,6 (Moore y Labbe, 1964).

Masa molar del PBG = 226

V_e = volumen del extracto enzimático.

E) PORFOBILINOGENASA (PBGasa).

Su actividad fue medida de acuerdo al método descripto por Araujo y col. (1989). El sistema standard de incubación contenía 50 µmoles de fosfato de sodio pH 8,0; 0,15 µmol de PBG; el sobrenadante **S** (3-5 mg de proteína) y buffer fosfato de sodio 0,05M pH 8 hasta completar un volumen final de 1,5 ml. Se incubó a 37 °C, en oscuridad, con agitación constante y aerobiosis durante 2 horas. La reacción se detuvo por el agregado de HCl concentrado, hasta alcanzar una concentración final en el incubado del 5% (p/v). La mezcla fue, luego,

iluminada con luz blanca por 20 minutos para oxidar los porfirinógenos formados. La proteína precipitada se separó por centrifugación y en el sobrenadante ácido se cuantificaron espectrofotométricamente las porfirinas formadas, por el método de lecturas de absorbancias a 380 nm, 430 nm y a la longitud de onda de máxima absorción de la banda Soret (Rimington, 1950). Se determina la cantidad de producto formado mediante la siguiente expresión:

$$\text{nmoles de uroporfirina/ml Sxhora} = [\text{Amáxima} - (\text{A380nm} + \text{A430nm})] \times f \times V / Ve$$

f (factor de conversión) = 1,008 para uroporfirina en solución ácida al 5%

V = volumen de la solución desproteinizada.

Ve = Volumen del extracto enzimático.

F) RODENASA.

El sistema standard de incubación contenía 100 μ moles de buffer Tris:HCl pH 8,7 ; 100 μ moles de $S_2O_3Na_2$; 100 μ moles de NaCN ; el extracto enzimático S (entre 1,25 y 5,0 mg de proteínas) y agua destilada hasta completar un volumen de 2 ml. Se incubó a 37 °C con agitación constante y en aerobiosis durante 30 minutos. La reacción se detuvo con 0,2 ml de formol 38%, junto con 1 ml de reactivo férrico ($Fe[NO_3]_3$ disuelto en $HNO_3 + H_2O$), la proteína precipitada se separó por centrifugación. De cada fracción se tomó una aliquota y se hizo una dilución 1 :3. Se cuantificó, espectrofotométricamente, el sulfocianuro formado a 460 nm (Vázquez y col., 1987).

$$\text{nmoles de producto/ ml S x hora} = (A460 - BI) \times F \times 2 / Ve$$

F : Factor para la muestra sin diluir = 0,93

Factor para la muestra con dilución 1 :3 = 2,5

Ve = Volumen del extracto enzimático.

3.2.6- Determinación del contenido proteico.

Se realizó según la técnica original descripta por Lowry y col. (1951).

3.2.7- Expresión de los resultados.

Unidad enzimática (U.E.): se define una unidad enzimática como la cantidad de enzima capaz de catalizar la formación de 1 nmol de producto en 1 hora, bajo las condiciones standard de incubación.

Actividad específica (A.E.): la actividad específica se expresa como el número de unidades enzimáticas por milígramo de proteína (U.E./mg).

3.2.8- Tratamiento estadístico.

Todas las determinaciones, por ejemplo, niveles intracelulares de los metabolitos, ALA y PBG excretados y ensayos enzimáticos (medidos con un error del 5 al 10%), fueron realizadas con el mismo cultivo y el experimento completo fue realizado tres veces. Los valores absolutos entre un experimento y otro no se diferenciaron en más del 10 a 15%. Por lo tanto, los resultados fueron expresados como el valor promedio de tres experimentos independientes, realizados por duplicado \pm SD ($n = 3$).

4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Página

4.1- Análisis bioquímico de la ruta de síntesis del hemo en <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
4.1.1- Medición del contenido intra y extracelular de porfirinas y sus precursores	42
4.1.2- Actividades enzimáticas	44
4.2- Medición de actividad de ALA-S en <i>T.cruzi</i> en presencia de Succinil-CoA-Sintetasa de <i>Rhodo-</i> <i>bacter sphaeroides</i>	45
4.3- Inactivación del ALA-S de <i>Rb.sphaeroides</i> por el sobrenadante de <i>T.cruzi</i>: Identificación del inhibi- tor	47
4.4- Caracterización de la actividad de DOVA- transaminasa en <i>Trypanosoma cruzi</i>	53

4.1.- Análisis bioquímico de la ruta de síntesis del hemo en *Trypanosoma cruzi*.

Teniendo en cuenta que tanto el ALA-S como la DOVA-T, son enzimas mitocondriales se realizaron, en nuestro laboratorio, ensayos preliminares con el fin de hallar un método eficaz de ruptura de las células de *T. cruzi*, que permitiera una óptima liberación de las enzimas mitocondriales. Tomando a la Suc.CoA-S como enzima marcadora se encontró que la sonicación a 10 μ , durante 45 segundos era el mejor método para la liberación y obtención de estas enzimas. Se llamó al extracto enzimático así obtenido, sobrenadante S.

4.1.1.- Medición del contenido intra y extracelular de porfirinas y sus precursores.

Con el objeto de determinar hasta qué punto la secuencia de reacciones del camino del hemo es funcional y a qué nivel de la misma se producen las fallas, se midió la presencia de precursores y porfirinas tanto en el medio de cultivo (excretados) como en el extracto enzimático (S) (Tabla 1). De esta forma, basándose en el tipo de metabolito que se acumula sería posible inferir el nivel al cual se encuentra la deficiencia.

TABLA 1: Acumulación de porfirinas y precursores.

METABOLITO	Acumulación endógena (nmoles/mg)	Excreción al medio (nmoles/mg)
ALA	ND	245 ± 23
PBG	ND	11,98 ± 1,20
PORFIRINAS	ND	ND
HEMO	ND	Nd

Las mediciones fueron realizadas según lo descripto en Materiales y Métodos. Los valores fueron expresados como nmoles por mg de proteína presente en el sobrenadante S (1g de peso seco de células, rinde alrededor de 18-26 mg de proteínas). ND : No detectado. Nd: No determinado.

No se detectaron niveles de ALA y PBG endógenos. Pero sí se encontraron cantidades significativas de ambos precursores en el medio de cultivo, en especial de ALA. Estos resultados nos llevan a pensar la posibilidad de que una de las dos vías de síntesis de ALA sea funcional.

No se encontró hemo endógeno y en cuanto al hemo extracelular, si bien suponíamos su presencia puesto que forma parte de los componentes del caldo de investigación, fue imposible su determinación con los métodos empleados, ya que el medio interfirió con su cuantificación.

Espectrofotométricamente se confirmó que el metabolito acumulado era ALA (Figura 10) y no otro que diera reacción positiva con el reactivo de Ehrlich. No se observaron máximos de absorbancia entre 400 y 410 nm, ni en el extracto enzimático S, ni en el medio de cultivo, por lo que se descarta la posibilidad de la existencia de porfirinas.

