

TED 2014

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIOSÍNTESIS DE PORFIRINAS EN PROTOZOARIOS

por:

TERESA ANA SALZMAN

DIRECTOR: Dra. Alcira María del C. Batlle

CONSEJERO: Dra. Alcira María del C. Batlle

LUGAR DE TRABAJO: Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP). Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Tesis presentada para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

TES 02014E1

1 9 8 6

*a José Carlos
a mis padres
a mi hermano*

INDICE

INDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
ABREVIATURAS	iii
OBJETIVOS	iv
TRABAJOS PUBLICADOS	vi
INTRODUCCION	1
I. BIOSINTESIS DEL HEMO	1
I.1. Tetrapirroles y compuestos relacionados	1
I.1.1. Estructura	2
I.1.2. Porfirinas	2
I.1.3. Metaloporfirinas	4
I.2. Bioquímica de los tetrapirroles	5
I.2.1. Porfobilinógeno y δ -aminolevúlico, intermediarios en la biosíntesis del hemo	5
I.2.2. Enzimas del camino de los tetrapirroles	6
I.2.2.1. Síntesis de Succinil CoA: Succinil CoA-Sintetasa	6
I.2.2.2. Síntesis de ácido δ -aminolevúlico	9
I.2.2.21. δ -Aminolevúlico-Sintetasa	9
I.2.2.22. Vía alternativa para la formación de ALA	10
I.2.2.3. Síntesis de PBG: ALA-Dehidrasa	12
I.2.2.4. Síntesis de Uroporfirinógeno: Porfobilinogenasa	13
I.2.2.5. Síntesis de Coproporfirinógeno: Uroporfirinógeno Decarboxilasa	17

	Página	
I.2.2.6.	Síntesis de protoporfirinó- geno: Coproporfirinogenasa	18
I.2.2.7.	Síntesis de protoporfirina: Protoporfirinógeno-Oxidasa	20
I.2.2.8.	Síntesis de hemo: Ferroquela- tasa	22
I.3.	Requerimiento de hemo por microorganismos	22
I.3.1.	Estudios nutricionales	22
I.3.2.	Actividades biosintéticas de hemo	25
I.3.3.	Estructura fina de tripanoso- mátidos: posible relación con la biosíntesis de hemo	25
II.	FERROQUELATASA	27
II.1.	Reacción	27
II.2.	Fuentes	27
II.3.	Formación no enzimática de hemo	28
II.4.	Localización. Efecto de los lípidos	29
II.5.	Efecto del oxígeno	30
II.6.	Requerimiento por cofactores (Fosfato de pi- ridoxal)	30
II.7.	Sustratos	31
II.8.	Purificación. Peso molecular	31
II.9.	Regulación de la actividad de Ferroquelatasa	33
II.10.	Inhibidores; DDC y griseofulvina	34
II.11.	Efecto de metales. Metalquelatasas	34
III.	LOS PARASITOS	38
III.1.	Clasificación	38
III.2.	Formas morfológicas	38
III.3.	Familia Trypanosomatidae	38
III.4.	Género <i>Crithidia</i>	39
III.5.	Género <i>Trypanosoma</i>	39

	Página
IV. <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
IV.1. Enfermedad de Chagas	44
IV.1.1. Consideraciones generales	44
IV.1.2. Distribución	45
IV.2. Biología celular	45
IV.2.1. Organismos. Formas desarrolladas	45
IV.2.2. Ciclo de vida	46
IV.2.3. Superficie celular	47
IV.2.3.1. Membrana plasmática	47
IV.2.3.2. Carga de superficie	48
IV.2.3.3. Cubierta celular	48
IV.2.3.4. Lisis del <i>Trypanosoma cruzi</i>	48
IV.2.4. Microtúbulos subpeliculares	49
IV.2.5. Flagelo y cuerpo basal	49
IV.2.6. Mitocondria-cinetoplasto	50
IV.2.7. Retículo endoplásmico, ribosomas y complejo de Golgi	50
IV.2.8. Núcleo	51
IV.2.9. Microcuerpos. Glicosomas	51
IV.3. Estudios bioquímicos	52
V. <i>Crithidia deanei</i>	57
V.1. Simbiosis intracelular	57
V.2. Endosimbiontes	57
V.3. <i>Crithidia deanei</i>	58
MATERIALES Y METODOS	61
I. Materiales y Métodos	61
I.1. Equipos utilizados	61
I.2. Reactivos	61
I.3. Fuentes enzimáticas	61
I.3.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	61
I.3.1.1. Cepas empleadas	61
I.3.1.2. Cultivo y crecimiento de <i>T. cruzi</i>	62

	Página
I.3.1.21. Medio LIT	62
I.3.1.22. Composición del medio LIT	62
I.3.1.23. Preparación del medio LIT	63
I.3.1.24. Preparación del medio Warren	63
I.3.1.24 a. Preparación del medio Warren (para el crecimiento de las cepas Y y CL de <i>T. cruzi</i>)	63
I.3.1.24 b. Medio Warren modificado (Cepa Tulahuén - Tulo, de <i>Trypano- soma cruzi</i>)	64
I.3.1.25. Crecimiento y mantenimiento de <i>T. cruzi</i>	64
I.3.1.3. Extracción de la proteína enzimática	67
I.3.1.31. Preparación del homogenato	67
I.3.1.32. Fraccionamiento subcelular	67
I.3.2. <i>Crithidia deanei</i>	68
I.3.2.1. Cepas empleadas	68
I.3.2.2. Cultivo y crecimiento del te- jido	68
I.3.2.21. Mantenimiento del tejido	68
I.3.2.22. Obtención de la masa de células	68
I.3.2.23. Conteo de los microorganismos	69
I.3.2.3. Extracción de la proteína enzi- mática	69
I.4. Determinación de los precursores ALA y PBG	69
I.5. Determinación de porfirinas	69
I.5.1. Libres	69
I.5.2. Esterificadas	70
I.6. Determinación de hemo-libre	72
I.7. Determinación de actividades enzimáticas	72
I.7.1. Suc.CoA-S	72
I.7.2. ALA-S	72
I.7.3. DOVA-T	73
I.7.4. ALA-D	73
I.7.5. PBG-asa	74
I.7.6. Hemo-S	75
I.8. Determinación de la concentración proteica	76

	Página
RESULTADOS	
I. BIOSINTESIS DE HEMO EN <i>T. cruzi</i>	77
I.1. Cepa Tulahuén	77
I.2. Influencia de la cepa	78
I.3. Influencia del medio de cultivo	85
II. BIOSINTESIS DE HEMO EN <i>Crithidia deanei</i> : INFLUENCIA DEL ENDOSIMBIONTE	91
III. HEMO-SINTETASA DE <i>T. cruzi</i>	94
III.1. Distribución subcelular	94
III.2. Estabilidad	95
III.3. Efecto del Tritón X-100	95
III.4. pH óptimo	96
III.5. Efecto de la concentración de proteína	97
III.6. Efecto de la concentración de sustrato porfirina	98
III.7. Efecto de algunos metales sobre la actividad	99
DISCUSION	107
I. BIOSINTESIS DE HEMO EN <i>T. cruzi</i> , cepa Tulahuén	107
II. BIOSINTESIS DE HEMO EN <i>T. cruzi</i> y <i>Crithidia deanei</i>	110
III. HEMO SINTETASA DE <i>T. cruzi</i>	117
REFERENCIAS	120
- INTRODUCCION	120
I.	120
II.	129
III.	132
IV.	133
V.	137

	Página
- MATERIALES Y METODOS	139
- RESULTADOS	140
- DISCUSION	141
RESUMEN	143
SUMMARY	146
RESUMO	149

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a la Dra. Alcira Batlle por la su pervisión de esta Tesis brindándome su apoyo, orientación y por haber hecho posible mi trabajo en el Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias que dirige.

Al Prof. Sidney Fleischer (Vanderbilt University-USA) por iniciarme generosamente en la Investigación Científica mediante su experiencia, conocimiento y comprensión.

A los Dres. Julio Turrens, Alberto Boveris (Facultad de Bioquímica, UBA) y Prof. A.O.M. Stoppani (CIBIERG - Facultad de Ciencias Médicas, UBA) por introducirme al estudio del *Trypanosoma cruzi*.

Al Dr. Roberto Docampo (Departamento de Microbiología - UFRJ, Brasil) por su gran apoyo a lo largo de todas las etapas del desarrollo de este trabajo, así como por el suministro conjuntamente con el Dr. A.O.M. Stoppani, de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*.

Al Dr. Wanderley De Souza (Departamento de Biofísica - UFRJ, Brasil) por haber permitido la realización de parte de las experiencias presentadas en su laboratorio, suministrando las cepas Y y CL de *T. cruzi*.

Al Dr. Jaime Angluster (Departamento de Microbiología - UFRJ, Brasil) por facilitarme las cepas de *Crithidia deanei* y por el interés y atención dispensados durante mi estadía en el Instituto de Biofísica.

A los Dres B.M. Franke de Cazzulo y J.J. Cazzulo (Instituto Fatala Chaben, Bs.As.) por facilitarme para algunas determinaciones previas las células de la cepa Y de *T. cruzi*.

Al Lic. Esteban Bontempi (Instituto Fatala Chaben, Bs. As.), al Lic. Gustavo E. Skalic y a las Dras. A.M. Stella y E. Wider por su colaboración en algunas experiencias preliminares.

A la Lic. E. Lombardo y Prof. Horst Senger por la síntesis de DOVA, al igual que a la Dra. Elba Vázquez por generosamente facilitarme la enzima Suc. CoA-S aislada de *Rp. spheroides*.

A la Lic. Ana María Buzaleh por la eficiencia en el trabajo dactilográfico.

Al Arq. Hugo E. Salzman, por su esmero y dedicación en

la realización de los dibujos brindándome muchas horas de su tiempo.

A la Organización Mundial de la Salud (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases) por las becas otorgadas.

A los Profesores, Becarios y Técnicos del Instituto de Biofísica, UFRJ - Brasil, por su apoyo, auxilio técnico y gentil acogida durante mi permanencia en el mismo.

A todos los integrantes del Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) y muy particularmente a aquellos que con su compañerismo y amistad hicieron saludable el ambiente de trabajo.

Deseo extender mi reconocimiento a todo el personal docente y no docente de la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA por su colaboración durante la elaboración y ejecución del presente trabajo.

Finalmente a José Carlos, por apoyar, colaborar y alentar en todo momento la concreción de este trabajo transitando juntos un camino de comprensión y amor.

ABREVIATURAS

Suc.	Succinato
CoA	Coenzima A
Suc.CoA-S	Succinil CoA Sintetasa
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
GTP	Guanosina trifosfato
ITP	Inosina trifosfato
ALA	Acido δ -Aminolevúlico
ALA-S	Acido δ -Aminolevúlico Sintetasa
DOVA	γ - δ -Dioxovalerato
DOVA-T	γ - δ -Dioxovalerato Transaminasa
ALA-D	Acido δ -Aminolevúlico Dehidrasa
PBG	Porfobilinógeno
PBG-asa	Porfobilinogenasa
Urogen	Uroporfirinógeno
URO-D	Decarboxilasa
Coprogen	Coproporfirinógeno
CPG-asa	Coprogenasa
Protogen	Protoporfirinógeno
PTG-asa	Protogenasa
Proto	Protoporfirina
Meso	Mesoporfirina
Deutero	Deuteroporfirina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
PO ₄ Pi	Fosfato de Piridoxal
PCMB	Paracloromercuribenzoato
NEMI	N-Etilmaleimida
EDTA	Acido etilen diamino tetraacético
DTT	Ditiotreitol
CySH	Cisteína
GSH	Glutati6n reducido
PDMA	Paradimetilaminobenzaldehído
Tris	Tri(hidroximetil)-aminometano
TCA	Acido Tricloroacético
DDC	3,5-Dietoxicarbonil-1,4-dihidro-2,4,6-trimetilpi- ridina

OBJETIVOS

Los estudios nutricionales llevados a cabo con miembros de la familia Trypanosomatidae han demostrado claramente que los compuestos del hemo, incluyendo hemina, hematina o hemoglobina, constituyen factores esenciales de crecimiento.

Es posible que este requerimiento nutricional sea debido a la incapacidad de los tripanosomátidos para llevar a cabo el proceso de biosíntesis del hemo.

Sin embargo, es llamativo que sea tan reducido el número de trabajos realizados con el objeto de lograr un mejor entendimiento de la biosíntesis de porfirinas en este importante grupo de protozoos parasíticos.

En consecuencia, consideramos de fundamental interés efectuar un estudio bioquímico del camino biosintético del hemo en *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas. La elucidación de su funcionalidad o defecto en este hemoflagelado, podría ser trascendente en el desarrollo de nuevos agentes tripanomicidas que, selectivamente bloquearan la formación o utilización de hemo por el parásito.

Nuestro objetivo inicial ha sido investigar las actividades de varias de las enzimas de este camino, así como el contenido de precursores y hemo, *in vitro*, bajo distintas condiciones experimentales, en la forma de cultivo epimastigote de *T. cruzi*.

La falta de este tipo de información en hemoflagelados, nos llevó a realizar un estudio comparativo de esta ruta biosintética en diferentes cepas de este mismo parásito (Y, CL y Tula-huén), debido precisamente a sus diferencias biológicas, patológicas e inmunológicas.

Además, consideramos interesante examinar la influencia de dos medios de cultivo, generalmente empleados para el desarrollo de *T. cruzi* (LIT y Warren) sobre esta misma vía biosintética.

En una etapa posterior decidimos extender nuestras investigaciones al campo de las interacciones simbiote-huésped, con el objeto de obtener información sobre la posible regulación del camino del hemo por parte de los endosimbiontes.

Como modelo experimental seleccionamos a *Crithidia deanei*, protozoo tripanosomátido flagelado, aislado del hemíptero

Zelus leucogramus, que se caracteriza por poseer simbioses intracelulares integrados con la fisiología de la célula huésped.

TRABAJOS PUBLICADOS

Los experimentos realizados en esta Tesis han sido publicados según se detalla:

1. Porphyrin biosynthesis in parasitic hemoflagellates: functional and defective enzymes in *Trypanosoma cruzi*.
T.A. Salzman, A.M. Stella, E.A. Wider de Xifra, A.M. del C. Batlle, R. Docampo y A.O.M. Stoppani.
Comp. Biochem. Physiol. (1982) 72 B, 663-667
2. Heme synthesis in *Crithidia deanei*: Influence of the endosymbionte.
T.A. Salzman, A.M. del C. Batlle, J. Angluster y W. De Souza
Int. J. Biochem. (1985) 17, 1343-1347
3. Heme synthesis in *Trypanosoma cruzi*: Influence of the strain and culture medium.
T.A. Salzman, A.M. del C. Batlle y W. De Souza
Comp. Biochem. Physiol. (1986) 83 B, 57-61
4. Heme synthetase in *Trypanosoma cruzi*.
T.A. Salzman y A.M. del C. Batlle
Comp. Biochem. Physiol. (1986) en prensa

INTRODUCCION

I. BIOSINTESIS DEL HEMO

I.1. TETRAPIRROLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS

Los tetrapirroles desempeñan un rol vital en el metabolismo celular por su función como grupo prostético de una gran variedad de hemoproteínas, incluyendo hemoglobina, mioglobina, citocromos, peroxidasas, catalasas, etc. Son compuestos importantes en el transporte de oxígeno, en la transferencia electrónica y en la generación de energía. Además, en algunas bacterias, el camino del hemo se deriva hacia la síntesis de las corrinas, vitamina B₁₂, y en los organismos fotosintéticos hacia la rama de clorofilas y bacterioclorofilas. Es decir, en la mayoría de las células vivientes, los dos principales pigmentos del protoplasma, el hemo y la clorofila, se originan a partir de la misma cadena biosintética hasta la etapa de protoporfirina IX (Proto IX) (Figura I.1.).

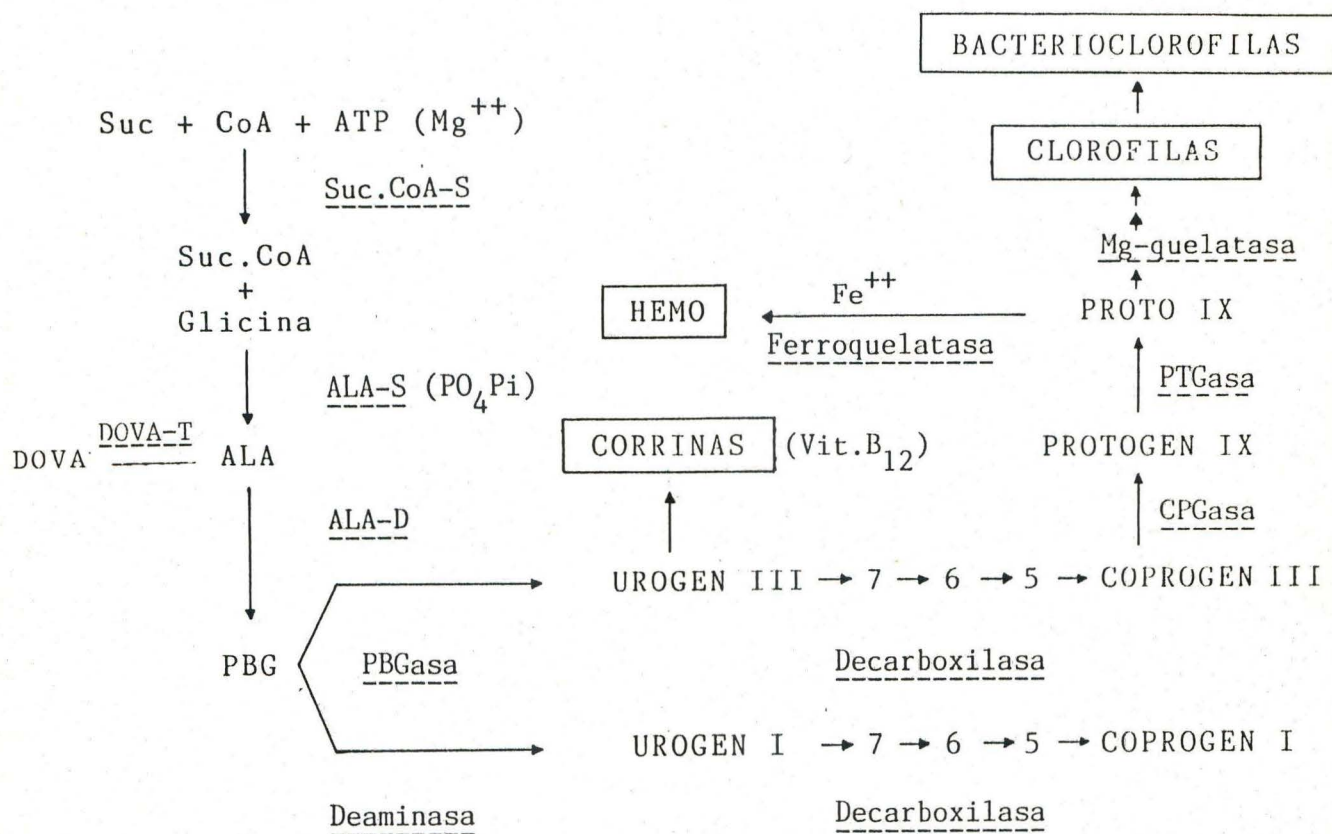


Figura I.1.: Diagrama de la biosíntesis de tetrapirroles

A partir de allí, dependiendo de cual fuere el producto final, hemos; clorofilas o bacterioclorofilas, se producen las ramificaciones correspondientes.

I.1.1. Estructura

Los tetrapirroles naturales o sintéticos derivan de dos núcleos básicos: PORFINA y CLORINA (Figura I.2.) que contienen cuatro anillos pirrólicos (A, B, C, D) unidos entre sí por medio de 4 puentes metenos (α , β , γ , δ). La diferencia entre la estructura de la porfina y la clorina consiste simplemente en la presencia del anillo D, reducido en la última.