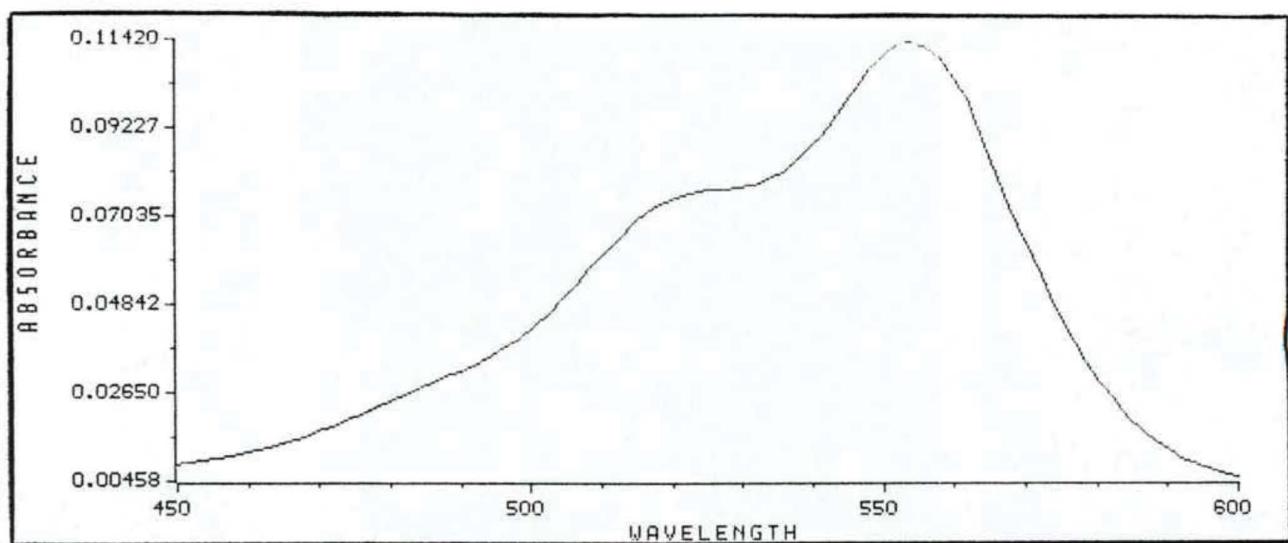


FIGURA 10: Espectro de absorción del medio en el cual fueron crecidas las células de *T.cruzi*. El espectro corrido al medio de cultivo coincidió con el de un estandar interno de ALA.

4.1.2.- Actividades enzimáticas.

En función de los metabolitos que se acumulan y debido a la ausencia de porfirinas en cantidades cuantificables, se midieron las actividades de las enzimas que se muestran en la Tabla 2.

Debido a la presencia de ALA en el medio extracelular, se midió actividad de ALA-S y DOVA-T, las dos enzimas que sintetizan este precursor por diferentes rutas. Sólo se encontró actividad de DOVA-T. A pesar de no observarse actividad de ALA-S, sí se encontró actividad de Suc.CoA-S, la enzima encargada de suministrar uno de sus sustratos.

No se halló actividad de ALA-D ni de PBGasa en el sobrenadante de *T.cruzi*.

TABLA 2: Actividad de las enzimas relacionadas con la ruta del hemo en *Trypanosoma cruzi*.

ENZIMAS	ACTIVIDAD (U.E/ mg)
Succinil-CoA Sintetasa	434 ± 35
ALA-S	ND
DOVA-T	7,13 ± 0,49
ALA-D	ND
PBGas	ND

Las mediciones fueron realizadas según lo descripto en Materiales y Métodos. Los valores fueron expresados como UE por mg de proteína presente en el sobrenadante S (1 g de peso seco de células, rinde alrededor de 18-26 mg de proteínas). ND : No detectado.

4.2.- Medición de actividad de ALA-S en *T.cruzi* en presencia de Succinil-CoA-Sintetasa de *Rhodobacter sphaeroides*.

Con el fin de asegurar la saturación del ALA-S de *T. cruzi* con succinil-CoA, se adicionó al sistema de incubación, Suc.CoA-S proveniente de *Rb. sphaeroides*. Esta última fracción presentaba, además, una actividad residual de ALA-S, que sería luego considerada en las determinaciones.

Al efectuar la medición de actividad con todos los controles correspondientes, observamos que el sobrenadante de *T. cruzi* no sólo no mostraba actividad de ALA-S, sino que además, su adición no permitía siquiera evaluar la actividad residual de ALA-S que presentaba la fracción de Suc.CoA-S, con lo cual supusimos que el sobrenadante proveniente del parásito, estaría ejerciendo algún efecto inhibitorio sobre la medición de actividad de la enzima.

Para confirmar esta suposición, se utilizó una fracción proveniente de *Rb. sphaeroides* que era principalmente rica en actividad de ALA-S, en lugar de la frac-

ción 45-65 % de saturación con sulfato de amonio, que contiene fundamentalmente Suc.CoA-S. De aquí en más empleamos como fuente de ALA-S a la fracción que precipita en el rango 0-40 % de saturación con sulfato de amonio y que fue activada previamente por diálisis toda una noche contra buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 que contiene además 2-mercaptopetanol 0,01 M (Burnham y Lascelles, 1963).

Tomando como 100% de actividad ALA-S a la fracción de *Rb.spheroides* sin agregados, el efecto inhibitorio se confirmó al observar que el porcentaje de actividad enzimática disminuía a medida que aumentaba la cantidad de sobrenadante de *T.cruzi* agregado (Figura 11).

El mayor porcentaje de inhibición que se logró alcanzar fue del 60%, aproximadamente, y correspondió a una concentración de proteínas de 2,80 mg/ml.

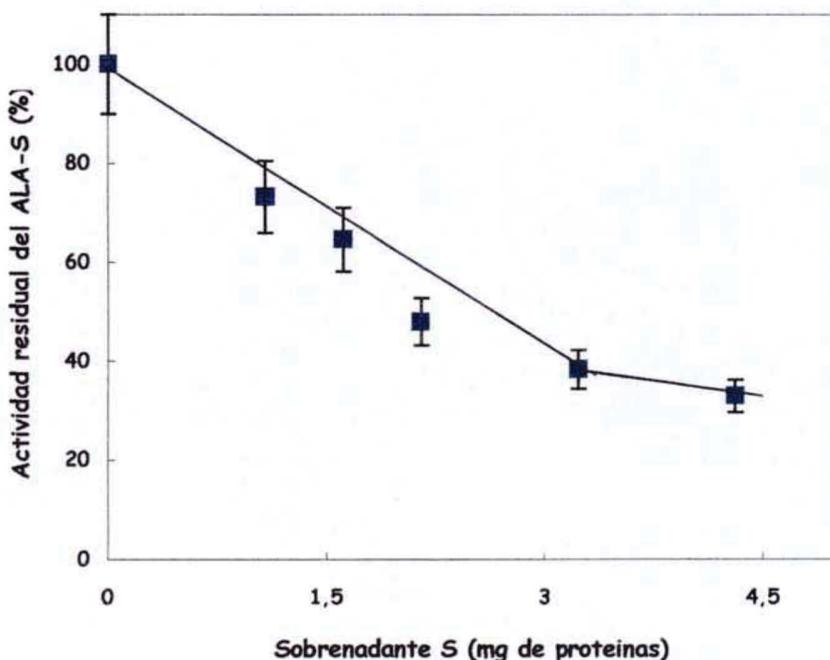


FIGURA 11: Inhibición de la actividad de ALA-S de *Rb. spheroides* por un extracto proteico de *T. cruzi*. Se midió actividad de ALA-S de la manera habitual, suplementando con distintos volúmenes del sobrenadante de *T.cruzi*. Se considera 100 % de actividad, a la fracción de ALA-S sin ningún agregado.

4.3.- Inactivación del ALA-S de *Rb.sphaeroides* por el sobrenadante de *T.cruzi*: Identificación del inhibidor.

Se estudió el efecto inhibitorio del sobrenadante de *T.cruzi* a distintos tiempos de incubación, para evaluar la posibilidad de que el inhibidor sea un metabolito que se origina durante el proceso de incubación.

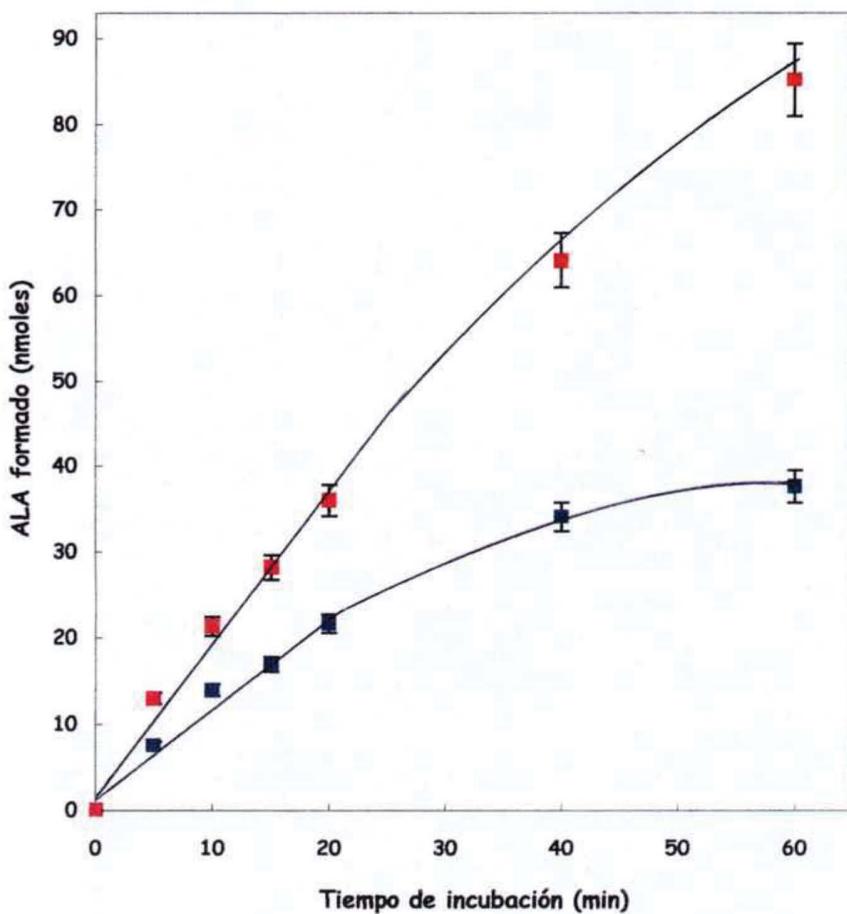


FIGURA 12 : Formación de ALA, a distintos tiempos, catalizada por el ALA-S de *Rb.sphaeroides*. Se midió la actividad del ALA-S de *Rb.sphaeroides* de la forma habitual, sin ningún agregado (■) o con el agregado de un volumen constante del sobrenadante S de *T.cruzi* (■). La reacción se frenó a distintos tiempos y se cuantificó el ALA formado.

En la Figura 12, se observa que la actividad inhibitoria aparece casi inmediatamente. A partir de los cinco minutos de incubación se observan diferencias significativas en los nmoles de ALA formados, entre el control (sin el agregado de **S**) y las incubaciones realizadas en presencia del sobrenadante de *T.cruzi*. Concluimos, que el inhibidor no es un metabolito originado en el proceso de incubación, sino que se encuentra presente en **S** y activo desde su inicio.

Con el objeto de determinar la naturaleza del inhibidor, se investigó el efecto del calor sobre el sobrenadante **S**, encontrándose que al cabo de 2 minutos de calentamiento a 100 °C, el sobrenadante pierde su efecto inhibitorio.

Para obtener una primera aproximación sobre el tamaño y la naturaleza del inhibidor, se ensayó el efecto de la diálisis sobre el sobrenadante **S**. Una fracción de este sobrenadante, se sometió a diálisis contra buffer Tris:HCl 0,05M pH 7,4 (6 cambios, cada 30 minutos), obteniéndose una fracción sin actividad inhibitoria.

Con los resultados obtenidos se plantean las siguientes posibilidades en cuanto a la naturaleza del inhibidor :1) el inhibidor es de naturaleza proteica, no resiste ni el calentamiento ni la diálisis. 2) el inhibidor es de naturaleza proteica, no resiste el calor y durante la diálisis pierde algún cofactor necesario para su actividad. 3) el inhibidor es de origen no proteico, no resiste el calor y puede atravesar la membrana de diálisis , por lo que se pierde.

A continuación se realizaron pasajes, del sobrenadante **S** de *T. cruzi* , por columna de tamiz molecular para evaluar el efecto de la fracción proteica y del eluido no proteico sobre la actividad de ALA-S de *Rb. sphaeroides* (Figura 13).

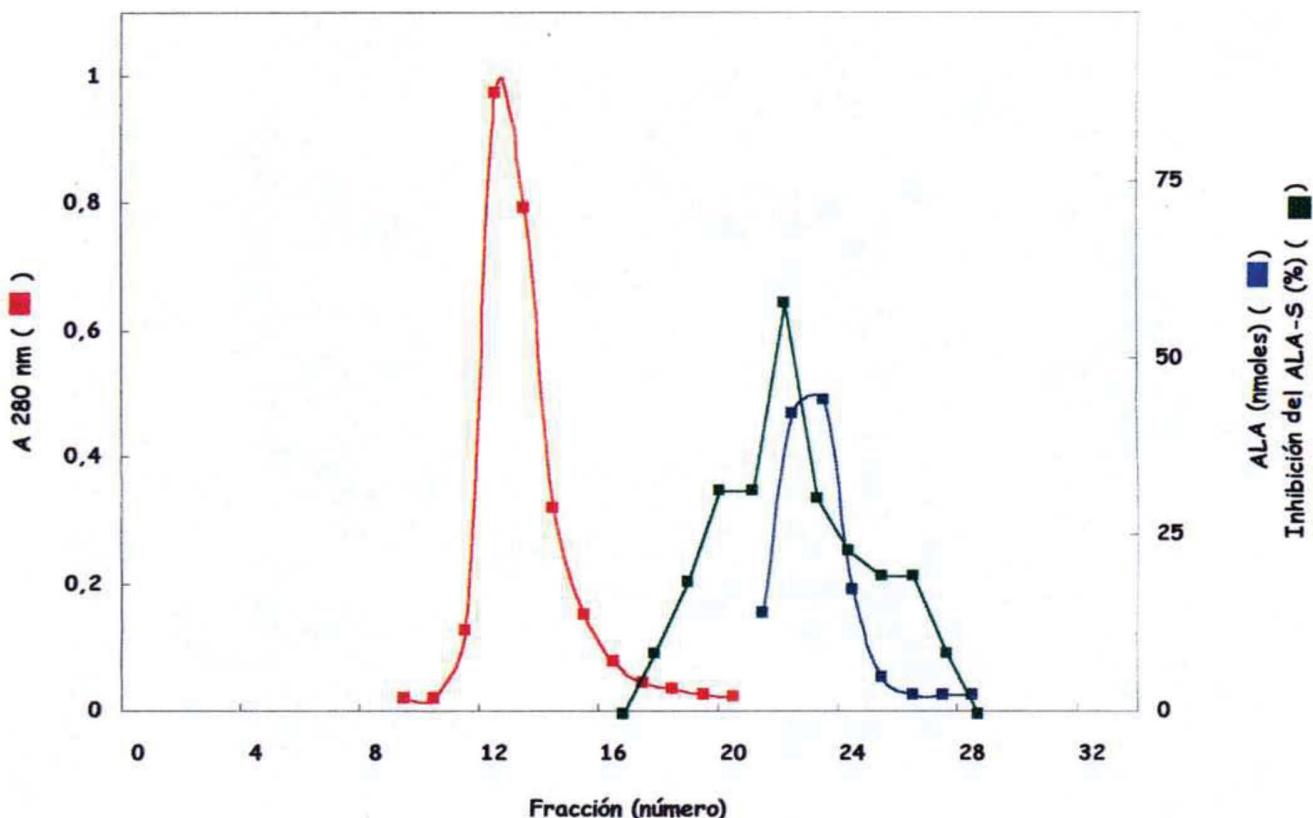


FIGURA 13: Cromatografía en Sephadex G-25 de un extracto enzimático de *T.cruzi*. Estudio de la naturaleza del inhibidor. Se pasaron 2,5 ml del sobrenadante **S** a través de una columna de 255 mm de longitud y 12 mm de diámetro interno, conteniendo Sephadex G-25. Se recogieron 18,50 ml del eluido proteico (**P**) y luego 27 alícuotas de 2,60 ml, que correspondieron a los eluidos no proteicos (**E1** a **E27**). Se midió la actividad del ALA-S de *Rb.sphaeroides* de la forma habitual, en ausencia o presencia del sobrenadante **S** o de las distintas fracciones obtenidas en el pasaje por la columna (**P**, **E1** a **E27**).