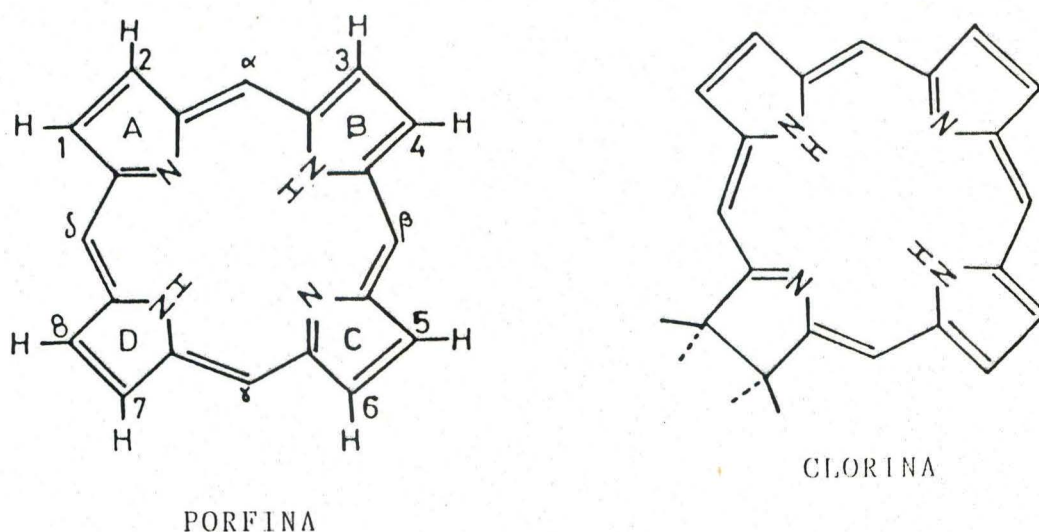
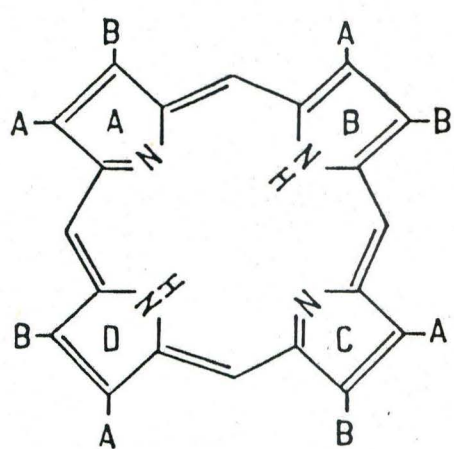


Figura I.2.: Estructura de la porfina y la clorina

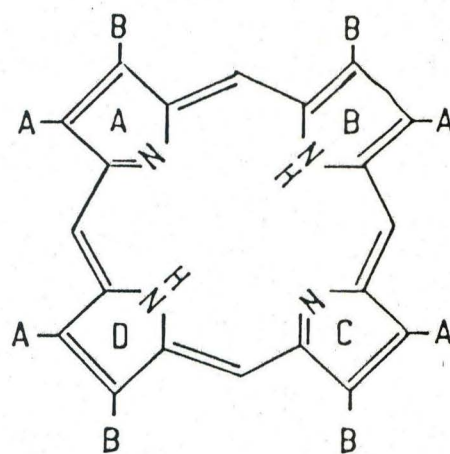
I.1.2. Porfirinas

Las porfirinas son derivados de los tetrapirroles libres de metales, que se diferencian estructuralmente según la naturaleza y el ordenamiento de las cadenas laterales que han sustituido las posiciones 1 a 8 de los anillos pirrólicos. En el caso de que el número de sustituyentes diferentes en cada uno de los 4 anillos pirrólicos de la porfina sea dos (A, B), pueden ocurrir 4 ordenamientos distintos de estos grupos que dan lugar a 4 isómeros de posición conocidos como tipos I, II, III y IV. En esta situación se encuentran la uroporfirina (A = CH₂COOH;

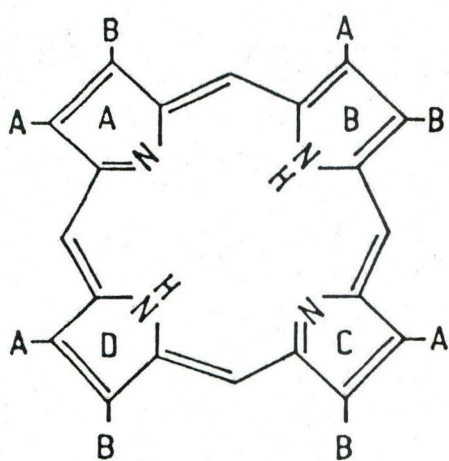
B= $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), la coproporfirina (A= $-\text{CH}_3$; B= $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) y la etioporfirina (A= $-\text{CH}_3$; B= $-\text{CH}_2\text{CH}_3$) (Figura I.3.). La situación es mucho más complicada en el caso de las proto y mesoporfirinas (Figura I.4.) en las cuales se encuentran tres sustituyentes distintos, dos grupos A y B en los anillos A y B y dos grupos A y C en los anillos C y D. Este ordenamiento da lugar a la posible existencia de 15 isómeros de posición. Fischer (1937) logró sintetizar químicamente los 15 isómeros de la protoporfirina. Sin embargo, en la naturaleza, hasta ahora, solamente se ha encontrado el designado como protoporfirina IX (Acido 1,3,5,8-tetrametil-2,4-vinilporfin-6,7-dipropiónico) ; que además proviene necesariamente de la serie isomérica III.



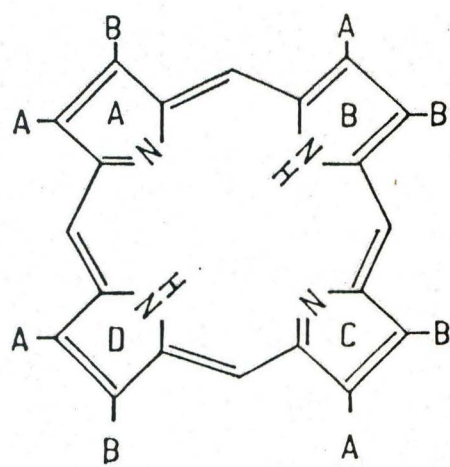
Tipo I



Tipo II



Tipo III



Tipo IV

Figura I.3.: Estructuras de los isómeros de las uro, copro y etioporfirinas.

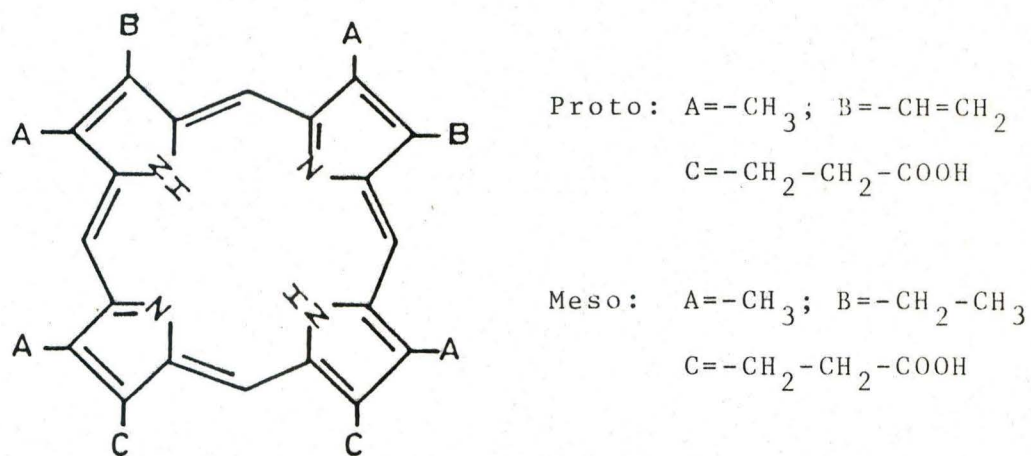


Figura I.4.: Representación esquemática de la estructura de la proto y mesoporfirina.

I.1.3. Metaloporfirinas

Se designa con el nombre genérico de hemos o hierro-porfirinas a los complejos de los tetrapirroles con el hierro. El más conocido es el proto-hemo o hierroprotoporfirina, en el cual el metal puede encontrarse en forma reducida, como en el hemo o ferro-protoporfirina o al estado oxidado como en la hemina o hematina o ferri-protoporfirina (Figura I.5.).

El hemo, que es el grupo prostético de hemoproteínas circulantes (ej: hemoglobina) y ligadas a membrana (ej: citocromos), se oxida fácilmente a hematina o a hemina, en contacto con el aire, si en el medio hay presentes iones cloruro.

La estructura del hemo es tal que, los 4 anillos pirrólicos y el hierro se ubican en un plano, pero el metal posee aún capacidad para unirse por medio de enlaces coordinados con dos moléculas que se ubican abajo y arriba del plano que contiene al anillo porfirínico; estos tipos de derivados se conocen como hemocromos o hemocromógenos. Se encuentran entre los compuestos capaces de formarlos, el peróxido de hidrógeno o agua oxigenada, el oxígeno, monóxido de carbono, iones cianuro y una gran variedad de bases nitrogenadas como la piridina y el amonio.

Se conocen como hemicromos o hemicromógenos, a comple-

jos similares originados a partir de la hematina.

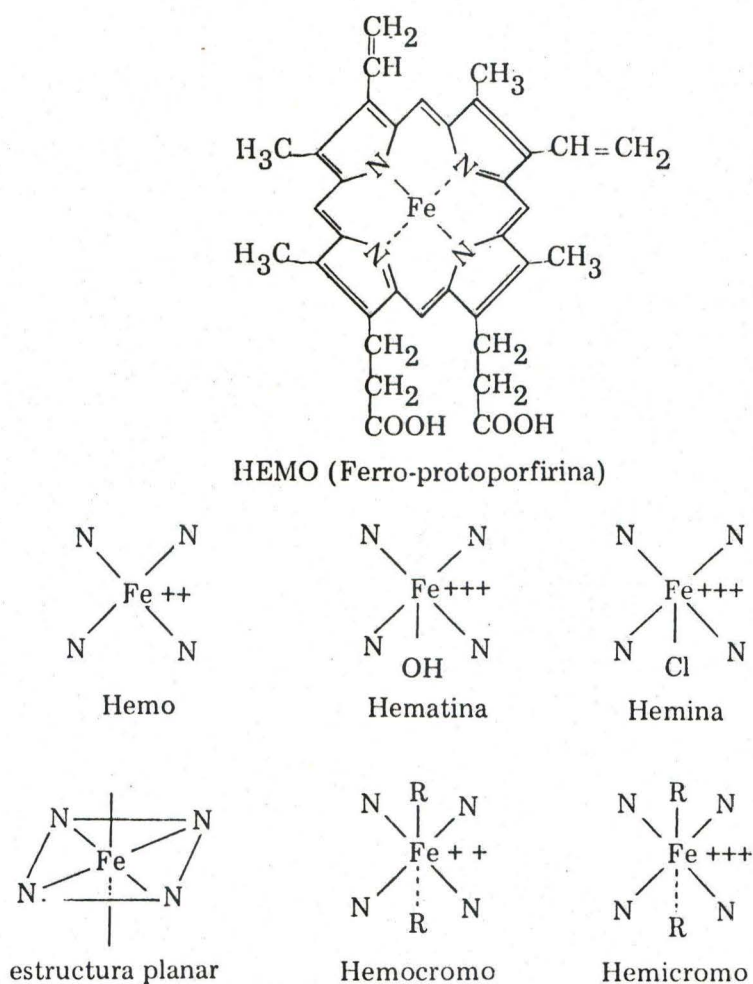


Figura I.5.: Estructura y nomenclatura de los isómeros de los complejos de hierro de la protoporfirina.

I.2. BIOQUIMICA DE LOS TETRAPIRROLES

I.2.1. Porfobilinógeno y δ -aminolevúlico, intermediarios en la biosíntesis del hemo

La demostración de que la protoporfirina IX derivaba de moléculas tan sencillas como la glicocola y el succinato (Shemin y Rittenberg, 1945) precedió precisamente al descubrimiento de que el porfobilinógeno (PBG) (Figura I.6.) era un precursor directo del hemo. Este último compuesto fue aislado, purificado y su estructura dilucidada por síntesis (Cookson y Rimington,

1953).

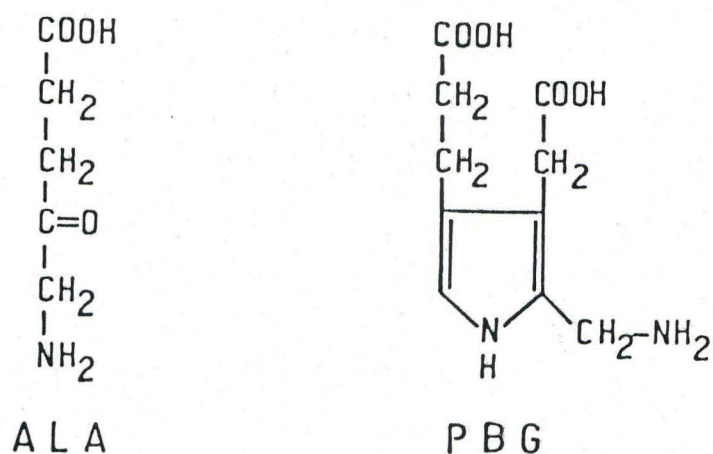


Figura I.6.: Estructura química del ácido δ -aminolevúlico (ALA) y del porfobilinógeno (PBG).

Falk y col. (1953), estudiando la conversión del PBG en uro, copro y protoporfirina por hemolizados de glóbulos rojos de aves, demostraron que se trataba de un precursor directo en este camino. En ese momento, surgieron una serie de especulaciones acerca de las etapas existentes entre glicocola y succinato y el PBG.

Shemin y Russel (1953) y Dresel y Falk (1953), establecieron la participación del ácido δ -aminolevúlico (ALA) como intermediario en el camino del hemo, al demostrar que podía reemplazar a la glicocola y al succinil-CoA en la síntesis de porfirinas. Simultáneamente Neuberger y Scott (1953) sintetizaron varios posibles derivados de la condensación de glicocola y succinil-CoA, entre ellos el ALA.

I.2.2. Enzimas del camino de los tetrapirroles

I.2.2.1. Síntesis de Succinil CoA: Succinil CoA-Sintetasa

La enzima Succinil CoA-Sintetasa (Suc.CoA-S), conocida también como Succinil CoA tioquinasa, cataliza reversiblemente la síntesis de succinil CoA, precursor del hemo, a partir de succinato, coenzima A y un nucleósido trifosfato (Figura I.7.).

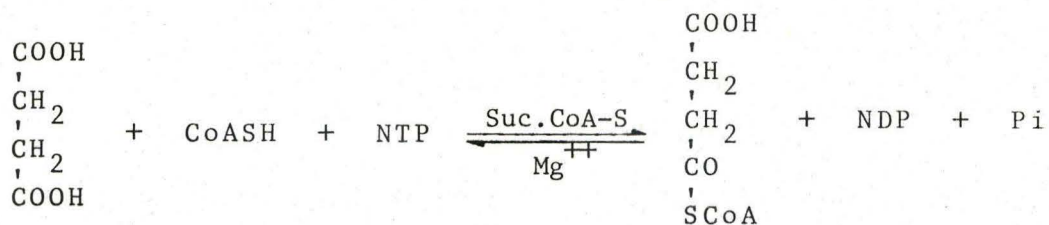


Figura I.7.: Síntesis de succinil CoA catalizada por la Succinil CoA-S

Numerosas evidencias experimentales han establecido que esta enzima, juega un papel importante en la biosíntesis de las porfirinas y está directamente involucrada en los mecanismos que la controlan (Labbe y col., 1965; Batlle y col., 1975).

El aislamiento y purificación de esta enzima se llevó a cabo a partir de diversas fuentes como corazón de cerdo, riñón, hojas de espinaca, leguminosas, trigo y tabaco, mitocondrias de alcaucil, callos de soya y *E. coli* (Nishimura y Grinnel, 1972; Wider de Xifra y Batlle, 1973).

En la mayoría de los tejidos la Suc.CoA-S es una enzima particulada, mitocondrial o cloroplástica.

Es altamente específica para el succinato y CoA, mientras que con respecto al nucleósido trifosfato, la especificidad varía según el origen de la proteína. La enzima de mamíferos puede emplear GTP o ITP (Cha y Park, 1964), mientras que en tejidos vegetales y bacterianos es específica para ATP (Nandi y Waygood, 1965; Wider de Xifra y Tigier, 1971).

La Suc.CoA-S requiere la presencia de un catión divalente (generalmente manganeso o magnesio) para expresar su máxima actividad.

Se comporta como una enzima sufhidrónica, siendo inhibida por p-cloromercuribenzoato (PCMB), iodobenzoato, iodoacetamida, glutatión oxidado y N-etilmaleimida (NEMI). El glutatión reducido (GSH) es necesario en algunos tejidos, como protector de grupos sufhidrilos, para lograr máxima actividad. Sin embargo, otros tioles como cisteína (CySH), tioglicolato y ditiotreitól (DTT) la inactivan (Wider de Xifra y Tigier, 1971).

Es una proteína oligomérica, constituida por dos o cua-

En la mayoría de los tejidos estudiados, el ALA-S se encuentra asociada a la fracción particulada, si bien se ha determinado que en hígado de rata la enzima se sintetiza en citoplasma y luego se transporta a la mitocondria (Oashi y Kikuchi, 1977). En levaduras, la actividad está presente tanto en la mitocondria como en el citoplasma (Labbe-Bois y Volland, 1977).

La Figura I.8. explica por ejemplo, los resultados obtenidos de diversas fuentes (Wintrobe, 1950; Shulman y Richert, 1957; Lascelles, 1964), pues indica que un bajo contenido de hemo puede deberse a la falta de las vitaminas, fosfato de piridoxal (PO_4Pi) (Lascelles, 1967) y CoA, que se requieren para este paso limitante de la biosíntesis de porfirinas.

Gibson y col. (1961) fueron los primeros en demostrar que el succinil CoA era uno de los sustratos específicos del ALA-S.

Los reactivos de grupos -SH tales como PCMB, cloruro mercurico y NEMI inhiben a la enzima purificada de *Rp. spheroides*, al igual que algunos iones metálicos como Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} y Fe^{3+} (Yubisui y Yoneyama, 1972). Estas inhibiciones son revertidas parcialmente por incubaciones de la enzima inhibida con 2-mercaptoetanol. Estos resultados sugieren la existencia de grupos sulfhidrilos esenciales en el ALA-S.

Es de suma importancia el hecho de que algunos metabolitos de la rama del hierro de la biosíntesis de tetrapirroles, tales como protohemo y hemina, inhiben el ALA-S (Gibson y col., 1961; Burnham y Lascelles, 1963), aunque esta inhibición se revierte fácilmente (Burnham, 1962).

Los posibles mecanismos de acción del ALA-S han sido extensamente estudiados (Akhtar y col., 1976). Se postula que hay un grupo sulfhidrilo en el sitio activo de la enzima, esencial para la iniciación de la reacción, que se une primero al PO_4Pi . La glicocola formaría una base de Schiff con el cofactor, como ocurre en todas las reacciones de aminoácidos en las cuales participa como tal el PO_4Pi . Sigue luego una condensación con el succinil CoA, formándose un intermediario inestable, el ácido γ -amino- β -cetoadípico, que se decarboxila, eliminándose así el grupo carboxilo de la glicocola como CO_2 y liberándose finalmente el ALA de la enzima.

tro subunidades según las fuentes.

El mecanismo de acción de la Suc.CoA-S es relativamente complejo; se han postulado varios esquemas, uno de los cuales ha sido propuesto por Wider y Batlle (1975).

I.2.2.2. Síntesis de ácido δ-aminolevúlico

I.2.2.2.1. δ-Aminolevúlico-Sintetasa

La enzima δ-Aminolevúlico-Sintetasa (ALA-S) cataliza la formación de ALA, a partir de glicocola y succinil CoA, primer etapa que conduce específicamente a la formación de porfirinas (Figura I.8.).

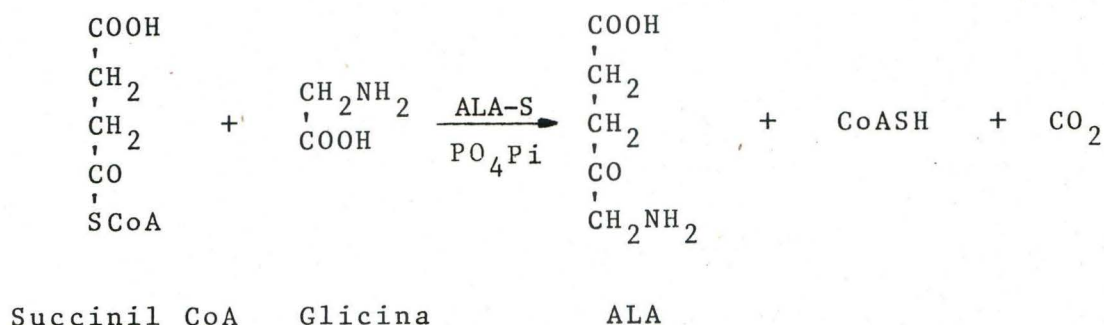


Figura I.8.: Síntesis del ácido δ-aminolevúlico catalizada por la enzima ALA-S

El ALA-S fue detectada por primera vez en extractos de bacterias fotosintéticas (Kikuchi y col., 1958 a) y de eritrocitos de ave (Gibson y col., 1958). A partir de entonces la enzima ha sido medida y estudiada en diversas fuentes como *Rhodospirillum rubrum* (Kikuchi y col., 1958 a y b; Burnham, 1970; Porra y col., 1972); *Rhodospirillum rubrum* (Kikuchi y col., 1958 a y b); eritrocitos de aves (Brown, 1958; Laver y col., 1958); mitocondrias de hígado de cobayo (Granick y Urata, 1963); homogenatos de hígado de rata (Marver y col., 1966; Tomio y Grinstein, 1968); corazón de rata (Brigs y col., 1976); reticulocitos de conejo (Aoki y col., 1971) y de humanos (Feldman y Lichtan, 1967); hígado, eritrocitos y fibroblastos humanos (Marver y col., 1972); plasma humano (Miyagi y Watson, 1972), mitocondrias de abeja obrera (Osanaí y Rembold, 1974).

I.2.2.22. Vía alternativa para la formación de ALA

A pesar de su supuesta ubicuidad, por tratarse de una enzima generalmente lábil una vez extraída de los tejidos y de vida media corta (Granick y Sassa, 1971), el ALA-S aún no ha podido detectarse en proplástidos, cloroplastos, ni en la fracción mitocondrial de plantas superiores (Porra e Irving, 1970).

Existen evidencias que la formación de ALA puede seguir una vía de síntesis alternativa diferente de la catalizada por el ALA-S.

Wider y col. (1971) detectaron por primera vez ALA-S en un sistema de origen vegetal. Ramaswamy y Nair (1973) también encontraron actividad de ALA-S en papas. Sin embargo, Beale y col. (1975) cuestionaron estos resultados, proponiendo en cambio que en plantas superiores operaba un camino diferente para la síntesis de ALA (Figura I.9.).

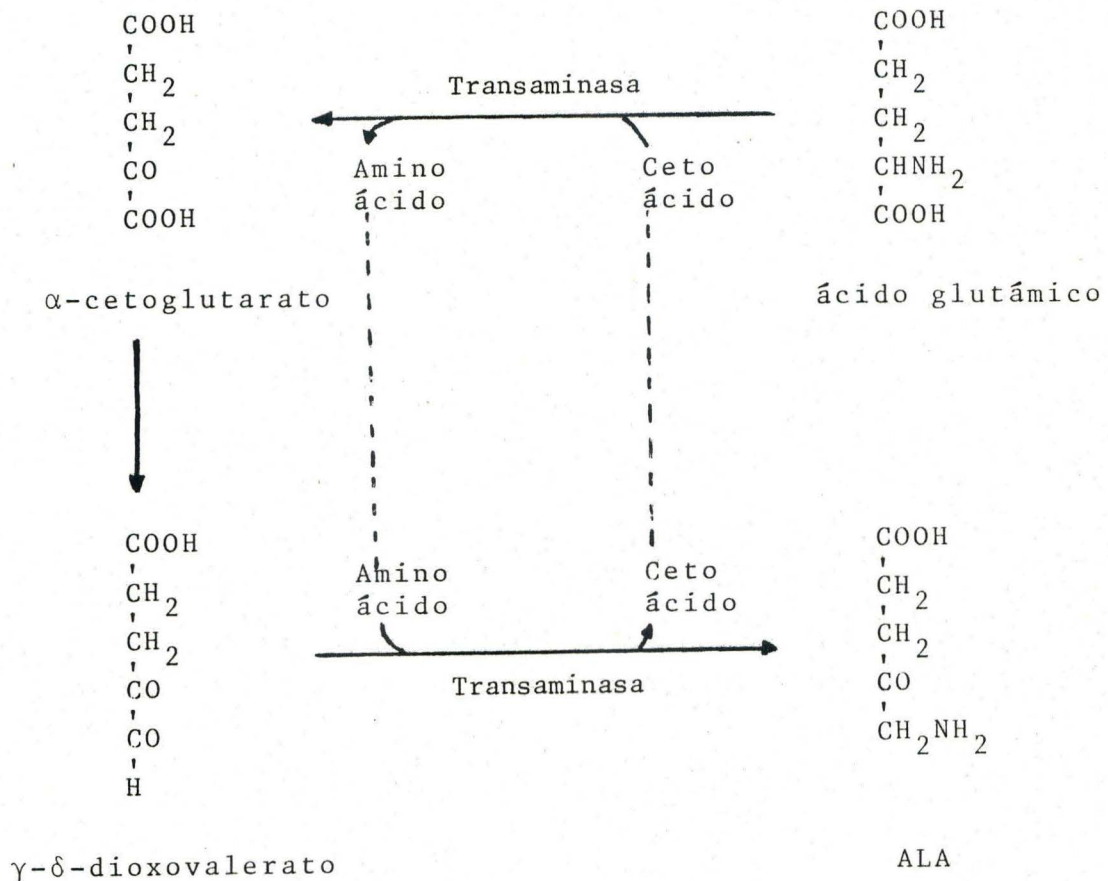


Figura I.9.: Camino biosintético propuesto para la formación de ALA en plantas superiores

Por esta vía el ALA se formaba a partir de glutamato, vía α -cetoglutarato y γ - δ -dioxovalerato (DOVA), por acción de las transaminasas, del glutamato y DOVA.

Sin embargo, trabajos posteriores han debilitado la su puesta exclusividad del camino del glutamato en plantas superiores y ha surgido que en vegetales y algas la conocida vía de la glicocola y succinil CoA puede predominar sobre la del glutamato, conduciendo ambas a la formación de clorofila (Klein y Senger, 1978 a y b; Beale, 1978; Dzelzkalns y col., 1982).

De todas maneras, se ha demostrado que el ALA también puede originarse, aún en animales (Varticovsky y col., 1980), bacterias no fotosintéticas y fotosintéticas (Gibson y col., 1961; Bajcowski y Friedman, 1982), algas verdes (Gassman y col., 1968; Kipe-Nolt y Stevens, 1980) incluyendo *Chlorella* (Foley y col., 1982) y *Euglena* (Salvador, 1978; Foley y Beale, 1982), a partir de DOVA por acción de la L-alanina-DOVA-aminotransferasa o DOVA-Transaminasa (DOVA-T). Además, en algunos tejidos, como mitocondrias de hígado bovino, se ha encontrado que la actividad de la DOVA-T es varias veces superior a la del ALA-S de igual origen. Se estableció en este mismo caso, una identidad entre la DOVA-T y la L-alanina-glioxalato aminotransferasa (Noguchi y Mori, 1981). Estos autores sugieren que debido a la similitud estructural del DOVA y glioxalato, es probable que el DOVA actúe únicamente como un sustrato artificial y que la transaminación del DOVA carezca de significado fisiológico. Por otro lado, Foley y Beale (1982), proponen que en *E. gracilis*, una o más especies de glioxalato-L-glutamato aminotransferasa catalizan la transaminación de DOVA: L-glutamato y que probablemente la transaminación del DOVA ocurriría exclusivamente *in vitro*, cuando DOVA es el único sustrato disponible, careciendo en consecuencia de importancia fisiológica *in vivo*, para la síntesis de ALA que provee precursores para clorofilas. Sin embargo, el mismo grupo de Beale, ha propuesto que en *Euglena gracilis* operarían simultáneamente el camino del ALA-S y el de la DOVA-T; el primero proporcionaría el ALA necesario para los hemos mitocondrial y de otros no plástidos, en tanto que el segundo formaría el ALA destinado a las clorofilas y estaría además compartimentalizado en los cloroplastos (Weinstein y Beale, 1983).

I.2.2.3. Síntesis de PBG: ALA-Dehidrasa

La δ -Aminolevúlico-Dehidrasa (ALA-D), también conocida como Porfobilinogeno Sintetasa, cataliza la ciclación de dos moléculas del compuesto alifático ALA con pérdida de dos de agua para dar un derivado heterocíclico, el porfobilinógeno (PBG) (Figura I.10.).

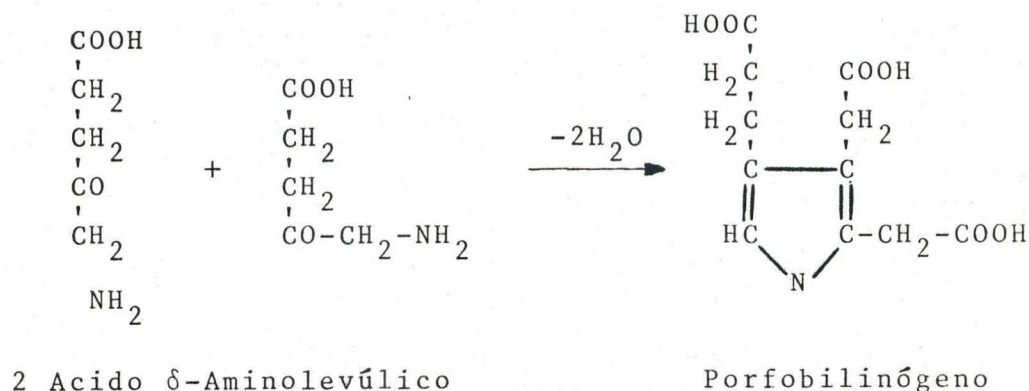


Figura I.10.: Síntesis de PBG catalizada por la enzima ALA-D

El ALA-D está ampliamente distribuída en la naturaleza: en células parenquimales y sanguíneas de las más diversas especies animales (Batlle y col., 1967; Tomio y col., 1968; Barreiro, 1969; Moore y col., 1971; Shemin, 1976); en células de trigo (Nandi y Waygood, 1967); y en otras plantas (Carell y Kahn, 1964; Tigier y col., 1968, 1970); en células de levaduras (Barreiro, 1969); en hongos (Muthukrishnan y col., 1969, 1972) y bacterias (Nandi, 1971; Yamasaki y Moriyama, 1971).

El ALA-D es una enzima citoplasmática soluble (Granick y Mauzerall, 1958 a), es decir el ALA sintetizado dentro de la mitocondria debe difundir al citoplasma para ser convertido en PBG.

En general, se comporta como una metaloenzima, termoes- table y típicamente sulfhidrúlica. El ALA-D purificada de eritro- citos e hígado de rata (Finelli y col., 1974, 1975) y de hígado vacuno (Cheh y Neilands, 1973; Tsukamoto y col., 1979) requiere la presencia de activadores de grupos sulfhidrúlicos y cinc para presentar su máxima actividad. Es inhibida por agentes blo-

queantes de grupos -SH (Sassa y col., 1975) y quelantes tales como EDTA, que desplazan el cinc de la estructura proteica (Finelli y col., 1975; Tsukamoto y col., 1979). Otro potente inhibidor de la enzima es el plomo, cuyo accionar se revierte por el agregado de reactivos tiólicicos tales como DTT, GSH o también por cinc (Granick y col., 1973; Finelli y col., 1975).

Existen evidencias de que en el centro activo de la enzima se encuentran, además de grupos -SH, un átomo de cinc por subunidad, 1 ó 2 residuos lisina, 1 residuo histidina y restos de aminoácidos hidrofóbicos, que en conjunto contribuyen a definir el sitio activo de la enzima (Tsukamoto y col., 1975).

El ALA-D es una enzima oligomérica de peso molecular 280.000, constituida por 8 subunidades similares y al parecer la estructura mínima funcional corresponde a la de un dímero de peso molecular 70.000 (Batlle y col., 1978). Es una proteína que, según las condiciones experimentales, forma fácilmente agregados moleculares, dando lugar a la existencia de especies de pesos moleculares diferentes en equilibrio (Stafforini y col., 1980).

En cuanto a su mecanismo de acción, Nandi y Shemin (1968) y Batlle y Stella (1978) han propuesto un esquema que se ajusta a las evidencias experimentales obtenidas hasta su momento.

1.2.2.4. Síntesis de Uroporfirinógeno: Porfobilinogenasa

Se denomina Porfobilinogenasa (PBG-asa), término propuesto por Lockwood y Rimington (1957), al complejo enzimático que cataliza la ciclación de cuatro moléculas de PBG para dar el primer tetrapirrol cíclico, el Uroporfirinógeno III (Urogen III), intermediario fisiológico en la biosíntesis de hemo, clorofilas y corrinas (Figura I.1.).

La PBG-asa es una combinación de, por lo menos, dos enzimas: la Uroporfirinógeno I Sintetasa o Deaminasa, que es una proteína termoestable, y la Uroporfirinógeno III Cosintetasa o Isomerasa, que es el componente termolábil. La Deaminasa, altamente específica para el PBG, cataliza la condensación de cuatro moléculas del pirrol para formar un tetrapirrol cíclico simétrico, el uroporfirinógeno I (Urogen I). La Isomerasa, en cambio,

no usa al PBG como sustrato ni tampoco actúa sobre el Urogen I; sin embargo, cuando se encuentra asociada con la Deaminasa, formando el complejo PBG-asa, transforma cuatro moléculas de PBG en el uroporfirinógeno III (Urogen III), el isómero asimétrico, por medio de condensaciones sucesivas con eliminación de amoníaco e inversión de uno de los anillos.

La PBG-asa se ha estudiado en bacterias, algas, protozoos, plantas superiores, hígado bovino y eritrocitos de conejo, de aves y humanos (Batlle y Rossetti, 1977). Tanto la PBG-asa como sus componentes Deaminasa e Isomerasa se han aislado, purificado y caracterizado a partir de numerosos tejidos (Rossetti, 1978).

Es una enzima citoplasmática (Batlle y Rossetti, 1977) y sulfhidrónica (Sancovich y col., 1969; Llambías y Batlle, 1971 a y b; Frydman y Feinstein, 1974).

De estudios cinéticos ha surgido la evidencia de que la PBG-asa presenta las características de una enzima alostérica, en algunos casos se observa cooperatividad positiva y en otros una combinación de cooperatividad positiva y negativa (Sancovich y col., 1969; Llambías y Batlle, 1970 a y b; Llambías y col., 1971); de todos modos es evidente que la entrada de la primera molécula de PBG al sitio activo de la enzima controla la entrada de las siguientes.

Tanto la PBG-asa como sus componentes se inhiben por compuestos básicos como el amonio, hidroxilamina o alquilaminas, postulándose que de alguna manera estos agentes bloquearían, bien el sitio de unión del PBG a la enzima o bien la entrada de nuevas moléculas de PBG sobre el polipirrol naciente para formar el tetrapirrol, o aún más, podrían interferir de alguna forma con la asociación Deaminasa-Isomerasa (Stella y col., 1971).

En ciertos tejidos y condiciones se han aislado intermedios polipirrónicos, de diferente longitud, que según provengan de la acción del complejo PBG-asa sobre el PBG, o sólo de la Deaminasa sobre el PBG, ya llevan preformada la estructura del isómero normal III o del isómero I, respectivamente (Llambías y Batlle, 1970 c; Llambías y Batlle, 1971 b; Rossetti y Batlle, 1977; Rossetti y col., 1977).

La determinación del peso molecular de la Deaminasa de distintas fuentes condujo a un valor de 40.000 (Llambías y

Batlle, 1971 a; Jordan y Shemin, 1973; Higuchi y Bogorad, 1975; Sancovich y col., 1976; Miyagi y col., 1979; Anderson y Desnick, 1980; Rossetti y col., 1980; Williams y col., 1981; Fumagalli y col., 1985). Sin embargo, Frydman y Feinstein (1974) encontraron un peso molecular de 25.000 para la enzima proveniente de eritrocitos humanos, en tanto que para la Deaminasa de *Rp. palustris* se ha determinado un peso molecular de 80.000 (Kotler y col., 1986).

Se ha propuesto, además, en base a estudios cinéticos, que la reacción de condensación de 4 moles de PBG en uroporfirinógenos III ó I ocurre en dos etapas, la primera de las cuales lleva a la formación del intermediario polipirrólico de cadena abierta que en una segunda etapa adquiere la estructura necesaria para su final ciclización al anillo del uroporfirinógeno (Llambías y Batlle, 1971 b; Stella y col., 1971).

Teniendo en cuenta todas las evidencias experimentales, reunidas hasta el presente se ha propuesto un mecanismo de acción para la PBG-asa y Deaminasa que respondería al comportamiento observado para estas enzimas en particular con respecto a la detección de diferentes intermediarios polipirrólicos de cadena abierta, probablemente tetrapirrilmetanos, según hubieran sido formados por acción de la PBG-asa o la Deaminasa sobre el PBG (Rosetti y Batlle, 1977; Rossetti y col., 1977). Una consideración importante de este modelo es que la isomerización del tipo III ocurriría, aparentemente, al inicio de la reacción, inmediatamente después de la unión del primer mol de PBG al complejo, formándose por unión cabeza-cola con el segundo mol de PBG, un dipirrol ya isomerizado; el tercero y cuarto PBG entran de cabeza dando lugar así, finalmente al uroporfirinógeno III. En ausencia de Isomerasa no habría inversión y se formarían di, tri y tetrapirril-metanos, en los cuales las 4 moléculas de PBG están unidas cabeza-cola para formar el isómero simétrico, el uroporfirinógeno I. Hasta el momento, habría acuerdo en cuanto a la existencia de los intermediarios aminopirrólicos. Sin embargo, se difiere en cuanto al momento en el cual ocurre la isomerización, ya que el grupo de Battersby (Battersby y col., 1977 a y b, 1980) sugiere que el proceso de reordenamiento tendría lugar después de la formación de un bilano lineal no isomerizado, mientras que las propuestas del grupo de Batlle y col. (Llambías y Batlle, 1970 a, 1971 b; Batlle y Rossetti, 1977; Rossetti y

Battle, 1977; Rossetti y col., 1977; Rossetti, 1978) y de Frydman (Frydman y Frydman, 1975 a y b) indican que la isomerización podría ocurrir en la etapa inicial de condensación de las dos primeras moléculas de PBG. Sin embargo, los resultados de Rossetti y col. (1977, 1978) indicarían que éstos podrían interpretarse de acuerdo a la hipótesis de Battersby. Scott y col. (Burton y col., 1979; Scott y col., 1980) análogamente a lo propuesto por Battersby, encontraron que la Deaminasa forma un preuroporfirinógeno, el cual sería el sustrato natural de la Isomerasa (Jordan y col., 1979) (Figura I.11.).

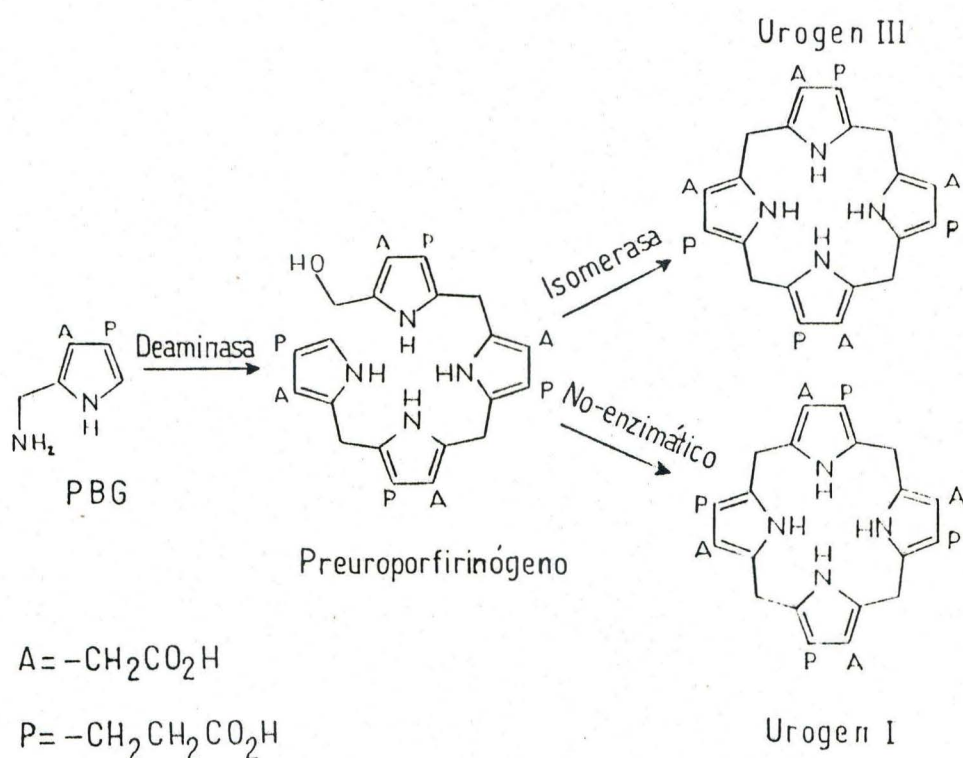


Figura I.11.: Formación de preuroporfirinógeno por acción de la Deaminasa.