El sobrenadante de *T.cruzi* (**S**) mostró un 70% de inhibición sobre el ALA-S de *Rb.sphaeroides*, mientras que el pico proteico no presentó inhibición de la actividad enzimática. En los eluidos no proteicos se detectó el inhibidor a un volumen de elución de 57,20 ml (**E22**), con un efecto inhibitorio del 63%. También se ensayó la presencia de actividad de ALA-S en el pico proteico **P** (volumen muerto), previendo la posibilidad de que una vez separado el inhibidor presente en el sobrenadante se pudiera detectar dicha actividad. Sin embargo los resultados fueron negativos sugiriendo que el inhibidor es un producto de la actividad enzimática.

riendo que, o bien que la enzima no se encuentra presente o bien que pierde su actividad luego del pasaje por columna.

Con los resultados obtenidos hasta ahora podemos asegurar que el inhibidor no posee una estructura proteica, es un compuesto de bajo peso molecular e inestable al calor.

En lo que respecta a la identificación del inhibidor, el análisis de la acumulación de metabolitos endógenos (Tabla 1) permitió descartar que fuera el ALA el que estuviera ejerciendo inhibición por producto (Viale y col., 1987), ya que no se detectó su presencia a nivel intracelular.

Se pensó, también, en la posibilidad de que quedaran restos de hemina, proveniente del medio de cultivo, en las células lavadas, y que ésta estuviera inhibiendo al ALA-S de *Rb.sphaeroides*. Para descartar esta posibilidad se realizaron ensayos de actividad en donde se incubó al ALA-S con distintos volúmenes de una solución de hemina (30,67 μ M) tal cual o previamente autoclavada (Tabla 3). La concentración preparada fue la misma que la empleada para el medio de cultivo.

Comparando los resultados obtenidos respecto al control (sin el agregado de hemina), se observó un 100% de actividad para todas las concentraciones de hemina autoclavada, ensayadas. En cambio, sí se encontró inhibición de la actividad del ALA-S cuando se adicionó solución de hemina sin autoclavar, y en este caso, la respuesta fue concentración-dependiente.

TABLA 3: Inhibición de la actividad de ALA-S de *Rb.sphaeroides*, ejercida por distintas concentraciones de hemina sometida o no al proceso de esterilización.

<u>AGREGADOS</u>	<u>Actividad del ALA-S de <i>Rb.sphaeroides (%)</i></u>
1) CONTROL (sin hemina)	100 ± 2
2) Solución de hemina sin autoclavar (μM):	
4	85 ± 2
8	76,7 ± 0,2
20	73,1 ± 0,3
3) Solución de hemina autoclavada (μM):	
$0,36 \pm 0,05$	100 ± 8
$1,45 \pm 0,21$	100 ± 10
$1,85 \pm 0,21$	100 ± 1

Se partió de una solución de hemina de $30,67 \mu\text{M}$, una fracción de la cual fue autoclavada por 10 min. a 1 atmósfera. Se midió actividad del ALA-S de *Rb.sphaeroides* de la forma descripta en Materiales y Métodos, con el agregado de distintos volúmenes de hemina autoclavada o sin autoclavar. También se hizo un control sin hemina, el cual fue tomado como el 100% de actividad del ALA-S presente en la fracción 0-40%.

Cuando se cuantificó la solución madre de hemina autoclavada, se encontró una disminución de alrededor del 90% entre ésta y la solución de hemina sin autoclavar ($2,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$ y $30,67 \mu\text{M}$, respectivamente), confirmando la poca estabilidad de la hemina durante el proceso de esterilización y la obtención de una concentración menor a la necesaria para que se produzca inhibición por producto final (Wolfsom y col., 1979). Estos resultados junto con los mostrados en el Tabla 3, nos permitieron dejar de lado la idea de que fuera el hemo el que estuviera inhibiendo al ALA-S de *Rb. sphaeroides*.

Se sabe que las trisulfocistinas también son compuestos de bajo peso molecular, que regulan la actividad del ALA-S, incrementándola. (Vázquez y col., 1980; Viale y col., 1980 y Yamanishi y col., 1983). Por esta razón se decidió medir actividad de rodenasa en *T. cruzi* (Tabla 4), para poder dilucidar si existe la posibilidad de que el efecto inhibitorio del sobrenadante, sobre el ALA-S de *Rb.spheroides*, se deba a la inactivación de estos compuestos.

TABLA 4: Comparación de la actividad rodenasa de *T.cruzi* con la de otras fuentes enzimáticas

Fuente experimental	A.E. (U.E./ mg de proteína)
Trypanosoma cruzi	0,085 ± 0,023
Eritrocitos humanos (Vázquez y col., 1986).	2,46 × 10²
Rhodopseudomonas. palustris (Vázquez y col., 1987).	5,26 × 10³
Hígado de ratón (Navone y col., 1992).	14,4 ± 2,4
Riñón de rata (Anosike y Alaso, 1982).	4,2 × 10³
Riñón de cobayo (Anosike y Alaso, 1982).	33,6 × 10³
Ferrobacillus ferrooxidans (Tabita y col., 1969).	14,16 × 10³

Se midió la actividad rodenasa en el sobrenadante de *T.cruzi* (5,15 mg de proteína por ml de extracto) de la forma descripta en Materiales y Métodos. El valor obtenido fue comparado con los reportados en otras fuentes experimentales en las que se utilizó el mismo sistema estándar de incubación.

La Tabla 4, permite observar el valor significativamente menor de la actividad rodenasa de *T.cruzi*, en comparación con la de las demás fuentes enzimáticas.

máticas. Podemos, así, considerar poco probable la intervención del sistema rodenasa-cistationasa, como regulador de la actividad del ALA-S de *Rb.sphaeroides*, por lo que el inhibidor no estaría relacionado con las trisulfocistinas.

4.4- Caracterización de la actividad DOVA-Transaminasa en *Trypanosoma cruzi*.

Como no se pudo detectar actividad de ALA-S en el sobrenadante de *T.cruzi*, se estudió la segunda ruta alternativa para la síntesis de ALA, en la cual interviene la DOVA-T.

Se buscó, en primer lugar, el aminoácido preferencial de esta enzima en *T.cruzi* (Figura 14). Los estudios se realizaron usando alanina o glutamato como dadores de grupos aminos.

Si bien las velocidades máximas para ambos aminoácidos no mostraron diferencias significativas ($6,98 \pm 0,70$ y $7,97 \pm 0,80$ nmoles de ALA por hora por mg de proteína, para alanina y glutamato, respectivamente), la afinidad por ellos sí fue significativamente diferente. La afinidad de la enzima por el glutamato fue mayor (aproximadamente el doble) que para la alanina. El valor de K_m para la alanina fue de $62,2 \pm 6,3$ mM, mientras que para el glutamato fue de $32,4 \pm 3,3$ mM.