Más recientemente, Battersby y col. (1980) postularon que la Isomerasa actuaría sobre el hidroximetilbilano produciendo la isomerización en el anillo D, seguida de una rápida ciclización.

Posteriormente, el grupo de Jordan realizó estudios tentantes a determinar el modo de unión del PBG a la Deaminasa empleando la enzima purificada de *Rp. sphaeroides*. Detectaron, luego de incubaciones con cantidades estequiométricas crecientes de

^{14}C -PBG, bandas proteicas con movilidades electroforéticas ligeramente diferentes, que atribuyeron a intermediarios enzima-sustrato con 1, 2 y 3 moléculas de PBG unidas (Berry y Jordan, 1981). Casi simultáneamente, Anderson y Desnick (1980) reportaron la aparición de múltiples formas activas de la Deaminasa al purificar la enzima de eritrocitos humanos e incubarla con exceso de PBG, señalando que las mismas corresponderían a intermediarios enzima-sustrato con 1, 2, 3 y 4 moléculas de PBG.

Jordan y Berry (1981) demostraron que el complejo formado entre la Deaminasa y cantidades estequiométricas de PBG, era un intermediario unido covalentemente y que posiblemente sólo el PBG que forma el anillo A del preuroporfirinógeno es el que está unido en forma covalente a la enzima.

En cuanto al mecanismo de acción de la Deaminasa, se han planteado varias hipótesis, entre las cuales surge como la más probable, la que involucra un único sitio catalítico que se usa varias veces (Seehra y Jordan, 1980).

I.2.2.5. Síntesis de Coproporfirinógeno: Uroporfirinógeno Decarboxilasa

La Uroporfirinógeno Decarboxilasa, conocida también como Uroporfirinógeno-carboxilasa o simplemente Decarboxilasa (Uro-D) cataliza la decarboxilación de las cuatro cadenas laterales de ácido acético del uroporfirinógeno a cuatro restos metálicos del coproporfirinógeno.

Esta enzima fue estudiada en *Chlorella vulgaris* (Bogorad, 1955, 1958; Granick, 1955 b), *Rp. spheroides* (Hoare y Heath, 1958; Chu y Chu, 1970), *Rp. palustris* (Koopmann & Battle, 1986), bazo de ratón (Romeo y Levin, 1971); eritrocitos de ave (Falk y col., 1956; Neve y col., 1956; Hoare y Heath, 1958; García, 1973) y humanos (Conford, 1964; Rasmussen y Kushner, 1979; De Verneuil y col., 1980; Elder, 1982); glándula de Harder (Tomio y Grinstein, 1968); hígado de rata (Aragónés y col., 1972; Smith y Francis, 1979, 1981; Kardish y Woods, 1980).

En todos los tejidos estudiados la Decarboxilasa resultó ser una enzima citoplasmática, sulfhidrónica, termolábil y de alta especificidad sobre los grupos acéticos. La actividad enzimática es inhibida *in vitro* por Hg^{++} , Cu^{++} , iodoacetamida y

PCMB, pudiendo ser revertida esta inhibición por GSH, lo cual confirma que la Decarboxilasa es una enzima sulfhidrúlica.

La Uro-D es preferentemente anaeróbica; el oxígeno inhibe la reacción probablemente por oxidación de sus sustratos los porfirinógenos, aunque tratándose de una enzima sulfhidrúlica, no puede descartarse que el oxígeno ejerza una acción directa sobre la misma Decarboxilasa.

En cuanto al mecanismo químico de la decarboxilación del resto acetato en metilo aún se desconoce; sin embargo, Jackson y col. (1976) han logrado establecer cual es la ruta fisiológica de decarboxilación del uroporfirinógeno III en coproporfirinógeno III (Figura I.12.), confirmándose que se trata de un proceso secuencial, en el cual el sustrato ubicado en el sitio activo de la enzima se desplazaría sobre la superficie de la misma, siguiendo el sentido de las agujas del reloj, comenzando a decarboxilar en primer lugar el grupo acetato del anillo D, para seguir luego con el de los anillos A, B y C. En contraste, esta enzima no sigue una ruta específica cuando se trata de decarboxilar los cuatro restos acetato del uroporfirinógeno I, sino que lo convierte en el correspondiente coproporfirinógeno I por cualquiera de las únicas rutas posibles.

I.2.2.6. Síntesis de protoporfirinógeno: Coproporfirinogenasa

La Coproporfirinogenasa (CPG-asa), Coproporfirinógeno oxidasa o Coprogenasa, cataliza la decarboxilación oxidativa secuencial. (Cavaleiro y col., 1974) de dos cadenas laterales propionato del coproporfirinógeno III a los correspondientes grupos vinilo del protoporfirinógeno IX (Akhtar y Jordan, 1979; Bogorad, 1976; Battersby y Mc Donald, 1975) (Figura I.13.).

En todos los tejidos estudiados la Coprogenasa se presenta como una enzima mitocondrial (Batlle y col., 1965; Yoshinaga y Sano, 1980).

Esta enzima fue estudiada en *Chlorella vulgaris* (Granick, 1955); hemolizados de eritrocitos de aves (Dressel y Falk, 1956); *Euglena gracilis* (Granick y Mauzerall, 1958); hígado vacuno (Sano, 1958; Porra y Falk, 1964; Yoshinaga y Sano, 1980); hígado de rata (Batlle y col., 1965; Elder y col., 1978; Grandchamp y

bazo de rata (Kardish y Woods, 1980).

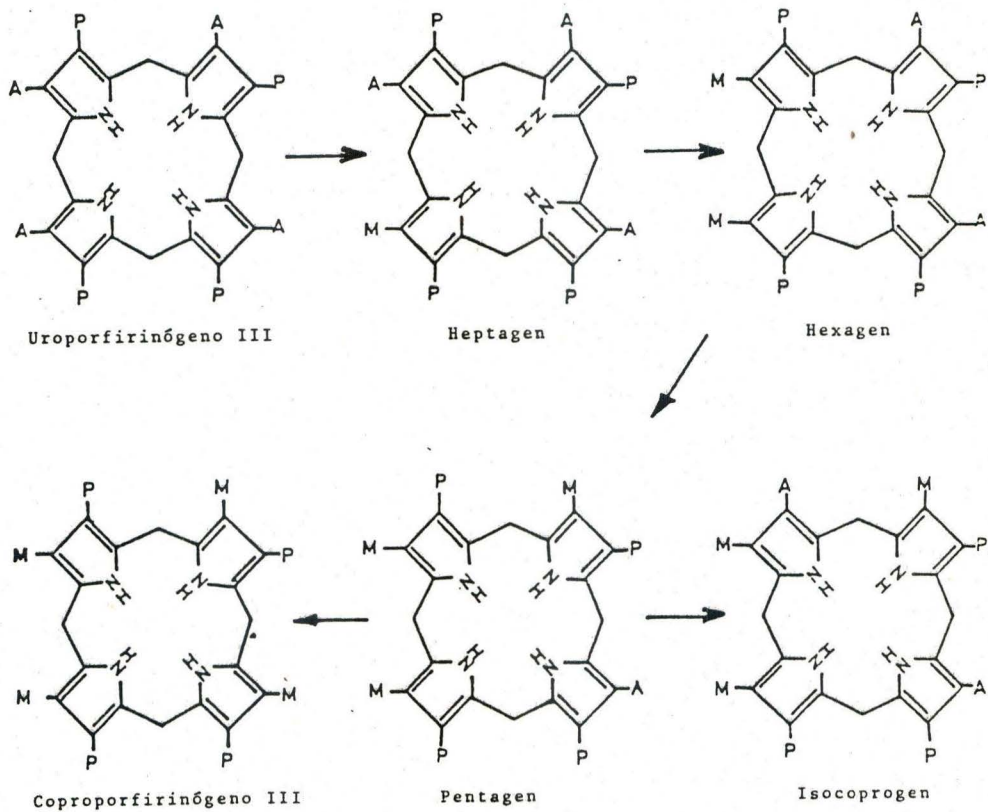


Figura I.12.: Ruta normal para la decarboxilación enzimática del uroporfirinógeno III en coproporfirinógeno III, en el sentido de las agujas del reloj, iniciándose sobre el anillo D del ciclo tetrapirrólico.

En animales y plantas la reacción de decarboxilación tiene un requerimiento absoluto por oxígeno molecular (Yoshinaga y Sano, 1980). Sin embargo, en bacterias anaeróbicas, capaces de biosintetizar porfirinas, debe existir un mecanismo alternativo para la conversión del coproporfirinógeno III a protoporfirina IX, que no sea dependiente del oxígeno molecular y que lleve a la formación del protoporfirinógeno. En efecto, Ehteshamuddin (1968) demostró en especies de *Pseudomonas* la actividad de una Coproporfirinógeno III oxidasa anaeróbica. Posteriormente, Tait (1972) detectó actividad de Coprogenasa en *Rp. sphaeroides*, donde la enzima puede actuar en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, utilizando para este último caso un sistema constituido por

ATP, magnesio y L-metionina, que actúe como aceptor de hidrógenos.

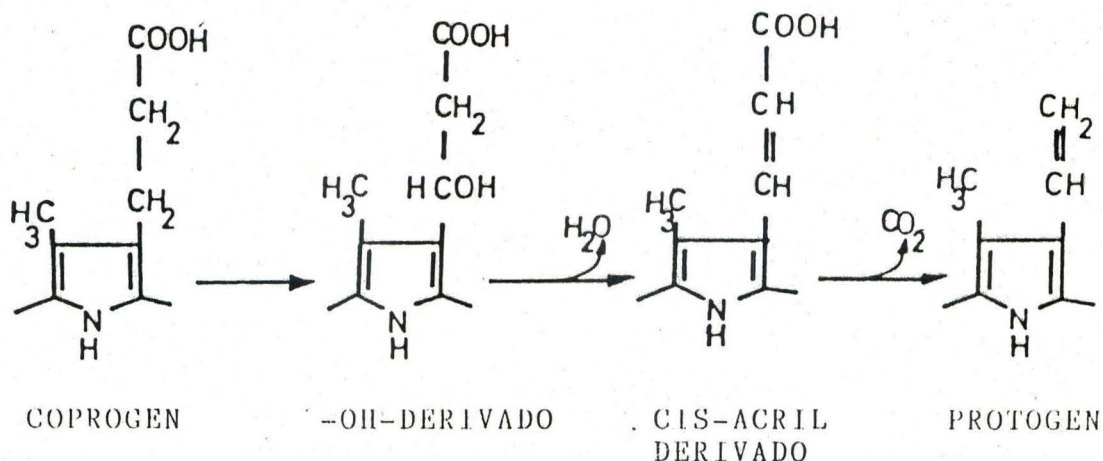


Figura I.13.: Decarboxilación del coproporfirinógeno III en protoporfirinógeno IX.

Esta enzima es altamente específica para el coproporfirinógeno III, ya que no utiliza coproporfirinógeno I ni coproporfirinógeno II como sustratos (Porra y Falk, 1964), por lo cual sólo se encuentra en la naturaleza protoporfirina IX.

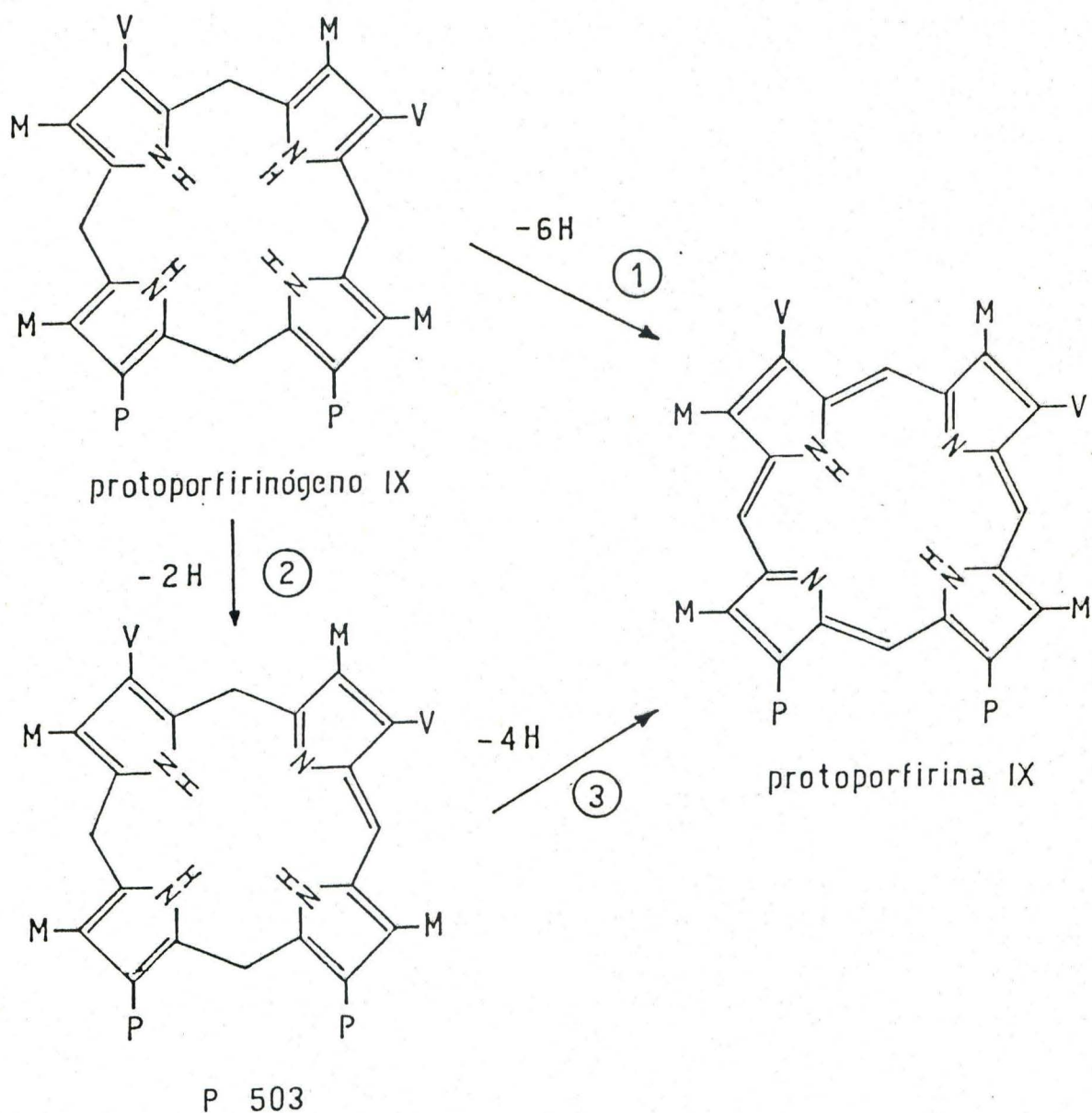
I.2.2.7. Síntesis de protoporfirina: Protoporfirinógeno-Oxidasa

La Protoporfirinógeno IX Oxidasa o Protogen Oxidasa cataliza la deshidrogenación del protoporfirinógeno IX a protoporfirina IX (Proto IX), por pérdida de seis átomos de hidrógeno (Figura I.14.).

En 1973, Poulson y Polglase, postularon que un pigmento detectado en *S. cerevisiae*, que presentaba una típica banda de absorción en el espectro visible a 503 nm por lo cual fue designado con el nombre de P-503, era un posible intermediario en la biosíntesis de protoporfirina IX.

La Protogen-Oxidasa purificada de levaduras (Poulson y Polglase, 1974) y de hígado de rata (Poulson, 1976) requiere oxígeno molecular. En *Escherichia coli*, Jacobs y Jacobs (1975) midieron actividad aeróbica de esta enzima. Estos mismos autores (1976) demostraron luego que esta reacción podía ocurrir en condiciones anaeróbicas utilizando fumarato como aceptor alternati

vo de electrones. La oxidación anaeróbica del protoporfirinógeno está acoplada a la reducción del fumarato a través de intermediarios de la cadena de transporte de electrones, específicamente quinonas (Jacobs y Jacobs, 1977 a, b; 1978).



① y ③ Protopogen oxidasa

② autooxidación

Figura I.14.: Esquema de la formación de protoporfirina IX a partir de protoporfirinógeno IX.

El grupo de Poulson y Polglase (1975) demostró que se trata de una proteína mitocondrial, sulfhidrídica y termolábil.

I.2.2.8. Síntesis de hemo: Ferroquelatasa

Por cuanto el estudio de esta enzima constituye parte fundamental de este trabajo de Tesis, en II nos ocuparemos de la misma en mayor extensión.

I.3. REQUERIMIENTO DE HEMO POR MICROORGANISMOS

I.3.1. Estudios nutricionales

En 1903, Novy y Mc Neal (citado por Lwoff, 1951) establecieron el requerimiento de sangre para cultivar los hemoflagelados *Trypanosoma lewisi* y *T. brucei*. Desde ese primer cultivo axénico, se describieron diversos medios a base de sangre para tripanosomátidos.

En 1908, Nicole encontró el mismo requerimiento de cultivo en *Leishmania donovani* y *L. tropica* (citado por Lwoff, 1951). Lwoff (1951) sugirió que la hemina sería presumiblemente usada por los flagelados para la formación de citocromos, dado que su respiración se veía fuertemente disminuída luego del crecimiento con concentraciones limitantes de este factor y se restauraba por la adición de hemina o protoporfirina IX.

En 1938, Lwoff demostró que, para *Trypanosoma cruzi* la sangre se podía sustituir por suero, hemina y ácido ascórbico.

Diversos autores (Adler, 1934; Senekjic, 1943; Senekjic y Lewis, 1945) crecieron *T. cruzi* y *Leishmania* sp. en medios conteniendo suero y exentos de constituyentes eritrocitarios. Lwoff (1951) sugirió que la hemina, un componente obligatorio de los medios para el cultivo de tripanosomátidos, debía estar presente en el suero usado por aquellos investigadores para permitir que los organismos en cuestión se desarrollasen.

Haemophilus influenzae puede usar hemina o protoporfirina IX como factor de crecimiento, otras porfirinas no son efectivas (Granick y Gilder, 1947). Posteriormente, White y Granick (1963) encontraron que algunas cepas de *H. influenzae* respondían

sólo a hemina y aparentemente carecerían de Hemosintetasa (Ferroquelatasa).

Una cepa mutante de *Staphylococcus aureus*, var 571, también respondía sólo a hemina y no a protoporfirina IX (Jensen y Thofern, 1964).

Estudios nutricionales han demostrado que la hemina es un requerimiento estricto para el crecimiento de *Leishmania tarentolae* (Trager, 1957; Simpson, 1968). Gaughan y Krassner (1971) confirmaron los resultados de Simpson (1968), quien encontró una concentración mínima requerida de hemina de 0,2 µg/ml para cultivos continuos de *Leishmania tarentolae*. Estos mismos autores demostraron que: a) las porfirinas férricas catalasa y peroxidasa podían sustituir a la hemina, mientras que el citocromo c era ineficaz; b) tanto citocromo c como protoporfirina IX inhibieron el crecimiento de *L. tarentolae*; c) el ácido δ-aminolevulínico fue incapaz de sustituir a la hemina; dado que el ³H-ALA era capaz de penetrar en la célula, su ineffectividad no se debía a un problema de impermeabilidad celular; d) se encontraban porfirinas libres (uroporfirina) en extractos de células de *L. tarentolae*.

Las dificultades aparecidas en la determinación de los factores de crecimiento para las especies patogénicas, llevaron al empleo de tripanosomátidos de insectos para estudios nutricionales. El cultivo de *C. fasciculata*, en agua peptonada conteniendo hemina (Lwoff, 1933) contribuyó al establecimiento del primer medio definido para tripanosomátidos inferiores (Cowperthwaite y col., 1953).

A pesar de que diversos tripanosomátidos de insectos se mantuvieron en medios definidos, algunos de ellos son tan exigentes como las especies patogénicas, creciendo solamente en medios adicionados de sangre.

Todos los tripanosomátidos cultivados en medio de composición definida presentan patrones nutricionales semejantes: incapacidad de síntesis *de novo* de purinas y exigencia de hemina (Kidder y Dutta, 1958; Roitman y col., 1972).

Los tripanosomátidos infectados con bacterias simbióticas (Newton, 1957; Chang y Trager, 1974) representan una excepción con respecto al requerimiento de hemina. *Blastocrithidia culicis* y *Crithidia oncopelti* poseen entidades intracelulares

conocidas como "diplosomas" o "cuerpos bipolares" (Novy y Mc Neal, 1907; Newton y Horne, 1957). La naturaleza bacteriana de estos cuerpos bipolares fue indicada por el hallazgo de ribosomas 70S en ellos para la inhibición de su síntesis proteica con cloramfenicol (Zaitseva y Salicov, 1972, 1973). Chang y Trager (1974) confirmaron que los diplosomas de *B. culicis* y los cuerpos bipolares de *C. oncopelti* eran bacterias endosimbiontes. Indican asimismo que estos endosimbiontes suplirían a sus huéspedes con hemina y otros nutrientes esenciales. En 1975, Chang y col., demostraron que *Blastocrithidia culicis* y *C. oncopelti* (libres de simbiosis) requerían un mínimo de 0,1 µg/ml de hemina para su crecimiento, pudiendo ésta ser sustituida por protoporfirina IX pero no por los precursores de porfirinas ALA o PBG.

En 1985, Chang y Chang extendieron sus estudios sobre requerimiento de hemina, al protozoo patogénico *Leishmania mexicana amazonensis*. La hemina aparece como un factor de crecimiento esencial para los promastigotes de *L.m. amazonensis*. Este hallazgo concuerda con las observaciones previas llevadas a cabo con las especies de tripanosomátidos no patogénicas bajo condiciones definidas (Newton, 1957; Chang y Trager, 1974; Trager, 1974). Estos mismos autores demostraron asimismo que la transformación amastigote a promastigote sólo ocurría en presencia de hemina (10 µg/ml) o de suero fetal bovino (10%). Para establecer la especificidad de este requerimiento por hemina intentaron reemplazarlo en el medio definido (Steiger y Steiger, 1976; Chang, 1983) empleado para el cultivo, por diversas metaloporfirinas (Cu-, Mg-, Mn-, Ni-, Co-protoporfirina o cianocobalamina) o por otros compuestos relacionados estructuralmente (protoporfirina IX, deuteroporfirina, mesoporfirina). Como resultado de estas experiencias se observó que sólo la protoporfirina IX (0,25 - 1 µg/ml) promovió la transformación y crecimiento de *Leishmanias* tan eficientemente como la hemina. Sin embargo, se comprobó que este precursor del hemo, deficiente en hierro, era citotóxico a concentraciones mayores (10 µg/ml). Estos hallazgos confirmarían ciertos estudios preliminares llevados a cabo por Melo (1982) sobre el efecto de la concentración de hemina en el crecimiento de *Leishmania mexicana* y *L. donovani*.

I.3.2. Actividades biosintéticas de hemo

Los estudios en hemoflagelados parasíticos llevados a cabo con el objeto de correlacionar los experimentos nutricionales con la actividad biosintética de hemo son muy escasos. A excepción de los resultados obtenidos por Chang y col. (1975) sobre la actividad prácticamente despreciable de Deaminasa en *Trypanosoma conorhini*, *Leishmania tarentolae* y cepas libres de simbiontes de *Crithidia oncopelti* y *Blastocrithidia culicis* y los reportados por este mismo grupo en 1985, mostrando nuevamente un muy bajo nivel de actividad de Deaminasa al igual que de actividad enzimática de ALA-D en *Leishmania mexicana amazonensis* no se tiene conocimiento de otros estudios de medición directa de enzimas del camino del hemo en este tipo de microorganismos.

I.3.3. Estructura fina de tripanosomátidos: posible relación con la biosíntesis de hemo

La estructura fina de los tripanosomátidos ha sido descrita por muchos autores. Se demostró que presentan en el citoplasma gránulos densos en electrones, designados como reservorios de productos metabólicos, cuerpos pigmentados, vesículas de inclusión, gránulos osmiofílicos, etc. (Anderson y Ellis, 1965; Maria y col., 1972; Heywood y col., 1974; Janovy y col., 1974; Molyneux y Robertson, 1974; De Souza y col., 1975, 1976; O'Daly y Bretaña, 1976; Vickerman y Tetley, 1977). Dado que estos gránulos están presentes en prácticamente todos los tripanosomátidos, posiblemente ellos jueguen un papel importante en el metabolismo celular de estos microorganismos.

El microanálisis por Rayos X de la energía dispersiva asociado con la microscopía de transmisión electrónica fue usado como una herramienta citoquímica para relacionar composición elemental con las características morfológicas (Sjöström, 1976). La aplicación de esta técnica al estudio de los gránulos densos de *Herpetomonas samuelpessoai* (triplanosomátida no patógeno) demostró que ellos contenían hierro (De Carvalho y De Souza, 1977). Se observó también que *H. samuelpessoai* crece pobremente y presenta pocos gránulos densos cuando son transferidos a un medio de cultivo privado de hemina (De Carvalho y col., 1979). Basándose en estos hallazgos, estos mismos autores, estudiaron la acti

vidad de proteínas básicas y de fosfatasa ácida en los gránulos. Interesantes resultados se encontraron en *T. cyclops*, hallándose se cuerpos pigmentados en el citoplasma sólo cuando el parásito fue cultivado en presencia de hemoglobina (Heywood y col., 1974). Es posible que los gránulos densos de electrones representen una forma de almacenamiento de derivados tetrapirrólicos que puedan ser usados por la célula (De Carvalho y col., 1979).

II. FERROQUELATASA

II.1. REACCION

La enzima Ferroquelatasa (Hemosintetasa, Protohemo ferroliasa) (E.C. 4.99.1.1) cataliza la inserción de Fe^{2+} (hierro ferroso) en la protoporfirina IX para formar hemo (Figura II.1.).

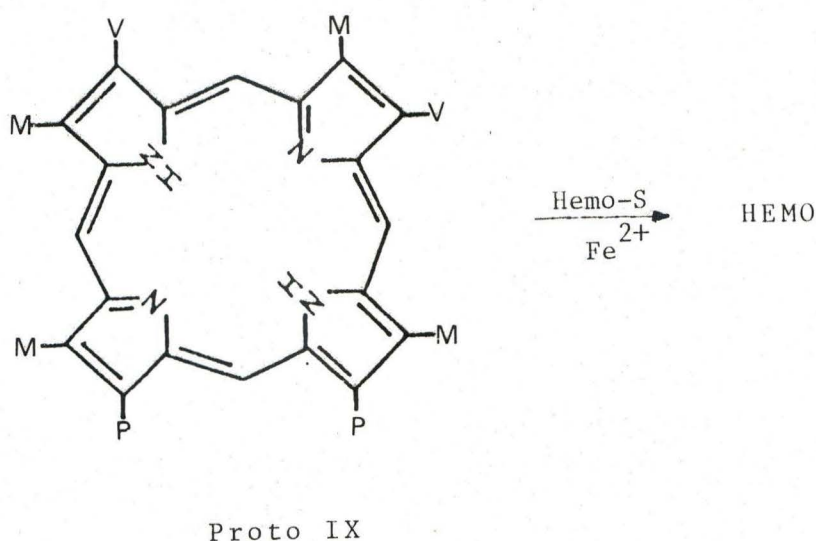


Figura II.1.: Incorporación de Fe^{2+} en la Proto IX, catalizada por la enzima Hemosintetasa (Hemo-S)

II.2. FUENTES

La presencia de Ferroquelatasa ha sido demostrada directamente en preparaciones libres de células de una gran variedad de fuentes incluyendo diversos tejidos animales, tales como eritrocitos de aves (Krueger y col., 1956); médula ósea (Kasuga y col., 1954); reticulocitos (Clark y Walsh, 1959); hígado, riñón y bazo (Lockhead y Goldberg, 1961) de mamíferos. Se ha demostrado similarmente la presencia de esta enzima en plantas (Jones, 1968, 1983; Litle y Jones, 1970; Porra, 1975), así como en levaduras y bacterias (Porra y Jones, 1963; Jones y Jones, 1970 a; Dailey, 1974, 1977, 1982). La enzima se ha medido también en eritrocitos de sangre humana patológica: anemias hemolíticas (Grinstein y col., 1959), anemia perniciosa, después de tratamiento

(Lochhead y Goldberg, 1961) y en varios otros desórdenes hematológicos (Vavra y col., 1964). Ninguno de estos grupos fue capaz de detectar actividad de la enzima en sangre humana normal. Walters y col., en 1963, demostraron actividad de Hemosintetasa en preparaciones de leucocitos provenientes de pacientes con leucemia aguda pero no con leucemia crónica. Finalmente, la actividad de Ferroquelatasa fue demostrada y caracterizada en sangre humana normal (Langelaan y col., 1969).

II.3. FORMACION NO ENZIMATICA DE HEMO

La inserción de hierro en la protoporfirina IX para formar hemo puede ocurrir no enzimáticamente (Mauzerall y Granick, 1958; Heikel y col., 1958; Tokunaga y Sano, 1966; Kassner y Walchak, 1973). En particular, Kassner y Walchak (1973) han cuestionado el rol de una enzima en el último paso de la formación de hemo ya que ellos observaron velocidades de formación de hemo no enzimática que eran comparables y en algunos casos superiores a aquellas observadas con las preparaciones enzimáticas. Estos mismos autores señalan que a menudo se incluye en las preparaciones enzimáticas detergentes, los cuales inhiben fuertemente la formacion no enzimática de hemo. Sin embargo, se demostró repetidamente que extractos de tejido catalizan la formación de hemo a partir de hierro y protoporfirina bajo condiciones para las cuales ninguna reacción significativa ocurría sin material celular. Las actividades de los extractos eran lábiles al calor, dependientes de la temperatura y exhibían un pH óptimo, es decir exhibían el comportamiento clásico de una proteína enzimática.

La aplicación de métodos convencionales de purificación proteica y de fraccionamiento subcelular, permitió obtener preparaciones con actividades específicas crecientes, no dializables y lábiles al calor, indicando una vez más que la actividad catalítica era dependiente de la proteína. Aún más, Dailey y Lascelles (1974) encontraron una mutante de *S. itersonii* la cual carecía de actividad de Ferroquelatasa de membrana y requería hemina para el crecimiento. Más recientemente, se encontró que los anticuerpos contra Ferroquelatasa bovina purificada inhibieron la formación de hemo *in vitro* (Taketani y Tokunaga, 1982). En consecuencia, las evidencias experimentales avalan firmemente el requerimiento de una enzima en el último paso de formación de hemo.

Se demostró que en la Protoporfiria Eritropoyética tanto en humanos como en ganado bovino existe un defecto en la actividad de Ferroquelatasa (Bonkowsky y col., 1975; Rut y col., 1977), indicando que esta enzima es necesaria para que la formación de hemo proceda normalmente bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, los estudios de Kassner y Walchak (1973) enfatizan la necesidad de realizar estudios controles para determinar la contribución no enzimática a la formación de hemo.

II.4. LOCALIZACION. EFECTO DE LOS LIPIDOS

La Ferroquelatasa se localiza sobre el interior de la membrana interna mitocondrial (Jones y Jones, 1969; Mac Kay y col., 1969). Muchas enzimas unidas a membrana muestran un requerimiento por lípidos. En consecuencia no es sorprendente que los lípidos desempeñen un rol importante en la actividad de esta enzima. Mazanowska y col. (1966) observaron que el tratamiento de mitocondrias de hígado de cerdo con acetona u otros solventes lipídicos resultó en una significativa pérdida de actividad de Ferroquelatasa la cual pudo restaurarse mediante la adición de una preparación cruda de lípidos. Estudios subsiguientes revelaron que la actividad enzimática se estimulaba por el agregado de lípidos neutros, fosfatidiletanolamina y lípidos acídicos (Mazanowska y Dancewicz, 1970). Simpson y Poulson (1977), realizaron estudios con preparaciones crudas de Ferroquelatasa, libre de lípidos, de mitocondrias de hígado de rata y encontraron que el grado de reactivación, luego de la adición de ácido graso o de fosfolípido, estaba directamente relacionado con el grado de insaturación del ácido graso y era independiente de la naturaleza de la cabeza polar del fosfolípido. En consecuencia, estos autores sugieren que la actividad de Ferroquelatasa sería dependiente de la fluidez de la fase hidrofóbica, la cual aumenta con el grado de insaturaciones.

La enzima purificada de hígado de rata contiene una cantidad considerable de ácidos grasos y la adición exógena de los mismos estimula hasta 15 veces su actividad (Taketani y Tokunaga, 1981). En contraste, la Ferroquelatasa purificada de tejido bovino no posee ácidos grasos ni fosfolípidos y su actividad aumenta mucho menos por el agregado de lípidos exógenos (Taketani y Tokunaga, 1982; Dailey y Fleming, 1983).

Se desconoce la función precisa de los lípidos sobre la actividad de Ferroquelatasa. Podrían servir como un medio de reacción para los sustratos facilitando la solubilización de la porfirina y/o la transferencia del ión metálico desde un entorno acuoso a otro menos o no acuoso. También podrían modificar o mantener la estructura de la enzima de manera tal que permanezca en su conformación biológicamente más activa (Taketani y Tokunaga, 1981).

II.5. EFEECTO DEL OXIGENO

Muchos investigadores han observado el efecto inhibitorio del oxígeno sobre la actividad de Ferroquelatasa (Labbe y Hubbard, 1960; Porra y Jones, 1963; Mazanowska y col., 1966; Barnes y col., 1972; Koller y col., 1976). Se sugirieron tres posibles causas del mismo: 1) inactivación de la enzima por oxidación de grupos tioles esenciales (Labbe y Hubbard, 1960); 2) oxidación del ión ferroso a ión férrico, que no es sustrato de la enzima (Porra y Jones, 1963); 3) inhibición indirecta a través de la producción de un peróxido que podría oxidar una fracción lipídica, esencial para la actividad enzimática (Mazanowska y col., 1966).

II.6. REQUERIMIENTO POR COFACTORES (FOSFATO DE PIRIDOXAL)

La Ferroquelatasa parece no poseer un requerimiento absoluto por algún cofactor. Sin embargo, Labbe y Nielsen (1976) sugirieron que el fosfato de piridoxal podría cumplir esta función dado que, aumentaba la actividad de Ferroquelatasa, en ratones mantenidos con una dieta deficiente en esa vitamina. Se encontró además que la actividad de Ferroquelatasa en sangre periférica en un paciente con anemia sensible a B₆ estaba disminuída (Vogeler, 1967). Sin embargo, no se detectó disminución de la actividad de esta enzima en ratas mantenidas con una dieta deficiente en piridoxina (Labbe y Nielsen, 1976). Por otra parte, no se ha podido demostrar que el fosfato de piridoxal aumenta la actividad *in vitro* (Labbe y Nielsen, 1976; Dailey, 1982; Dailey y Fleming, 1983). En consecuencia, el requerimiento de la Ferroque

latasa por el fosfato de piridoxal aún es dudoso.

II.7. SUSTRATOS

La actividad de Ferroquelatasa puede medirse usando otros compuestos diferentes de los sustratos naturales ión ferroso y protoporfirina IX (Proto IX).

Zinc y cobalto pueden quelar enzimáticamente la porfirina (Labbe y Hubbard, 1961; Sinclair y col., 1979; Taketani y Tokunaga, 1982) pero no ocurre lo mismo con el ión férrico (Porra y Jones, 1963).

Otros buenos sustratos para la enzima que podrían reemplazar a Proto IX serían: deuteroporfirina y mesoporfirina (Labbe y col., 1963; Porra y Jones, 1963); estos compuestos difieren de la Proto IX en que los grupos vinilos sobre los anillos pirrólicos A y B se reemplazan por átomos de hidrógeno y grupos etilo, respectivamente. Las porfirinas en las cuales los grupos vinilo se reemplazaron por ácido sulfónico o por grupos glicol (-CHOH-CH₂OH) no actúan como sustratos y en cambio son inhibidores competitivos de la enzima (Dailey y Fleming, 1983). De acuerdo a sus estudios Honeybourne y col. (1979), sugieren que el mejor sustrato para la Ferroquelatasa, es uno en el cual no hay sustituyentes sobre los anillos A y B. La esterificación o sustitución de las cadenas carboxílicas laterales sobre los anillos C y D de la Proto IX también llevaría a compuestos que no son sustratos (Labbe y col., 1963; Porra y Jones, 1963; Honeybourne y col., 1979). Se sugiere en consecuencia, que los sustituyentes ácido-propiónico podrían ser críticos en la formación de un complejo efectivo enzima-sustrato.

II.8. PURIFICACION. PESO MOLECULAR

Los primeros intentos llevados a cabo para purificar la Ferroquelatasa fracasaron debido a la pérdida completa de actividad durante las etapas de aislamiento (Yoneyama y col., 1965; Mazanowska y col., 1969). Para la purificación de esta enzima es necesaria su solubilización de la membrana mitocondrial mediante el empleo de un detergente, pero ha ocurrido con frecuencia que

la posterior eliminación del mismo, generalmente resultara en una inactivación de la enzima. Mailer y col. (1980) purificaron la Ferroquelatasa de hígado de rata por cromatografía de afinidad, hasta aparente homogeneidad, usando 2-vinil-4-3'-(N-3" aminopropil)-acrilamida deuteroporfirina como ligando insolubilizado. La Ferroquelatasa purificada presentó una única banda, en electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, de peso molecular aparente 63 KD. Sin embargo, la enzima purificada fue inestable, siendo su vida media de sólo 12 horas cuando se la almacenó con 2-mercaptoetanol (a 4°C ó a -20 °C). En ausencia de 2-mercaptoetanol, la actividad enzimática se perdió completamente dentro de las 12 horas.

Más recientemente, se empleó Cromatografía con Blue Sepharosa CL-6B para purificar la Ferroquelatasa de hígado de rata (Taketani y Tokunaga, 1981) e hígado bovino (Taketani y Tokunaga, 1982; Dailey y Fleming, 1983). En estos estudios, se logró superar en gran medida la inestabilidad enzimática mediante el uso de sistemas buffer conteniendo ditiotreitól y glicerol. Los pesos moleculares de la enzima purificada de rata en las formas desnaturalizada y nativa fueron de 42 KD y 240 KD, respectivamente, sugiriendo así que la enzima de rata existe como un pentámero o como un hexámero (Taketani y Tokunaga, 1981). El peso molecular de la enzima bovina estimado bajo condiciones desnaturalizantes fue de 42,5 KD (Taketani y Tokunaga, 1982) y 40,5 KD (Dailey y Fleming, 1983). A pesar de la similitud en los pesos moleculares de las enzimas bovina y de rata, las dos proteínas eran claramente diferentes, ya que los anticuerpos producidos contra la enzima bovina eran capaces de inhibir la actividad de la misma pero carecían de efecto sobre la actividad de Feroquelatasa de hígado de rata (Taketani y Tokunaga, 1982).

El peso molecular de la enzima bovina nativa determinado por filtración por tamices moleculares fue de 200 KD (Taketani y Tokunaga, 1982), sugiriendo una estructura oligomérica similar a la de la enzima de rata. Este valor estaría de acuerdo con datos anteriores del orden de 290 KD obtenidos para la Ferroquelatasa de eritrocitos de pato (Tanaka y col., 1976).

La Ferroquelatasa purificada 2.000 veces a partir de eritrocitos de aves, exhibió una sola banda en electroforesis de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio, con un peso molecular de 42 KD (Hanson y Dailey, 1984).