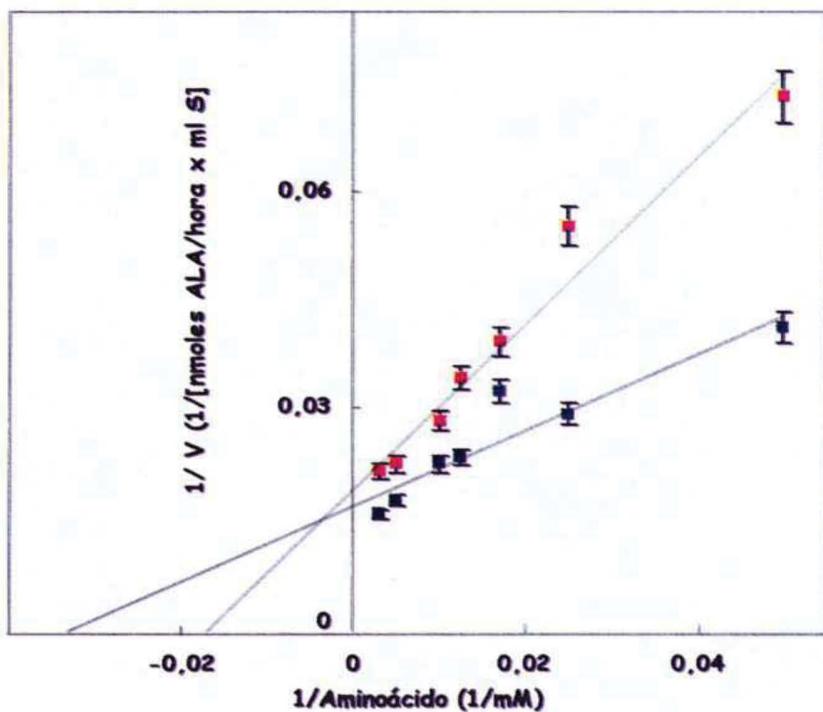


FIGURA 14: Actividad de DOVA-T de *T.cruzi* en presencia de distintas concentraciones de alanina (■) o glutamato (■). Se midió actividad de DOVA-T en *T.cruzi* (7-8 mg de proteína por ml), de la forma descripta en Materiales y Métodos, utilizando, para los aminoácidos concentraciones de 20 a 300 mM y para el DOVA, una concentración fija de 2.37 mM.

Para los siguientes ensayos se utilizó glutamato como dador de grupos aminos, manteniendo fija su concentración y variando la cantidad de DOVA suministrado a la enzima (Figura 15).

La velocidad máxima para el DOVA, fue de 15.8 ± 1.6 nmoles de ALA por hora por mg de proteína y su K_m , fue de 4.01 ± 0.40 mM.

El valor de K_m obtenido para el DOVA fue demasiado alto, esto se puede deber a que: 1) la enzima se encuentra inhibida y en consecuencia estamos obteniendo un K_m aparente, o 2) puede tratarse de alguna transaminasa inespecífica que puede catalizar la transformación de DOVA a ALA, pero cuya afinidad por el DOVA es muy baja.

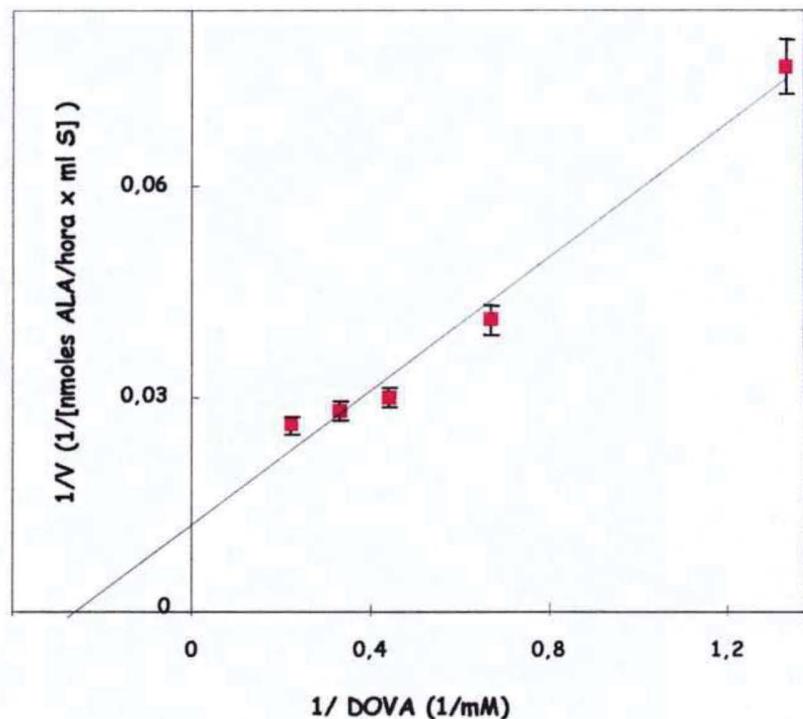


FIGURA 15: Actividad de DOVA-T en *T.cruzi*, en presencia de distintas concentraciones de DOVA. Se midió actividad de DOVA-T en el sobrenadante de *T.cruzi* (5-6 mg de proteínas por ml) de la forma descripta en Materiales y Métodos. Se mantuvo fija la concentración de glutamato en 167 mM mientras que se varió la concentración de DOVA entre 0,75 y 4,5 mM.

5- CONCLUSIONES.

El *Trypanosoma cruzi* excreta al medio extracelular gran cantidad de los dos precursores involucrados en la síntesis de porfirinas, ALA y PBG (Tabla 1). Por lo tanto la falla en el camino biosintético del hemo ocurre a un nivel posterior a la síntesis de estos precursores. La acumulación de ALA nos condujo a estudiar las actividades enzimáticas, en el sobrenadante **S**, de las dos enzimas alternativas involucradas en la síntesis de este precursor, ALA-S y DOVA-T.

Los experimentos llevados a cabo para determinar actividad de ALA-S en *T.cruzi*, mostraron no sólo que el parásito no posee esta actividad (Tabla 2) sino que, adicionalmente, su extracto enzimático inhibe la actividad de ALA-S de otras fuentes experimentales (Figura 11). Teniendo en cuenta que las determinaciones se realizaron en condiciones de saturación con Suc.CoA y glicina, podemos decir que el efecto inhibitorio observado en el sobrenadante **S**, no es ejercido a través de un metabolito que compita con los sustratos. No se trataría de un inhibidor competitivo.

En cuanto a la caracterización e identidad del inhibidor: **1)** no se trataría de un metabolito que se forma durante el proceso de incubación ya que la actividad inhibitoria se observa desde el principio (Figura 12); **2)** es inestable al calor, no proteico y de bajo peso molecular (Figura 13); **3)** no se trataría de una inhibición por producto, ya que no se encontró ALA endógeno, ni siquiera en la concentración mínima necesaria para que se produzca un 20% de inhibición (0,025 mM); **4)** Tampoco se trataría de inhibición por producto final, ya que no se encontró hemo endógeno (Tabla 1) y el hemo residual que queda en el medio de crecimiento luego de su esterilización (2,9 μ M), no es suficiente para producir dicha inhibición (la concentración mínima para que haya inhibición por hemo es de 10 μ M) (Tabla 3) y **5)** no se trataría de un metabolito relacionado con las trisulfocistinas. La comparación de la actividad rodenasa en *T.cruzi* con la de otras fuentes ya reportadas, nos permitiría descartar, en principio, la posibilidad de la existencia de este mecanismo de control de la actividad ALA-S en el parásito.