II.9. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE FERROQUELATASA

Algunas evidencias sugieren que la Ferroquelatasa, al igual que el ALA-S, podrían estar sujetas a una regulación negativa por feed-back provocada por el hemo. Jones y Jones (1970 b) demostraron que el hemo ($> 1 \mu\text{M}$) inhibió la actividad de Ferroquelatasa en mitocondrias sonicadas de hígado de rata. En mitocondrias intactas de hígado de rata, Koller y Romslo (1977) encontraron que la velocidad de formación de deuterohemo disminuyó después de aproximadamente 20 minutos de incubación. Teniendo en cuenta, que el deuterohemo endógeno sintetizado aparentemente no atraviesa libremente hacia el exterior de la membrana interna, estos autores sugieren que la disminución en la velocidad de formación de deuterohemo se debe a una inhibición por producto de la Ferroquelatasa.

El hemo podría regular la actividad de Ferroquelatasa mediante la inhibición de la enzima y/o mediante la regulación de la concentración de sustratos para la misma. Se encontró que el hemo exógeno reduce marcadamente la disponibilidad de hierro para la Ferroquelatasa en mitocondrias intactas de hígado de rata (Koller y col., 1976; Koller y Romslo, 1977).

Dailey y Fleming (1983) encontraron que el hemo ($> 40 \mu\text{M}$) era un inhibidor no-competitivo respecto del hierro de la Ferroquelatasa bovina purificada. Agregado a esto, Koller (1979) determinó que el hemo ($> 1 \mu\text{M}$) inhibió la captación de deuteroporfirina IX en mitocondrias aisladas de hígado de rata y postuló que el hemo podría regular, aunque sea en parte, la actividad de Ferroquelatasa, mediante el control de la unión de la porfirina a la mitocondria.

El estudio de la regulación de la Ferroquelatasa por hemo es complicado, debido a las propiedades coloidales de la hemina. El hemo, a pH fisiológico y concentraciones mayores que $0,1 \mu\text{M}$, está principalmente en la forma de un oxodímero, Fe-O-Fe, donde los dos átomos de hierro están unidos a través de un puente oxígeno. Estos dímeros forman grupos de peso molecular 50 KD, o más, y no son dializables. En consecuencia, los resultados obtenidos pueden verse notablemente afectados según la manera de disolución e incubación (o administración) del hemo. De todas formas, todavía no está definido si existe o no *in vivo* una ver

Incluso, de existir un rol regulatorio del hemo sobre la actividad de Ferroquelatasa, su importancia sobre la regulación del camino biosintético total del hemo es incierta (Cole y Marks, 1984).

II.10. INHIBIDORES; DDC Y GRISEOFULVINA

El DDC (3,5-dietoxicarbonil-1-4-dihidro-2,4,6-trimetil piridina) y el agente antifúngico, griseofulvina ejercen su efecto porfirinogénico, por lo menos en parte a través de la inhibición de la enzima Ferroquelatasa.

En 1963, Onisawa y Labbe, encontraron que el DDC inhibía la Ferroquelatasa hepática en ratones. Este efecto inhibitorio se observó luego en otras especies (Tephly, 1971; Anderson, 1978; Cole y col., 1979; Rifkind, 1979; Cole y col., 1981 a) pero el mecanismo a través del cual el DDC causa la inhibición de la Ferroquelatasa sólo se elucidó recientemente. Se encontró que el DDC provoca la acumulación de un pigmento verde (Tephly y col., 1979) identificado como N-metilprotoporfirina (De Matteis y col., 1980; Ortiz de Montellano y col., 1981), el cual es un potente inhibidor de la Ferroquelatasa (Tephly y col., 1979; De Matteis, 1980; Dailey y Fleming, 1983). La fuente del sustituyente N-metilo de la N-metilprotoporfirina se encontró que era el grupo 4 metil del DDC.

La griseofulvina también ejerce un efecto inhibitorio sobre la Ferroquelatasa hepática de roedores (De Matteis y Gibbs, 1975). Sin embargo, no se observa esta inhibición ni en embriones de pollo ni en sistemas de cultivo de hepatocitos (Cole y col., 1981 b).

II.11. EFEECTO DE METALES. METALQUELATASAS

La inserción enzimática de un metal en la porfirina libre es uno de los pasos aceptados del camino biosintético de los tetrapirroles. Se han llevado a cabo diversos estudios sobre las velocidades de incorporación de metales en las porfirinas, tanto en modelos no enzimáticos como en sistemas enzimáticos. Como ya hemos mencionado, el estudio de la quelación enzimática de me

tales por porfirinas es complejo dado que la velocidad no enzimática es frecuentemente significativa y dependiente de las condiciones experimentales.

Se han detectado enzimas que catalizan esta etapa en cerdo e hígado de rata; eritrocitos de aves, levaduras y diversos microorganismos. Los datos en plantas superiores son limitados; Goldin y Little (1969) han aportado alguna información sobre una metalquelatasa de cebada y Jones (1967, 1968) ha descrito una Ferroquelatasa de espinaca.

Hemos visto que la enzima que cataliza la inserción del hierro en la protoporfirina se clasifica como una Protohemoferroliasa, aunque también se la conoce como Ferroquelatasa (Porra y Jones, 1963) o Hierro-protoporfirina quelatasa (Labbe y Hubbard, 1961).

La enzima de cebada, cataliza la formación tanto de cinc-como de hierro-porfirinas. Dado que no ha sido establecido inequívocamente que una única enzima catalice ambas reacciones, el término "actividad de Zn-quelatasa", ha sido usado para designar la actividad observada cuando Zn y protoporfirina sirvieron como sustratos. En tanto que el término "actividad de Ferroquelatasa" ha sido empleado cuando se estudió la inserción de hierro en el sustrato porfirina (Goldin y col., 1969).

Labbe y Hubbard (1961), estudiaron la especificidad metálica de la quelatasa hierro-protoporfirina de hígado de rata. La conversión de hierro y protoporfirina en hemo, se demostró espectrofotométricamente. Altas concentraciones de Fe^{2+} produjeron inhibición, probablemente a través de una reacción con los grupos sulfhidrilos. El Co^{2+} , se comportó en forma similar al Fe^{2+} y los experimentos de dilución isotópica indicaron que el Co^{2+} y el Fe^{2+} se utilizaron a través del mismo mecanismo enzimático. También se comprobó la incorporación de trazas de $^{54}\text{Mn}^{2+}$ en protoporfirina, aunque el Mn^{2+} se comportó como un inhibidor de la enzima. El Mn^{2+} aparentemente no reaccionó con los grupos sulfhidrilos, sino que inhibió no competitivamente con respecto al Fe^{2+} . Sn^{2+} no fue utilizado por la enzima, ni inhibió la actividad de la misma. Sin embargo, todos los otros metales ensayados (Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+}) fueron inhibitorios. Tanto Fe^{2+} como Co^{2+} , inhibieron la actividad de Zn-quelatasa.

Neuberger y Tait (1964) detectaron la enzima Zn-protoporfirina quelatasa en cromatóforos de *Rhodopseudomonas spheroides*. Las Zn-protoporfirina quelatasas están también presentes en mitocondrias de hígado de cobayos y en hígado, corazón y riñón de conejo. La enzima de *Rp. spheroides* es específica para iones Zn^{2+} . De las sales probadas como inhibidores, sólo aquellas con iones Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} y Ca^{2+} son activas.

La Ferroquelatasa particulada de *Rp. spheroides* no es específica, pues puede utilizar Co^{2+} ó Fe^{2+} ; también se han realizado estudios con Zn^{2+} (Johnson y Jones, 1964; Neuberger y Tait, 1964) y Cu^{2+} (Jones, 1967). Jones y Jones (1970) han confirmado estos datos, encontrando baja actividad de metal-quelatasa con Ni^{2+} y Mn^{2+} . Estos metales fueron además mutuamente competitivos para la Ferroquelatasa. Al probar varios sustratos metálicos sobre un amplio rango de concentraciones, estos autores demostraron que altas concentraciones de Zn^{2+} pero no de Co^{2+} fueron inhibitorias para la enzima de *Rp. spheroides*. Fe^{3+} , Mg^{2+} y Sr^{2+} no fueron incorporados ni se consideraron inhibidores de la acción de la quelatasa; pero el Cd^{2+} que tampoco fue incorporado, inhibió en cambio la incorporación de otros metales.

Como resultado de diversos estudios de competición entre diferentes sustratos metálicos, Jones y Jones (1969), concluyeron que la misma enzima fue la responsable de la incorporación de Fe^{2+} , Zn^{2+} ó Co^{2+} en mitocondria de hígado de rata. Porra y Ross (1965), sin embargo, encontraron que en *Clostridium tetanomorphum*, una bacteria que sintetiza vitamina B_{12} pero no hemos, las velocidades de incorporación de Co^{2+} excedieron ampliamente las velocidades de incorporación de Fe^{2+} , sugiriendo la presencia de una Co^{2+} -quelatasa específica.

Jones y Jones (1970 a), postularon la correlación entre las propiedades físicas de los iones metálicos y sus velocidades de incorporación. Con la excepción de Fe^{2+} y Co^{2+} , las velocidades fueron aproximadamente del mismo orden que las descritas para la formación no enzimática de metaloporfirinas. Con los demás iones metálicos las velocidades medibles fueron $Cu^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+} > Ni^{2+} > Cd^{2+}$ (Fleischer y col., 1964; Phillips, 1967). Aunque Mg^{2+} , Co^{2+} y Fe^{2+} pudieron ser incorporados no enzimáticamente en un entorno no acuoso, sólo se detectó ligera incorporación en condiciones fisiológicas acuosas, lo cual sugirió que el sitio activo de la enzima podría proveer de un entor

no hidrofóbico para el paso de la quelación.

Recordemos que Sawada y col. (1969) hallaron evidencias de que los fosfolípidos serían importantes para la actividad de la Ferroquelatasa.

Jones y Jones (1970 a) mencionan también que, a bajas velocidades en un medio acuoso, el Cd^{2+} podría ser incorporado no enzimáticamente en las porfirinas y podría actuar como un inhibidor competitivo de los sustratos normales en reacciones catalizadas enzimáticamente.

Iones metálicos tales como Ni^{2+} y Mn^{2+} , incorporados a bajas velocidades, fueron también inhibidores de la incorporación de Fe^{2+} y Co^{2+} .

Pareciera ser, que uno de los problemas que todos los organismos tienen que resolver es el de mantener todos los iones metálicos excepto Fe^{2+} , lejos del sitio de acción de la Ferroquelatasa. Estos mismos autores, han detectado Zn y Cu-porfirinas en medios de cultivo de bacterias y levaduras, aunque estas podrían haberse formado no enzimáticamente.

Taketani y Tokunaga (1981), demostraron también la inhibición de la actividad enzimática de Ferroquelatasa de mitocondria de hígado de rata por metales tales como Co^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} ó Mn^{2+} .

En consecuencia, parecería que la capacidad para formar diferentes metaloporfirinas, varía entre especies y podría estar vinculada a la capacidad para sintetizar tales complejos metal-tetrapirroles, como clorofilas y vitamina B_{12} , así como los pigmentos del hemo más comunes (Johnson y Jones, 1964).

III. LOS PARASITOS

III.1. CLASIFICACION

La familia Trypanosomatidae (Tabla III.1.) pertenece al orden Kinetoplastida y está compuesta por protozoarios flagelados que poseen una única mitocondria, que recorre toda la extensión de la célula y en la cual se localiza el cinetoplasto compuesto por una red de fibras circulares de DNA unidas entre sí (Hoare y Wallace, 1966; Simpson, 1972; Vickerman, 1976; Camargo, 1979; Levine, 1980).

III.2. FORMAS MORFOLOGICAS

En función de la ausencia o presencia de flagelo y membrana ondulante así como del punto de origen del flagelo 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 (Hoare y Wallace, 1966; Vickerman, 1976; Camargo, 1979; De Souza, 1983) (Figura III.1.).

La ausencia de las diversas formas en la familia Trypanosomatidae se muestra claramente en la Tabla III.2.

III.3. Familia Trypanosomatidae

Los géneros *Leptomonas*, *Phytomonas*, *Leishmania*, *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Rhynchoidomonas*, *Endotrypanum* y *Trypanosoma* pertenecen a la familia Trypanosomatidae (Vickerman, 1976) (Tabla III.1.).

De gran importancia médica y económica son los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*, debido a la existencia de especies patogénicas para el hombre y para los animales domésticos. Ambos géneros están constituidos de parásitos digenéticos de vertebrados e insectos (Camargo, 1979).

Los géneros *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia* y *Rynchoidomonas* son monogenéticos y son casi exclusi

vamente parásitos de insectos.

El género *Phytomonas* está constituido de parásitos digénéticos de insectos y plantas (Mc Ghee y Cosgrove, 1980).

El género *Endotrypanum* es también digenético y es el único Kinetoplástida intraeritrocítico (Molyneux y Ashford, 1983).

III.4. GENERO *Crithidia*

Este género comprende parásitos monogenéticos de insectos, principalmente dípteros, hemípteros e himenópteros (Camargo, 1979). Los parásitos se localizan generalmente en el intestino de los insectos.

La presencia de la forma coanomastigote (Figura III.1.) con un flagelo libre es una definición del género (Tabla III.2.).

Algunas especies poseen bacterias endosimbiontes (Gill y Vogel, 1963; Gutteridge y Macadam, 1971; Chang, 1974; Mundim y col., 1974) capaces de proveer vitaminas esenciales, cofactores, etc. (Chang y Dave, 1980; Alfieri y Camargo, 1982).

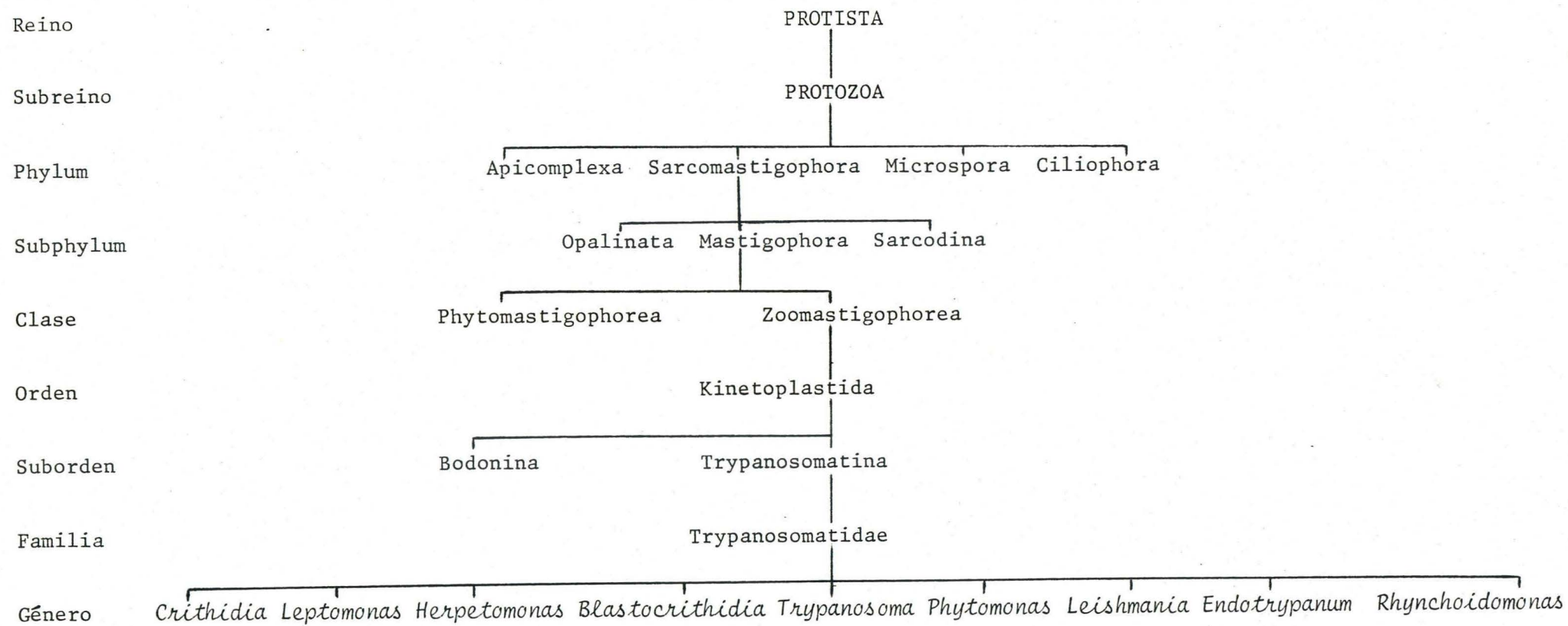
Su fácil cultivo, su importancia como modelos para los patógenos de vertebrados y su conveniencia para la experimentación efectiva de agentes quimioterapéuticos ha motivado extensos estudios sobre los requerimientos nutricionales de *Crithidia* y sobre su bioquímica (Mc Ghee y Cosgrove, 1980).

III.5. GENERO *Trypanosoma*

Por razones relacionadas tanto a las enfermedades que causan como a sus características morfológicas y bioquímicas, el género *Trypanosoma* puede clasificarse de la siguiente manera (Tabla III.3.).

El ejemplo más importante de los tripanosomas stercorarian es el *Trypanosoma cruzi* que causa la enfermedad de Chagas en el hombre. Dentro de los tripanosomas salivarian (principalmente africanos), *T. brucei rhodesiense* y *T. brucei gambiense* causan la enfermedad del sueño en el hombre y *T. brucei brucei*, *T. brucei congolense*, *T. brucei vivax* y *T. brucei equiperdum* provocan la tripanosomiasis del ganado (nagana y enfermedades similares).

Tabla III.1.: Clasificación de los Kinetoplástida



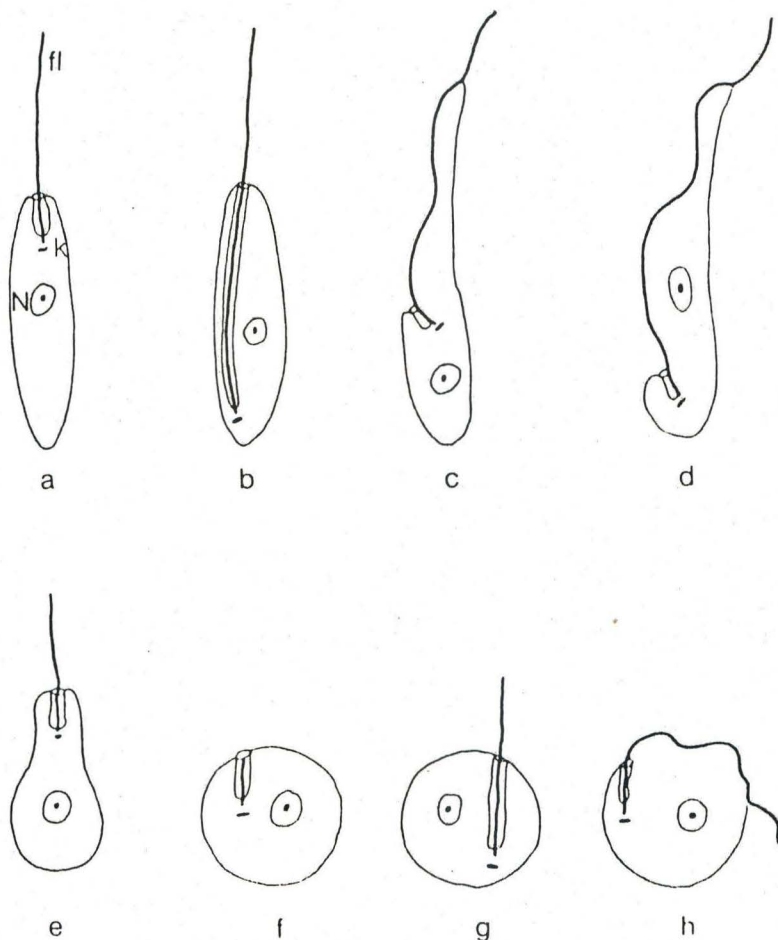


Figura III.1.: Configuración diagramática de tipos morfológicos de Trypanosomatidae (x 1300). (a) Promastigote, (b) Opisthomastigote, (c) Epimastigote, (d) Tripomastigote, (e) Coanomastigote, (f) Amastigote, (g) Paramastigote, (h) Esferomastigote. fl = flagelo, N = núcleo, K = Kinetoplasto.

Las formas morfológicas características son: tripomastigotes, que se encuentran en la sangre y tejidos de huéspedes vertebrados y las formas epimastigotes, localizadas en el vector invertebrado. Sin embargo, existen otras configuraciones como amastigotes y más raramente, promastigotes. Las formas infectivas que se producen en el vector se conocen como metacíclicas y son de configuración tripomastigote.

Tabla III.2.: Ocurrencia de -mastigotes en géneros de Trypanosomatidae

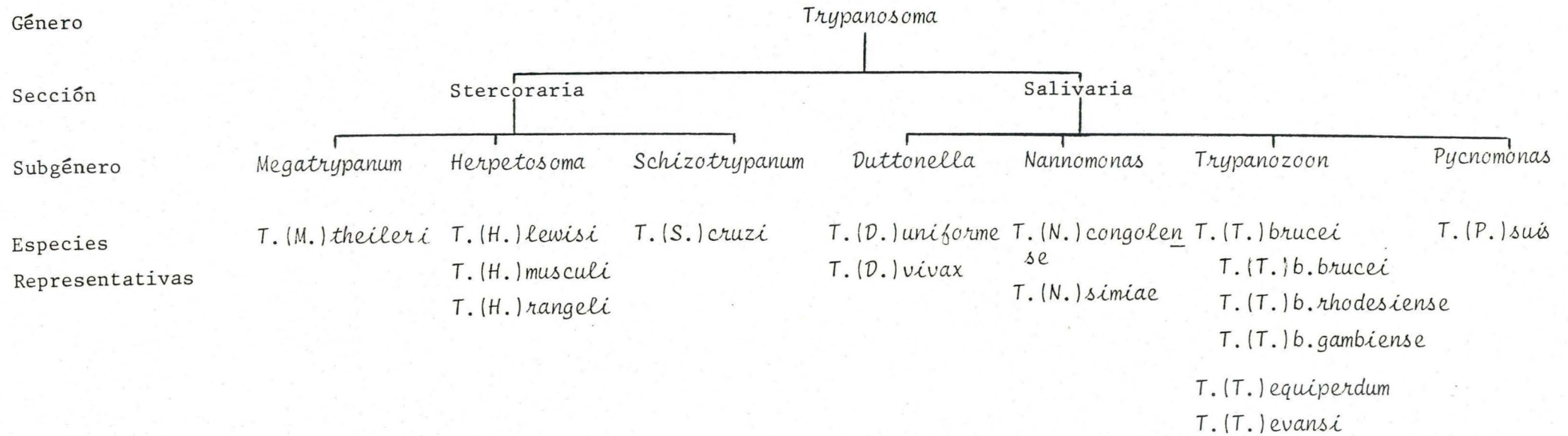
	Pro-	Opisto-	Epi-	Tripo-	Coano-	A-	Para-	Esfero-
<i>Leptomonas</i>	*					*		
<i>Crithidia</i>					*	*		
<i>Herpetomonas</i>	*	*					*	
<i>Blastocrithidia</i>	*		*			*		
<i>Rhynchoidomonas</i>				*				
<i>Endotrypanum</i>	*		*	*		*		
<i>Phytomonas</i>	*							
<i>Trypanosoma</i>	*		*	*		*		*
<i>Leishmania</i>	*					*	*	

La transmisión a los huéspedes vertebrados se produce a través de la inoculación durante el proceso de alimentación del vector o por la contaminación de las membranas de la piel o mucosas con heces conteniendo tripanosomas metacíclicos infectivos.

Los vectores son artrópodos hematófagos (insectos y arácnidos).

La reproducción en el huésped vertebrado es por una variedad de diferentes métodos de división celular; se piensa que no ocurren procesos sexuales en el vertebrado, pero recientes estudios usando isoenzimas sugerirían que los tripanosomas son diploides y ocurriría un intercambio de información genética en el vector (Molyneux y Ashford, 1983).

Tabla III.3.: Clasificación del género *Trypanosoma*



IV. Trypanosoma cruzi

IV.1. ENFERMEDAD DE CHAGAS

IV.1.1. Consideraciones generales

La enfermedad de Chagas lleva este nombre en homenaje a Carlos Chagas quien descubrió el organismo causal, *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909). A este protozoario, descubierto en Minas Gerais, Brasil, mientras observaba el contenido intestinal de un insecto hematófago de la familia *Ruduvidae*: *Pastrongilus megistus*, Chagas lo denominó *Trypanosoma cruzi* como reconocimiento a su maestro Oswaldo Cruz.

El parásito difiere marcadamente de los tripanosomas africanos. Además de las formas sanguíneas tripomastigotes, que no se dividen, hay pseudocistos en los tejidos conteniendo masas de amastigotes. La mayor parte de la patología es el resultado de los efectos de estos pseudocistos sobre las células musculares de sus huéspedes.

Las investigaciones de Chagas crearon las bases de los conocimientos actuales sobre la etiología, clínica y epidemiología de esta tripanosomiasis (Chagas, 1911). Describió el organismo responsable y los insectos vectores, identificó uno de los huéspedes reservorios y sugirió algunos de los síntomas clínicos asociados con la enfermedad.

En 1980, la Organización Mundial de la Salud, basándose en la distribución del vector, estimó que 35 millones de personas estaban expuestas a la infección.

La enfermedad de Chagas, está reconocida como una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en América del Sur y Central.

El *T. cruzi* tiene afinidad por el músculo cardíaco y por las células nerviosas del plexo mesentérico, provocando en este último caso dilataciones patológicas (megaesófago y megacolon).

La enfermedad se inicia en forma aguda y posteriormente pasa a formas crónicas. Sin embargo, se carece hasta el presente de drogas enteramente convenientes para curar esta condición crónica. Los vectores son relativamente resistentes a insecticidas organoclorados y además la aplicación y provisión de los mismos son alternativas relativamente costosas, considerando que vivien

das de bajo nivel socio-económico son excelentes habitats para estos insectos.

En la actualidad se realizan grandes esfuerzos para controlar la enfermedad de Chagas a través de programas nacionales, que consisten en la desinfección domiciliaria, particularmente de ranchos y otro tipo de locales precarios, en el mejoramiento de las viviendas, en la educación popular y en el desarrollo de compuestos activos contra el *T. cruzi*.

IV.1.2. Distribución

T. cruzi se encuentra ampliamente distribuido entre las latitudes 40 ° Norte y 40 ° Sur, en América del Sur y Central y en algunos de los estados del Sur de los Estados Unidos. Su identificación en huéspedes mamíferos se extiende desde Maryland (Estados Unidos) al norte, hasta Argentina y Chile, al sur. En prácticamente todos los países de América del Sur y Central se han confirmado parasitológicamente casos autóctonos. Sin embargo, las infecciones en animales están más extendidas que en humanos. Organismos de tipo *T. cruzi* existen también en algunas islas del Caribe y al Sur de los Estados Unidos, pero se carece de pruebas parasitológicas de enfermedad humana más al norte de Méjico.

IV.2. BIOLOGIA CELULAR

IV.2.1. Organismos. Formas desarrolladas

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

- Amastigote: Se la conoce también como esferomastigote, micro-mastigote, forma aflagelada o forma leishmania. Hoare y Wallace (1966) designaron con el nombre de amastigote a la forma multiplicativa intracelular de *T. cruzi* en el mamífero. Sin embargo, existen observaciones con microscopía electrónica y de contraste de fase que indicarían que estas formas presentan un corto flagelo, prefiriéndose en consecuencia, el nombre de esferomastigotes (Meyer y De Souza, 1976).

- Epimastigotes: Se localizan en el intestino del huésped 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 esferomastigotes se transforman en tripomastigotes o cuando en el comienzo del nuevo ciclo, ocurre la transformación inversa (Meyer y De Oliveira, 1948). Son organismos alargados, de 20-40 μm de largo. Tienen flagelo libre en la posición extrema y el cinetoplasto está localizado anterior al núcleo. Son capaces de dividirse.
- Tripomastigotes: Estas formas miden aproximadamente 25 μm de largo y 2 μm de diámetro. El cinetoplasto está situado en la región posterior al núcleo. Se observan en: a) células de los tejidos y sangre de los huéspedes mamíferos (forma circulante), b) intestino posterior, heces y orina del huésped invertebrado (forma metacíclica), c) en cultivos axénicos (fase estacionaria de crecimiento) y d) en cultivos celulares (fase líquida) (De Souza, 1984). No son capaces de dividirse.

IV.2.2. Ciclo de vida

El ciclo biológico de *T. cruzi* se inicia cuando los huéspedes invertebrados (usualmente insectos hematófagos pertenecientes a las familias Hemiptera y Reduviidae, tales como *Rhodinus prolixus*, *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, y otros) se alimentan mediante la ingesta de sangre de los huéspedes vertebrados infectados.

Los vectores se infectan y las formas sanguíneas ingeridas evolucionan a través de su tracto digestivo. En el estómago del insecto la mayoría de los tripomastigotes de la sangre se transforman en epimastigotes y en algunas formas redondeadas. En el intestino, los epimastigotes se dividen repetidamente mediante un proceso de fisión binaria y pueden adherirse a las células intestinales a través de hemidesmosomas (Zeledon y col., 1977). En el recto, una parte de los epimastigotes se transforma en tripomastigotes metacíclicos infectantes, que se eliminan por las heces (Dias, 1934; Brack, 1968; Brener, 1973; Brener y Alvarenga, 1976; Zeledon y col., 1977).

A través de lesiones en la piel o de membranas mucosas

normales , estas formas metacíclicas son capaces de penetrar en las células de los vertebrados donde se transforman en amastigotes, que se multiplican por fisión binaria, diferenciándose en tripomastigotes. Estos flagelados recientemente formados, son liberados de las células parasitadas, en el espacio intercelular; pueden alcanzar la corriente sanguínea y luego de circular, por un cierto período de tiempo, penetrar en otras células del huésped para llevar a cabo un nuevo ciclo tisular o quedan libres para ser ingeridos por otro insecto hematófago.

IV.2.3. Superficie celular

La membrana plasmática y cubiertas externas tienen fundamental importancia en la interacción parásito-huésped.

En la mayoría de las células eucariotas los microtúbulos y los microfilamentos están asociados con la membrana plasmática (Weatherbee, 1981). Sin embargo, en ningún otro tipo de células esta asociación es tan fuerte como en los tripanosomátidos donde estos dos componentes de la superficie celular (membrana plasmática y microtúbulos subpeliculares) permanecen asociados incluso después de la lisis del protozoo y aislamiento de la fracción enriquecida en membranas.

IV.2.3.1. Membrana plasmática

La membrana plasmática de *T. cruzi* está compuesta de proteínas, lípidos y carbohidratos, formando el glicocalix. Estudios citoquímicos y con microscopía electrónica, muestran que el glicocalix está presente en todos los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*, incluso en las formas intracelulares (De Souza y Meyer, 1976). El estudio de la superficie celular de *T. cruzi* con lectinas provee datos que muestran la existencia de diferencias cualitativas y cuantitativas en los carbohidratos expuestos sobre la superficie celular del parásito en los diversos estadios de su ciclo de vida (Alves y Colli, 1974; Chiari y col., 1978; Araujo y col., 1980; Szarfman y col., 1980; Pereira y col., 1980). También se estudió la aglutinación inducida por lectinas en varias cepas de *T. cruzi* y similares (Schottelius, 1982).

IV.2.3.2. Carga de superficie

La presencia de sitios aniónicos sobre la superficie de *T. cruzi* se demostró mediante el empleo de hidróxido de hierro coloidal y partículas de ferritina cationizada (Martínez Palomo y col., 1976; De Souza y col., 1978). Los datos bioquímicos así como la aglutinación de *T. cruzi* por la lectina de *Limulus polyphemus* y por la aglutinina de germen de trigo, también indican la presencia de ácido siálico sobre su superficie (Pereira y col., 1980).

IV.2.3.3. Cubierta celular

Se demostró por microscopía electrónica la presencia de material electrodensito sobre la unidad de membrana de la familia Trypanosomatidae. Esta estructura, denominada cubierta celular, es más evidente en las formas sanguíneas tripomastigotes que pertenecen a los subgéneros *Trypanosoon* y *Nanomonas*, donde alcanza un espesor de 15 nm (Vickerman, 1969).

La cubierta superficial se pierde en cultivos acelulares y después que el parásito entra al vector para un desarrollo cíclico. Sin embargo, reaparece cuando los parásitos se transforman en las formas metacíclicas en las glándulas salivales del huésped invertebrado.

Por microscopía electrónica se ha observado que la cubierta superficial de los tripomastigotes sanguíneos está formada por 5 a 10 millones de moléculas de una glicoproteína superficial variable (VSG). Las VSG_s forman una monocapa sobre la membrana plasmática, que constituye una barrera física para prevenir a los antígenos comunes de la membrana contra los anticuerpos del huésped (De Souza, 1984).

IV.2.3.4. Lisis del *Trypanosoma cruzi*

Los epimastigotes de *T. cruzi* se lisan al incubarlos en presencia de suero de mamífero, mientras que los tripomastigotes (tanto de cultivos axénicos, de cultivos de tejido, como de la corriente sanguínea) son resistentes (Muniz y Boriello, 1945; Nogueira y col., 1975).

Se demostró que esta lisis está mediada por un camino alternativo del complemento (Nogueira y col., 1975). Teniendo en cuenta que la lisis mediada por complemento involucra principalmente la participación de la superficie celular del parásito, es posible que la susceptibilidad de los epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* a este tipo de lisis refleje diferencias de sus propiedades de superficie.

IV.2.4. Microtúbulos subpeliculares

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 demostró que los microtúbulos están conectados entre sí y con la membrana plasmática, a través de cortos filamentos, de naturaleza aún desconocida (Hunt y Ellar, 1974; De Souza, 1976; Dwyer, 1980).

El análisis de secciones transversales de diferentes regiones de la forma tripomastigote de *T. cruzi* mostró que los microtúbulos están regularmente espaciados. Se observó además, que su número está relacionado con el diámetro de la célula y que varía de acuerdo al estadio del ciclo de la misma (Meyer y De Souza, 1976).

IV.2.5. Flagelo y cuerpo basal

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 sólo un flagelo, poseen dos cuerpos basales localizados muy cerca, y compuestos de nueve tripletes de microtúbulos. Los cuerpos basales de *T. cruzi* y otros tripanosomátidos no migran durante la división celular (De Souza, 1984).

IV.2.6. Mitocondria-cinetoplasto

El *Trypanosoma cruzi*, al igual que otros miembros de la familia Trypanosomatidae, posee una sola mitocondria de gran tamaño, que recorre todo su cuerpo celular, en una de cuyas ramificaciones se encuentra el DNA-mitocondrial, que integra el conjunto cinetoplasto-mitocondria (Simpson, 1972; Paulin, 1975).

Esta estructura, el cinetoplasto, es diagnóstica del orden Kinetoplastida al cual pertenece la familia Trypanosomatidae.

Durante el ciclo normal de vida de los tripanosomátidos hay cambios en la posición relativa del cinetoplasto con respecto al núcleo.

En los últimos 14 años se demostró en forma concluyente que en *T. cruzi* y en otros tripanosomátidos el cinetoplasto está formado por un DNA que posee una configuración especial (Simpson, 1972; Borst y Hoeijmayers, 1979; Kallinikova, 1981).

Riov y col. (Riov y Paoletti, 1967; Riov y Delain, 1969; Riov y Pautrizel, 1969; Brack y col. 1972; Riou y Yot, 1977) estudiaron en detalle el cinetoplasto de *T. cruzi*. Se estableció que el DNA-cinetoplástico representa entre 20 y 25% del DNA total de epimastigotes de *T. cruzi*. Por microscopía electrónica se demostró que el cinetoplasto consiste de una red de 20.000 a 30.000 moléculas de minicírculos asociadas unas con otras y con largas moléculas lineales. Cada minicírculo tiene un largo de aproximadamente 0,45 μm , que corresponde a aproximadamente 1.440 pares de bases y un peso molecular de $0,94 \times 10^6$ (Riov y Delain, 1969).

Recientemente, la digestión del DNA-cinetoplastico de *T. cruzi* con endonucleasas de restricción, seguido del análisis electroforético de los fragmentos en geles de gradiente de poliacrilamida, se empleó para la caracterización de stocks, cepas y clones (Morel y Simpson, 1980; Morel y col., 1980).

IV.2.7. Retículo endoplásmico, ribosomas y complejo de Golgi

El retículo endoplásmico tanto liso como rugoso se observó en *T. cruzi*, así como en otros tripanosomátidos. Estas estructuras se evidencian especialmente en la región perinuclear y en

la región entre el núcleo y el bolsillo flagelar.

Los ribosomas se distribuyen a través del citoplasma de *T. cruzi*. Están compuestos de proteína (45%) y RNA (55%) (Tanowitz y col., 1975; Castro y col., 1981).

El complejo de Golgi está siempre presente en *T. cruzi* y se localiza entre el núcleo y el cinetoplasto, en la región cercana al bolsillo flagelar.

IV.2.8. Núcleo

El núcleo de *T. cruzi* tiene una organización estructural similar a la encontrada en otras células eucarióticas.

Es pequeño y mide alrededor de 2,5 μm .

En tripomastigotes, es alargado y se localiza en la porción central de la célula. En esferomastigotes y epimastigotes, tiene forma redondeada. Posee una típica membrana nuclear, provista de poros. Aproximadamente en el centro del núcleo, se encuentra el nucleolo.

IV.2.9. Microcuerpos. Glicosomas

Los tripanosomátidos son hemoflagelados parasíticos que se identifican por tener dos características típicas: la organización excepcional de su DNA mitocondrial, el DNA-cinetoplasto (Borst y Hoeijmakers, 1979) y la presencia de organelas similares a microcuerpos llamadas glicosomas (Opperdoes y Borst, 1977).

Estos glicosomas contienen las primeras enzimas del camino glicolítico, Adenilato kinasa y Orotato fosforibosiltransferasa y Orotiden-5'-fosfatodecarboxilasa, dos enzimas del camino biosintético de las pirimidinas (Taylor y col., 1980; Hammond y Gutteridge, 1982).

Opperdoes y Cottlem (1982) obtuvieron datos indicando que los glicosomas de los tripanosomátidos están involucrados en la fijación de dióxido de carbono. Asimismo, Hammond y Gutteridge (1982, 1983) mostraron su participación en la biosíntesis de novo de pirimidinas.

Esta estructura, a veces llamada peroxisoma, parece ha-

berse adaptado en los tripanosomátidos para desempeñar otros roles funcionales además de aquellos descritos para los peroxisomas de mamíferos (Vickerman y Preston, 1976; Mc Ghee y Cosgrove, 1980; De Souza, 1984). Los glicosomas aparentemente serían microcuerpos altamente especializados en la degradación de glucosa, más que en el metabolismo del peróxido de hidrógeno.

IV.3. ESTUDIOS BIOQUIMICOS

Existen dos aspectos fundamentales que requieren un profundo conocimiento de la bioquímica del *T. cruzi*. Uno, es la búsqueda de una quimioterapia racional adecuada. Es decir elucidar las vías metabólicas del parásito y del huésped, con el objeto de encontrar diferencias y a partir de las mismas, procurar la inhibición de una enzima o una vía metabólica en el parásito, sin afectar o afectando muy poco la vía correspondiente del huésped. El caso ideal es cuando se encuentra que un camino metabólico está ausente en el huésped pero presente y de considerable importancia en el parásito, de forma tal que su inhibición lleve a la muerte del mismo. Es por este motivo que desde hace varios años se han estudiado diversas vías metabólicas en el *T. cruzi* (Piessmann Camargo, 1978; Juan y col., 1979; Cazzulo y col., 1980; Franke de Cazzulo y Cazzulo, 1982) a fin de aportar diferencias que puedan ser importantes para el diseño de nuevos agentes tripanomicidas. El otro aspecto, es el relacionado con estudios epidemiológicos, para los cuales es trascendental llevar a cabo una clasificación taxonómica adecuada de cepas, especies, clones dentro de cepas, etc. Considerando que la enfermedad de Chagas, presenta una serie de variaciones en su sintomatología clínica que también se pueden relacionar con la procedencia geográfica de los pacientes, es probable que las mismas provengan de desigualdades en las poblaciones de parásitos.

Las implicaciones quimioterapéuticas de las diferencias entre el metabolismo de *T. cruzi* y su huésped mamífero, fueron discutidas por Gutteridge en 1978.

Un gran caudal de información sobre la bioquímica básica del *T. cruzi* proviene de experiencias llevadas a cabo con la forma de cultivo epimastigote (Brenner, 1973; Von Brand, 1973; Bowman y Flynn, 1976; Gutteridge, 1976; Gutteridge y Coombs,

1977).