Respecto a la ruta **B** de síntesis de ALA, se encontró actividad de DOVA-T (Tabla 2). Los estudios cinéticos realizados sobre esta última enzima (Figuras 14 y 15) mostraron que: 1) la DOVA-T de *T.cruzi* posee mayor afinidad

por el glutamato que por la alanina, como dador de grupos aminos; 2) las afinidades para ambos aminoácidos fueron muy bajas, coincidiendo con los resultados reportados para otras fuentes experimentales; 3) las velocidades máximas para cada aminoácido no mostraron diferencias significativas y 4) la afinidad por el otro sustrato, el DOVA, fue muy baja, lo que nos lleva a suponer la presencia de algún inhibidor en el sobrenadante de *T.cruzi*, por lo que estaríamos midiendo un Km aparente, o que en realidad se trate de alguna transaminasa inespecífica, que realiza la reacción de transaminación pero que posee baja afinidad por el cetoácido.

En caso de que se trate de un inhibidor de la actividad de la DOVA-T, estudios cinéticos posteriores nos permitirán caracterizar el tipo de inhibición de la que se trata.



Dra. Lombardo M.E.



Dra. Araujo L.S.

6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- * Anosike, E.O. & Jack A.S. Kidney rhodanese from the guinea pig (*Lepus caniculus*) and albino rat (*Mus musculus*)_(1982). *Enzyme.* 27(1), 33.
- * Araujo, L.S; Lombardo, M.E; Rossetti, M.V. & Batlle A.M. del C. **Modelo experimental de porfiria en una mutante hemo-deficiente de *Saccharomyces cerevisiae***_(1989). *An. Asoc. Quím. Argent.* 77, 57.
- * Bajkowski, A. & Friedman, H.C. δ -aminolevulinic acid formation. **Purification and properties of alanine: 4,5-dioxovalerate aminotransferase and isolation of 4,5-dioxovalerate from *Clostridium tetanomorphum*** (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 2207.
- * Batlle, A.M.del C. **Porfirias y porfirinas. Aspectos clínicos, bioquímicos y de biología molecular** (1997). *Acta Bioquím.Clin.Latinoam.* Suplemento B. (Ed Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires).
- * Batlle, A.M. del C.; Magnin, P.H. & Wider, E.A. (1981) en *Porfirinas y Porfirias. Etiopatogenia, Clínica y Tratamiento, Cap. IV*, p.59. Ed. Universitaria de Bs.As.
- * Batlle, A.M. del C.; Magnin, P.H. & Wider, E.A. (1981) en *Porfirinas y Porfirias. Etiopatogenia, Clínica y Tratamiento, Cap. V*, p. 71. Ed. Universitaria de Bs. As.
- * Beale, S.I. & Castelfranco, P.A. ^{14}C -incorporation from exogeneous compounds into 5-aminolevulinic acid by greening cucumber cotyledons (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52, 143.
- * Beale, S.I. & Castelfranco, P.A. **The biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in higher plantas** (1974). *Plant Physiol.* 53, 297.
- * Ben Amar, M.F.; Pays, A.; Tebabi, P.; Dero, B.& Seebeck, T. **Structure and transcription of the actin gene of *Trypanosoma brucei***_(1988). *Mol. Cell. Biol.* 8, 2166.
- * Benne, R. **RNA editing in trypanosomes** (1994). *Eur. J. Biochem.* 221, 9.
- * Bottomley, S.S. & Smithee, G.A. **Characterization and measurement of δ -aminolaevulinate synthetase in bone marrow cell mitochondria**_(1968). *Biochim. Biophys. Acta* 159, 27.

- Brack, C. **Electron microscopic studies on the life cycle of *Trypanosoma cruzi* with special reference to developmental forms in the vector *rhodnius prolixus*** (1968). *Acta Trop.* 25 (4), 289.
- Brener, Z. **Biology of *Trypanosoma cruzi*** (1973). *Annu. Rev. Microbiol.* 27, 347.
- Brener, Z. & Alvarenga, N. **New Approaches in American Trypanosomiasis**, *Pan American Health Organization*, (1976). Washington, D.C. p. 83.
- Brumm, P.J.; Thomas, G.A. & Friedmann, H.C. **The role of 4,5-dioxovaleric acid porphyrin and vitamin B₁₂ formation by clostridia** (1982). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 814.
- Bruzik, J.P. & Steitz, J.A. **Splice leader RNA sequences can substitute for the essential 5' end of U1 RNA during splicing in a mammalian *in vitro* system** (1990). *Cell* 62, 889.
- Burnham, B. & Lascelles, J. **Control of porphyrin biosynthesis through a negative-feedback mechanism** (1963). *Biochem J.* 87, 462.
- Cable E.E.; Gildemeister O.S.; Pepe J.A.; Donohue S.E.; Lambrecht R.W. & Bonkovsky H.L. **Hepatic 5-aminolevulinic acid synthase mRNA stability is modulated by inhibitors of heme biosynthesis and metalloporphyrins** (1996). *Eur. J. Biochem.* 240, 112.
- Cable E.E.; Pepe J.A.; Karamitsios N.C.; Lambrecht R.W. & Bonkovsky H.L. **Differential effects of metalloporphyrins on messenger RNA levels of delta-aminolevulinate synthase and heme oxygenase. Studies in cultured chick embryo liver cells** (1994). *J. Clin. Invest.* 94, 649.
- Camargo, E.P. (1979) en Tesis de Libre Docencia, Instituto de Química de la USP, Brasil.
- Chang, C.S. & Chang, K.P. **Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*** (1985). *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 267.
- Chang, K.P. Chang, C. & Sassa S. **Heme biosynthesis in bacterium protozoan symbiosis: Enzymic defects in host hemoflagellates and**

- complemental role of their intracellular symbionts** (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 2479.
- De Matteis, F. **Disturbances of liver porphyrin metabolism caused by drugs** (1967). *Pharmac. Rev.* 19, 523.
- De Souza, W.; Meza, I.; Martínez Palomo, A.; Sabanero, H.; Souto-Padrón, T. & Meirelles, M.N. **Trypanosoma cruzi distribution of fluorescently labeled tubulin and actin in epimastigotes** (1983). *J. Parasitol.* 69, 138.
- Foley, T & Beale, S. **δ -Aminolevulinic acid formation from, δ -dioxovaleric acid in extracts of *Euglena gracilis*.** (1982). *Plant. Physiol.* 70, 1495.
- Galbraith, R.A. & McElrath, M.J. **Heme binding to *Leishmania mexicana amazonensis*** (1988). *Mol. Biochem. Parasitol.* 29, 47.
- Gassman, M.; Pluscec, J. & Bogorad, L. **δ -aminolevulinic acid transaminase in *Chlorella vulgaris*** (1968). *Plant Physiol.* 43, 1411.
- Gaugham P.L.Z. & Krassner S.H. **Hemin deprivation in culture stages of the hemoflagellate, *Lieshmania tarentolae*** (1971). *Comp. Biochem. Physiol.* 39B, 5.
- Gerez de Burgos, N.M.; Burgos, C.; Blanco, A; Paulone, I. & Segura, E.L. **Actividad alfa-hidroxiácido-dehidrogenasa en *Trypanosoma cruzi*** (1976). *Acta Physiol. Latinoam.* 26, 10.
- Gibson, K.D.; Mattew, M.; Neuberger, A. & Tait, G.H. **Biosynthesis of porphyrins and chlorophylls** (1961). *Nature* 192, 204.
- Granick, S. **Enzymatic conversion of delta-aminolevulinic acid to porphobilinogen** (1954). *Science* 120, 1105.
- Hayashi, N.; Watanabe, N. & Kikuchi, G. **Inhibition by hemin of in vitro translocation of chicken liver δ -aminolevulinate synthase into mitochondria** (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 700.
- Hayashi, N.; Yoda, B. & Kikuchi, G. **Mechanism of allylisopropyl-acetamide-induce increase of δ -aminolevulinate synthetase in liver mitochondria: IV. Accumulation of the enzyme in the soluble fraction of rat liver** (1969). *Arch.Biochem.Biophys.* 131, 83.

- Hoare, K. & Datta, K. Characteristics of L-Alanine:4,5-dioxovaleric acid transaminase: An alternate pathway of heme biosynthesis in yeast (1990). *Arch.Biochem.Biophys.* 277, 122.
- Instituto Nacional de Chagas "Dr. Mario Fatala Chabén". *Enfermedad de Chagas y otras parasitosis. Manual del técnico de laboratorio* (1994). Parte I, primera edición.
- Jerzykowski, T.; Winter, R. & Matuszewski, W. 4,5-dioxovalerate as a substrate for the glyoxylase system (1973). *Biochem. J.* 135, 713.
- Kah, A.; Dornemann, D. & Senger, H. Isolation and purification to apparent homogeneity of 4,5-dioxovalerate aminotransferase from *Scenedesmus obliquus* mutant C-2A' (1988). *Z. Naturforsch.*, 43c, 563.
- Kikuchi, G.; Kumas, A.; Talmage, P. & Shemin, D. The enzymatic synthesis of δ -aminolevulinic acid (1958). *J. Biol. Chem.* 233, 1214.
- Kipe-Nolt, J.A. & Stevens Jr., E.S. Biosynthesis of δ -aminolevulinic acid from glutamate in *Agmenellum quadruplicatum* (1980). *Plant Physiol.* 65, 126.
- Kitchin K.T. Regulation of rat hepatic delta-aminolevulinic acid synthetase and heme oxygenase activities: evidence for control by heme and against mediation by prosthetic iron (1983). *Int. J. Biochem.* 15, 479.
- Klein, O. & Senger, H. Two biosynthesis pathways to δ -aminolevulinic acid in a pigment mutant of the green alga, *Scenedesmus obliquus* (1978). *Plant Physiol.* 62, 10.
- Lascelles, J. The synthesis of enzymes concerned in bacteriochlorophyll formation in growing cultures of *Rhodopseudomonas sphaeroides* (1960). *J. Gen. Microbiol.* 23, 487.
- Lascelles, J. **Tetrapyrroles Biosynthesis and its Regulation** (1964). Benjamin, New York, p.84.
- Levine, N.D.; Corliss, J.O.; Cox, F.E.; Deroux, G.; Grain, J.; Honigberg, B.M.; Leedale, G.F.; Loeblich, A.R.; Lom, J.; Lynn, D.; Merinfeld, E.G.; Page, F.C.; Poljansky, G.; Sprague, V.; Vavra, J. & Wallace, F.G. A newly revised classification of the protozoa (1980). *J. Protozool.* 27, 37.

- Lohr, J.B. & Friedman, H.C. **New pathway for delta-aminolevulinic acid biosynthesis: formation from alpha-ketoglutarate acid by two partially purified plant enzymes** (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 908.
- Lombardo M.; Araujo, L. & Batlle, A.M del C. **Kinetic studies on the glutamate:glyoxylate transaminase of *Euglena gracilis*** (1996). *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 36, 241.
- Lombardo, M.; Araujo, L.; Juknat, A. & Batlle, A.M del C. **Effect of illumination on growth, chlorophyll content and δ-aminolevulinic acid synthesis in *Euglena gracilis*** (1988). *Comp.Biochem.Physiol.*, 91B, 279.
- Lombardo, M.E.; Araujo, L.S.; Juknat, A.A. & Batlle, A.M. del C. **Glutamate:4,5-dioxovaleric acid transaminase from *Euglena gracilis*** (1989). *Eur. J. Biochem.* 182, 657.
- Lowry, O.H; Rosebrough, N.J; Farr, A.A. & Randall R.J. **Protein measurement with Folin phenol reagent** (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- Lwoff M. **The nutrition of parasitic flagellates (Trypanosomidae, Trichomonadinae)** (1951). En *Biochemistry and Physiology of Protozoa* (Ed. Lwoff A.) Academic Press, New York, Vol. I, p. 131.
- Manetas, Y. & Akoyunoglu, G. **The stoichiometric relationship between δ-aminolevulinic acid and protochlorophyllide** (1975). *Plant Sci. Lett.* 5, 375.
- Marks, G.S. **The biosynthesis of heme and chlorophyll** (1966). *Bot. Rev.* 32, 56.
- Marks, G.S.; MacCluskey, S.A.; Mackie, J.E.; Riddick, D.S. & James, C.A. **Disruption of hepatic heme biosynthesis after interaction of xenobiotics with cytochrome P-450** (1988). *FASEB J.* 2, 2774.
- Marver, H.S. **Microsomes and Drug Oxidation** (1969). Academic Press, New York, p.495.
- Marver, H.S.; Tschudy, D.P.; Perlroth, M.G. & Collins, A. **Beta-aminolevulinic acid synthetase. I. Studies in rat liver homogenates** (1966). *J.Biol.Chem.* 241, 2803.

- ② Mauzerall, D. & Granick, S. The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine (1956). *J. Biol. Chem.* 219, 435.
- ③ Meyer, H. & de Oliveira, M. X. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures: A four-year study (1948) *Parasitology* 39, 91.
- ④ Meyer, H. & De Souza, W. Electron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* periplast in tissue cultures. I. Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms of the parasite's life cycle (1976). *J. Protozool.* 23, 385.
- ⑤ Moore, D.L. & Labbe, R.F. Assays for ALA and PBG determination (1964). *Clin. Chem.* 10, 1105.
- ⑥ Mundim M.H. & Roitman I. Extra nutritional requirements of artificially aposymbiotic *Critchidia deanei* (1977). *J. Protozool.* 24, 329.
- ⑦ Nakakuki, M.; Yamauchi, K.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. Purification and some properties of delta-aminolevulinate synthase from the rat liver cytosol fraction and immunochemical identity of the cytosolic enzyme and the mitochondrial enzyme (1980). *J. Biol. Chem.* 225, 1738.
- ⑧ Navone N.M., Vázquez E.S., Polo C.F. & Batlle A.M.del C. Rhodanese and ALA-S in mammary tumor and liver from normal and tumor-bearing mice (1992). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.00B, 102, 83.
- ⑨ Nemeth, A.M.; Russell, C.S. & Shemin, D. The succinate-glycine cycle II. Metabolism of δ -aminolevulinic acid (1958). *J. Biol. Chem.*, 229, 415.
- ⑩ Neuberger, A. The regulation of chlorophyll and porphyrin biosynthesis (1980). *Int. J. Biochem.* 12, 787.
- ⑪ Neuberger, A. & Turner, J.M. γ,δ -dioxovalerate aminotransferase activity in *Rhodopseudomonas sphaeroides* (1963). *Biochim. Biophys. Acta* 67, 342.
- ⑫ Noguchi, T. & Mori, R. Biosynthesis of porphyrins precursors in mammals. Identity of alanine: γ,δ -dioxovalerate aminotransferase with alanine: glyoxylate aminotransferase (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 10335.

- * Porra, R.J.; Barnes, R. & Jones, O.I.G. **The level and subcellular distribution of δ -aminolaevulinate synthase activity in semianaerobic and anaerobic yeast** (1963). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 1365.
- * Ramaswamy, N.K. & Nair, P.N. **δ -Aminolevulinic acid synthetase from cold-stored potatoes** (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 293, 269.
- * Rimington, C. **Spectral absorption coefficients of some porphyrins in the Soret band region** (1960). *Biochem. J.* 75, 620.
- * Rimington, C. & Sveinsson, S. **The spectrophotometric determination of uroporphyrin** (1950). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2, 209.
- * Roitman C.; Roitman I. & Azevedo H.P. **Growth of an insect trypanosomatid at 37 ° C in a defined medium** (1972). *J. Protozool.* 19, 346.
- * Sagar, R.; Datta, K.; Salotra, P. & Bhatnagar, R. **L-alanine: 4,5-dioxovalerate transaminase in *Leishmania donovani* that differs from mammalian enzyme** (1995). *Microbiol. Res.* 150, 419.
- * Sagar, R.; Salotra, P.; Bhatnagar, R. & Datta, K. **L-alanine:4,5-dioxovalerate transaminase in *Leishmania donovani* that differs from mammalian enzyme** (1995). *Microbiol. Res.*, 150(4), 419.
- * Salzman T.A.; Batlle A.M. del C.; Angluster J. & De Souza W. **Heme synthesis in *Cryptosporidium deanei*: influence of the endosymbionte** (1985). *Int. J. Biochem.* 17, 1343.
- * Salzman T.A.; Batlle A.M. del C. & De Souza W. **Heme synthesis in *Trypanosoma cruzi*: influence of the strain and culture medium** (1986). *Comp. Biochem. Physiol.* 83B, 57.
- * Salzman T.A.; Stella A.M.; Wider de Xifra E.A.; Batlle A.M. del C.; Docampo R. & Stoppani A.O.M. **Porphyry biosynthesis in parasitic hemoflagellates: functional and defective enzymes in *Trypanosoma cruzi*** (1982). *Comp. Biochem. Physiol.* 72B, 663.
- * Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Batlle, A.M. del C.; Kivilevich, A. & Grinstein, M. **Studies on cow liver porphobilinogen deaminase** (1976). *Acta Physiol. Latinoam.* 26, 147.

- Sassa, S. & Granick, S. **Induction of δ -aminolevulinic acid synthetase in chick embryo liver cells culture** (1970). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 67, 517.
- Segura, E.L.; Subias, E.; Esteva, M.; Cabeza Meckert, P.; Bronzina, A. & Laguens, R.P. **Características de infectividad de tres poblaciones de cultivo de *Trypanosoma cruzi*** (1980). *Medicina*, Buenos Aires 40 (Suppl.1) 97.
- Shemin, D. & Bray, R.C. **The biosynthesis of the corrin structure of vitamin B12** (1964). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 112, 165.
- Shemin, D. & Russell, C.S. **δ -aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines** (1953). *J. Am. Chem. Soc.* 75, 4873.
- Srivastava, G.; Borthwick, I.A.; Brooker, J.D.; May, B.K. & Elliott, W.H. **Evidence for a cytosolic precursor of chick embryo liver mitochondrial delta-aminolevulinate synthase** (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110, 23.
- Srivastava, G; Borthwick, I.A.; Brooker, J.D.; May, B.K. & Elliott, W.H. **Hemin inhibits transfer of pre-delta-aminolevulinate synthase into chick embryo liver mitochondria** (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 344.
- Srivastava, G.; Borthwick, I.A.; Maguirre, D.J.; Elferink, J.; Bawden, M.J.; Mercor, J.F. & May, B.K. **Regulation of 5-aminolevulinate synthase mRNA in different rat tissues** (1988). *Biol. Chem.* 263, 5202.
- Srivastava, P.; Pandey, V.C.; Sharma, G.D.; Kamboj, K.K.; & Rastogi, A.K. **Heme metabolism in promastigotes of *Leishmania donovani*** (1997). *Mol. Cell Biochem.* 171, 65.
- Srivastava, P.; Sharma, G.; Kamboj, K.; Rastogi, A. & Pandey, V. **Heme metabolism in promastigotes of *Leishmania donovani*** (1997). *Mol. Cell Biochem.* 171, 265.
- Tabita, R.; Silver, M. & Lundgren D.G. **The rhodanese enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*)** (1969). *Can. J. Biochem.* Vol. 47, 1141.

- Troxler, R.F. & Lester, R. **Biosynthesis of phycocyanobilin** (1967). *Biochemistry* 6, 3840.
- Tuboi, S.; Kim H.J. & Kikuchi G. **Ocurrence and porperties of two types of δ -aminolevulinate synthetase in *Rhodopseudomonas sphaeroides*** (1970). *Arch. Biochem. Biophys.* 138, 147.
- Vanhamme, L. & Pays, E. **Control of gene expression in Trypanosomes** (1995). *Microbiol. Rev.* 59, 223.
- Varticovski, L.; Kushner, J.P. & Burnham, B.F. **Biosynthesis of porphyrin precursors: Purification and characterization of mammalian L-alanine γ,δ -dioxovaleric acid aminotransferase** (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 3742.
- Vázquez, E.S.; Buzaleh, A.M; Wider, E. & Batlle, A.M. del C. **Reduced thiosulphate affinity for erythrocyte rhodanese: an explanation for increased δ -aminolevulinic synthetase activity in some porphyrias?** (1986). *IRCS, Med.Sci.* 14, 999.
- Vázquez, E.; Buzaleh, A.M.; Wider, E. & Batlle, A.M. del C. **Soluble and immobilized *Rp.palustris* rhodanese II. Some particular kinetic behaviour** (1987). *Int. J. Biochem.* 19, 1199.
- Vázquez, E.; Wider de Xifra, E. & Batlle, A. **Porphyrin biosynthesis in the soybean callus tissue system-XVII levels of succinyl CoA synthetase, cystathionease, rhodanese, aminolevulinate synthetase and aminolevulinate dehydratase in clones of different age** (1980). *Int. J. Biochem.* 12, 721.
- Viale, A.; Wider de Xifra, E. & Batlle, A. **Porphyrin biosynthesis in *Rhodopseudomonas palustris*-II. Evidence on the existnece of a factor regulating aminolevulinate synthetase activity** (1980). *Int. J. Biochem.* 12, 729.
- Viale, A.A; Wider E.A. & Batlle, A.M.del C. **Porphyrin biosynthesis in *Rhodopseudomonas palustris*-XI. Extraction and characterization of δ -aminolevulinate synthetase** (1987). *Comp.Biochem.Physiol.* 87B:607.
- Vickerman, K. & Preston, T.M. **Biology of Kinetoplastida** (Lumsden, W.H.R. and Evans, D.E. ; eds.), (1976). p. 35. Academic Press, New York.

- ② Wider de Xifra, E.A.; Batlle, A. & Tigier, H.A. **Delta aminolaevulinate synthetase in extracts of cultured soybean cells** (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 235, 511.
- ③ Wolfson, S.J.; Bartczak, A. & Bloomer, J.R. **Effect of endogenous heme generation on δ-aminolevulinic acid synthase activity in rat liver mitochondria** (1979). *J. Bio. Chem.* 254, 3543.
- ④ Woods, J.S. **Studies on the role of heme in the regulation of δ-aminolevulinic acid synthetase during fetal hepatic development** (1974). *Mol. Pharmacol.* 10, 380.
- ⑤ Yamamoto, M.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. **Translational inhibition by heme of the synthesis of hepatic delta-aminolevulinate synthase in a cell-free system** (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 225.
- ⑥ Yamanishi, T.; Kubota, I. & Tuboi, S. **Mechanism of the activation of δ-aminolevulinate synthetase in *Rhodopseudomonas sphaeroides* by rat liver mitochondrial fraction** (1983). *J. Biochem.* 94, 181.
- ⑦ Yamauchi, K.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. **Translocation of delta-aminolevulinate synthetase from the cytosol to the mitochondria and its regulation by hemin in the rat liver** (1980). *J. Biol. Chem.* 225, 1746.
- ⑧ Zaman, Z.; Jordan, P.M. & Akhtar, M. **Mechanism and stereochemistry of the 5-aminolaevulinate synthetase reaction** (1973). *Biochem. J.* 135, 257.
- ⑨ Zeledon, R.; Alvarenga, N.J. & Schosinsky, K. **Chagas Disease** (1977). *Pan American Health Organization*. Publ. N° 347, Washington, D.C.