Una de las principales críticas al uso de estas formas como representantes de *T. cruzi* es el hecho de que no son infectivas para vertebrados. Cuando inoculadas en ratones o incubadas *in vitro* en la presencia de macrófagos de ratones normales, son fagocitadas y digeridas (Nogueira y Cohn, 1976). En consecuencia, sería más interesante trabajar con formas sanguíneas tripomastigotes o con esferomastigotes intracelulares o con ambos, que son las formas encontradas en el huésped vertebrado y directamente responsables de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, es difícil su obtención en las cantidades adecuadas para estudios bioquímicos, aunque se han hecho algunos progresos en los últimos años (Gutteridge y col., 1978; Villalta y Leon, 1979; Carvalho y col., 1981). Sin embargo, no son muchos los laboratorios que están equipados con grandes cantidades de estas formas patogénicas.

Es importante señalar aquí, que en los pocos estudios bioquímicos y citoquímicos llevados a cabo con epimastigotes y tripomastigotes no se detectaron diferencias fundamentales (Gutteridge y Rogerson, 1979; Meirelles y col., 1982). Altos niveles de hexoquinasa, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa indican que la glucólisis es funcional en las tres formas (Rogerson y Gutteridge, 1980)

La operación de la vía glicolítica y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos en *T. cruzi* depende del transporte de electrones a nivel de la cadena respiratoria que involucra flavoproteínas y citocromos (Stoppani y Boiso, 1973). Así se ha demostrado que el parásito puede utilizar glucosa, acetato y piruvato (Boiso y Stoppani, 1973) como fuentes de energía.

La operación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos depende del funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial que contiene citocromos a, b y c₅₅₈, ubiquinona, y que es sensible a antimicina y cianuro (Boiso y Stoppani, 1973; Docampo y col., 1978). La operación de esta cadena respiratoria lleva a la fosforilación oxidativa como fue demostrado por medidas directas del pool de adenilato (ATP, ADP, AMP) cuya carga energética decrece luego de la adición de desacoplantes o inhibidores mitocondriales (Boiso y Stoppani, 1972).

Se ha reportado que los cambios de provisión de oxígeno

y la composición del medio, especialmente en lo relativo a los compuestos hemínicos, afectan marcadamente el crecimiento de *T. cruzi* en medios de cultivo (Docampo y col., 1974). Estos cambios se explican sobre la base de que la forma de cultivo del *T. cruzi* requiere una cadena respiratoria efectiva para su crecimiento.

El sistema de transporte de electrones del *T. cruzi* ha llamado la atención y diversos estudios se han llevado a cabo para lograr la comprensión de la función de sus citocromos. Baernstein y Tobie (1955), fueron los primeros en identificar citocromos con fuertes bandas de absorción a 556-560 nm y más débiles bandas a 532 y 600 nm. Estas bandas fueron confirmadas espectroscópicamente por Stoppani y Boiso (1973) y por Agosin y col., (1976). La banda a 556-560 nm involucra al citocromo b y al c_{558} mientras que la banda de 603 nm corresponde al citocromo a + a_3 . El citocromo C_{558} es un citocromo c modificado que fue purificado por Hill (1972) e identificado por picos en la forma reducida a 558, 525 y 421 nm. La Oxidasa (citocromo a + a_3) tiene aparentemente alta especificidad hacia el citocromo C_{558} ya que el citocromo c reducido de mamíferos no es oxidado por fragmentos mitocondriales de *T. cruzi*. Docampo y col. (1978) han demostrado que las membranas mitocondriales contienen 0,05 nmol oxidasa a + a_3 /mg proteína con un máximo de absorción a 602 nm.

Agosin y col. (1976) y Rogerson y Gutteridge (1977) reportaron la presencia de un compuesto que es un monóxido de carbono en *T. cruzi*, que se identificó como citocromo cero. Este citocromo cero de los Kinetoplastidae podría funcionar como una oxidasa alternativa en la respiración cianuro insensible (Hill y Anderson, 1970; Ray y Cross, 1972; Hill y Cross, 1973; Hill, 1976). Sin embargo diversos grupos de investigadores han dudado acerca de la existencia efectiva de este citocromo.

Las observaciones de Stoppani y col. (1980) y aquellas presentadas por Rogerson y Gutteridge (1977) confirman la presencia de una cadena respiratoria mitocondrial en los epimastigotes de *T. cruzi*. Esta cadena incluye una oxidasa terminal cianuro-insensible, citocromo c_{558} y especies de citocromo b.

El ciclo de los ácidos tricarbónicos (Rogerson y Gutteridge, 1980) y la cadena de citocromos sería funcional en las 3 formas (Rogerson y Gutteridge, 1979) de *T. cruzi*. Pero a pesar

de existir esta cadena respiratoria, los niveles de algunos de sus componentes son muy bajos y su nivel de actividad no sería suficiente para reoxidar el NADH glucolítico. Este tripanosomátido puede, entonces, recurrir a una variación del metabolismo, difiriendo así de la vía tradicional. Se requiere en consecuencia, una fermentación aeróbica que consiste en la fijación de dióxido de carbono y producción y excreción de succinato (Bowman y col., 1963). Las enzimas involucradas en la fermentación aeróbica y su regulación serían fundamentalmente la Carboxiquinasa fosfoenolpirúvico (PEPCK) y la enzima Málica (Cannata y Cazzulo, 1984). Desde el punto de vista fisiológico es esencial una estricta regulación concertada de la actividad de ambas enzimas, para evitar un reciclado fútil del ácido dicarboxílico de 4 carbonos producida por la Carboxiquinasa, el cual sería de carboxilado nuevamente y vuelto al nivel de ácido monocarboxílico de tres carbonos por la enzima málica (Cannata y col., 1980).

Otro metabolismo particular del *T. cruzi* es el del peróxido de hidrógeno.

La habilidad de los organismos para prevenir la acción letal de los intermediarios de la reducción parcial del oxígeno, depende del contenido de Superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa.

En el *T. cruzi* se genera H_2O_2 por medio de enzimas mitocondriales, microsomales y citosólicas; la producción total de H_2O_2 corresponde al 4% del consumo endógeno de los epimastigotes (Boveris y col., 1977). Los parásitos contienen Superóxido dismutasa, pero no contienen catalasa al igual que los tripanosomas africanos (Fulton y col., 1956) y tampoco presentan actividad de peroxidasa.

Los resultados obtenidos por Boveris y col. (1980) muestran que sólo se detecta actividad de peroxidasa con ascorbato como dador de electrones, pero no con pirogalol, guayacol y citocromo c reducido. El cianuro de potasio inhibe la actividad de Ascorbato peroxidasa.

De manera que el *T. cruzi* es un organismo que no está capacitado para detoxificar H_2O_2 ; además de la ausencia de catalasa, no se encuentra actividad de Glutation peroxidasa en extractos de epimastigotes (Boveris y col., 1980). La Ascorbato peroxidasa (Sies y col., 1979) parece ser el único mecanismo por

el cual *T. cruzi* metaboliza H_2O_2 ; sin embargo la inactividad observada con otros sustratos típicos para peroxidasas como pirogalol, guayacol y citocromo c reducido, hacen dudar del significado fisiológico de la enzima.

Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos realizados no se ha conseguido hasta el momento el diseño de un agente terapéutico adecuado para el caso de la enfermedad de Chagas.

Teniendo en cuenta que los hemoflagelados a diferencia de sus huéspedes vertebrados no sintetizan hemo, consideramos de interés estudiar la posibilidad de aprovechar este metabolismo anormal como alternativa bioquímica.

V. Crithidia deanei

V.1. SIMBIOSIS INTRACELULAR

El estudio de la simbiosis intracelular tiene una relevancia fundamental para el entendimiento de muchos problemas biológicos, incluyendo el origen de las células eucarióticas y la colonización y sobrevivencia de los parásitos dentro de las células (Margulis, 1970; Bannister, 1979). El estudio de los tripanosomátidos puede aportar conocimientos respecto a algunos de estos problemas.

Este grupo de flagelados incluye especies que son parásitos intracelulares de diversos huéspedes (Hoare, 1972; Vickerman, 1976; Zuckerman y Lainson, 1977) y también otras especies que son ellas mismas huéspedes de simbioses intracelulares. Entre estas últimas, se sabe de la existencia de tres especies que poseen endosimbiontes de tipo bacteriano: *Blastocrithidia culicis*, *Crithidia oncopelti* y *Crithidia deanei* (Novy y col., 1907; Newton y Horne, 1957; Mundim y col., 1974).

V.2. ENDOSIMBIOTES

Los endosimbiontes bacterianos de *B. culicis*, *C. oncopelti* y *C. deanei* están integrados con la fisiología de la célula huésped (Mc Ghee y Cosgrove, 1980).

Se trata de estructuras rodeadas por una doble membrana. La membrana interna se interpreta como la membrana plasmática del simbiote y la externa se interpreta como parte del sistema de membrana de la célula huésped (Mc Ghee y Cosgrove, 1980).

Se han llevado a cabo diversos trabajos con el objeto de evaluar la contribución tanto nutricional como bioquímica de los simbioses a las células huésped. Chang y col. (1975) como se citó anteriormente, elucidaron la participación del simbiote en la síntesis de compuestos hemínicos por *C. oncopelti* y *B. culicis*, así como en el metabolismo de poliaminas (Chang y Dave, 1980). Camargo y col. estudiaron la participación de los simbioses en el metabolismo ornitina-arginina, de los tripanosomátidos (Camargo y Freymuller, 1977; Figueredo y col., 1978; Galinari

y Camargo, 1978; Yoshida y Camargo, 1978) y en el camino metabólico para la biosíntesis de isoleucina (Alfieri y Plessmann Camargo, 1982). En todos los casos, la presencia del endosimbionte aumentó las capacidades biosintéticas de los huéspedes tripanosomátidos.

V.3. Crithidia deanei

Crithidia deanei difiere de otras especies de *Crithidia*. Requerimientos nutricionales tan simples como los que presenta *Crithidia deanei* sólo tienen como paralelo en la literatura a los de *C. oncopelti*. Estos dos flagelados escapan enteramente al patrón nutricional característico de los tripanosomátidos de insectos cultivados hasta el presente en medio definido.

Los únicos aminoácidos esenciales para *C. deanei* son metionina y tirosina. *C. oncopelti* requiere apenas metionina (Newton, 1956). *C. deanei* fue incapaz de crecer con metionina como único aminoácido adicionado al medio.

C. deanei no requiere hemina o ninguna otra porfirina. Tampoco exigen este compuesto *C. oncopelti* y los organismos que Lwoff (1951) hace referencia como *Strigomonas parva* y *S. media* y que posteriormente se consideraron como *Crithidia luciliae*, variedad parva y variedad media, respectivamente (Wallace, 1966). Sin embargo, *Crithidia deanei* presenta como ventaja sobre *C. luciliae* un crecimiento óptimo dentro de un rango más amplio de valores de pH (5,5 a 7,0). *C. deanei* no requiere purina para su crecimiento. Newton (1956) describe el requerimiento de adenina para *C. oncopelti*. En un trabajo posterior, este autor demostró que la purina no es necesaria cuando PABA está presente en el medio (Newton, 1957).

La hipótesis que se levanta explicando estos simples requerimientos nutricionales de *C. deanei* es la presencia de endosimbiontes.

Los estudios de microscopía electrónica permitieron observar la existencia de estructuras en el citoplasma de *C. deanei*, semejantes a los corpúsculos bipolares encontrados en *C. oncopelti* (Newton y Horne, 1957; Gutteridge y Macadam, 1971).

para *C. deanei*. La provisión de nutrientes por los simbiosomas a las células huésped se observó en diversos protozoarios. Así, la presencia de partículas lambda en *Paramecium*, lo torna independiente de una fuente exógena de ácido fólico. Cuando en *Blastocrithidia culicis* y *Crithidia oncopelti*, se eliminan los "diplosomas" y corpúsculos bipolares respectivamente, por el tratamiento sucesivo con cloramfenicol, pasan a exigir hemina (Chang y Trager, 1974) para su crecimiento.

A excepción de pequeñas diferencias estructurales, los corpúsculos bipolares de *C. deanei* son esencialmente idénticos a los descritos para *C. oncopelti* por Gutteridge y Macadam (1971). Como resaltan estos autores, el aspecto de los corpúsculos bipolares parece apartar la posibilidad de tratarse de un componente celular normal o alterado, asemejándose más a una célula bacteriana. La posibilidad de que los corpúsculos bipolares de *C. deanei* sean organismos semejantes a rickettsias también se analizó, dada la similitud de los mismos con los simbiosomas de tipo rickettsia, *Wolbachia* spp. encontrados en las Montañas Rocosas (Burgdorfer y col., 1970) o con rickettsias patogénicas (Anderson y col., 1965). La semejanza con rickettsias se sugiere por la membrana externa ligeramente ondulada, que probablemente representa la membrana celular de este bacteroide y no la membrana limitante de una vacuola citoplasmática de *C. deanei*. La constante yuxtaposición de la membrana externa a la membrana interna y la presencia de dos membranas, incluso en los corpúsculos bipolares observados después de la ruptura de las células con tergitol, refuerzan la suposición de que estas estructuras sean bacteroides (Mundim, 1975).

Crithidia deanei, obviamente, provee condiciones favorables al endosimbionte como por ejemplo, factores de crecimiento, medio físico e incluso energía, como se observó con *Chlamydia psittaci* que utiliza energía de la célula huésped (Weiss y Wilson, 1969).

Las diferencias entre el requerimiento de cultivo de *C. deanei* y otros tripanosomátidos inferiores podrían contribuir, entre otras cosas, al desarrollo de medios de cultivo para rickettsias y organismos semejantes. Con la única excepción de *Rickettsia quintana*, que requiere hemina (Myers y col., 1972) ninguna otra rickettsia u organismo similar, se pudo crecer en medio libre de células (Weiss, 1973).

Por otro lado, la presencia de bacterias endocitoplasmáticas en *Bodo saltans* (Brooker, 1971), perteneciente a un grupo considerado ancestral de la familia Trypanosomatidae, sugiere que la presencia de simbiosis en el orden Kinetoplastida podría considerarse como anterior a la aparición de la familia Trypanosomatidae.

**MATERIALES
Y METODOS**

I. MATERIALES Y METODOS

I.1. EQUIPOS UTILIZADOS

- Centrífugas: analítica Rolco modelo CM-36.Refrigerada Sorvall RC-5B. Ultracentrífuga Sorvall OTD 65B.
- pHmetro: Altronix
- Espectrofotómetro: Beckman modelo DB o Metrolab RC 325 BD.
- Sonicador: Sonifier Cell Disruptor MSE modelo W 185.

I.2. REACTIVOS

La mayoría de los reactivos empleados se obtuvieron de Merck, Difco o Sigma Chem. Co.

PBG, protoporfirina IX, mesoporfirina IX y deuteroporfirina IX se obtuvieron de Burnham, Porphyrin Products, UTAH-USA.

DOVA se preparó de acuerdo al procedimiento descrito por Dörnermann y Senger (1980).

I.3. FUENTES ENZIMATICAS

I.3.1. Trypanosoma cruzi

I.3.1.1. Cepas empleadas

En las experiencias realizadas se emplearon tres cepas:

- Cepa Tulahuén o (Tulo): Fue suministrada por los Dres. Roberto Docampo y Andrés O.M. Stoppani del Centro de Investigaciones Bioenergéticas (CIBIERG), Facultad de Medicina, UBA.
- Cepa Y: Fue gentilmente cedida por el Dr.F.Nery Guimarães del Instituto Oswaldo Cruz al Instituto de Biofísica, UFRJ, R.J., Brasil; donde se mantuvo durante 10 años por crecimiento en medio LIT o Warren.

- Cepa CL: Fue provista por el Departamento de Parasitología de la Universidad de Minas Gerais al Instituto de Biofísica de la UFRJ, R.J., Brasil, donde se mantuvo durante 6 años por crecimiento en medio LIT o Warren.

I.3.1.2. Cultivo y crecimiento de *T. cruzi*

Los epimastigotes de *T. cruzi* pueden cultivarse axénicamente en medios líquidos bifásicos, monofásicos o químicamente definidos.

Generalmente, para el mantenimiento y crecimiento de *T. cruzi* los laboratorios usan indistintamente uno de los siguientes medios líquidos: Warren (1960) y el medio LIT (Camargo, 1964).

I.3.1.21. Medio LIT

El medio LIT (Liver-Infusion-Tryptose) fue inicialmente diseñado, en la década del 60, por el Dr. R. Yaeger de la Universidad de Tulane. El primer trabajo de crecimiento de *T. cruzi* en LIT corresponde a Camargo (1964). Desde entonces, el medio LIT ha sido de uso común en algunos laboratorios y los cultivos de *T. cruzi* pueden mantenerse ininterrumpidamente en LIT durante aproximadamente 20 años.

I.3.1.22. Composición del medio LIT

Cloruro de sodio (NaCl)	4,0 g
Cloruro de potasio (KCl)	0,4 g
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄)	8,0 g
Glucosa	2,0 g
Triptosa (Difco o Oxoid)	5,0 g
Infusión de hígado (Difco)	5,0 g
Hemina (Sigma) (*)	25,0 mg
Suero (**)	100,0 ml
Agua destilada c.s.p.	1.000,0 ml

(*) La hemina puede disolverse en trietanolamina o en hidróxido de sodio, para dar soluciones stock de 50 mg/ml.

(**) Puede usarse suero fetal bovino, bovino ó de ternero.

I.3.1.23. Preparación del medio LIT

Después de disolver los componentes del medio en agua, se ajusta el pH a 7,2 con HCl concentrado. El medio es entonces filtrado a través de membranas EKS-Seitz, bajo presión negativa. Antes o después de filtrar, el medio debe calentarse durante 60 minutos a 68 °C, para inactivar el suero.

Se prefiere no agregar antibióticos al medio LIT, pero pueden adicionarse Ampicilina (10 mg/ml) o Penicilina más Streptomina (100.000 unidades y 100.000 microgramos respectivamente por litro).

El medio LIT filtrado e inactivado puede almacenarse durante meses a - 20 °C.

I.3.1.24. Preparación del medio Warren

I.3.1.24 a. Preparación del medio Warren (para el crecimiento de las cepas Y y CL de *T. cruzi*)

- Preparación de la solución acuosa de Infusión de Cerebro-Corazón: Para la preparación de 1.000 ml de medio Warren de cultivo se disuelven 37 g de infusión de cerebro-corazón en agua destilada. Esta solución acuosa se distribuye en frascos de Roux, en volúmenes de 90 ml y se esteriliza en autoclave a 120 °C durante 15 a 20 minutos. A cada botella de Roux, ya estéril, se le agregan 10 ml de suero hemoglobina (SHB).
- Preparación de Hemoglobina bovina: Se recoge sangre bovina sin anticoagulante. Después de la retracción del coágulo, se descarta el suero y se lo quiebra, filtrándolo a través de gasa. El filtrado se centrifuga a 10.000 rpm (en centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B Rotor SS34) durante 15 minutos y se descarta el sobrenadante. La hemoglobina precipitada se lava dos veces con solución salina de buffer fosfato (PBS). El precipitado se resuspende en agua destilada en proporción 1:10. Esta solución se conserva en congelador.

- Composición de PBS:

Cloruro de sodio	8,5 g
Fosfato diácido de potasio	2,54 g

Fosfato disódico	7,24 g
Agua destilada c.s.p.	1.000,00 ml

Después de disolver los componentes del buffer PBS, se ajusta el pH a 7,2.

Por cada litro de medio Warren preparado, se requieren 100.000 UI de Penicilina, las cuales son agregadas directamente a la solución SHB ya esterilizada.

- Preparación de Suero-Hemoglobina (SHB): El procedimiento consiste en mezclar 80% de suero (suero de ternera reactivado a 56 °C 10 minutos - Lab. Microbiológica Rio Janeiro) con 20% de hemoglobina.

La solución de SHB se clarifica en filtro SEITZ (SEITZ-Filter Schichten, Sorte EKS, 6 cm) con membrana clarificante. Luego se esteriliza en filtro SEITZ con membrana esterilizante (placa EKS-SEITZ, 6 cm). Finalmente se realiza el test de esterilidad a 37 °C durante 48 horas. El aspecto cristalino es indicador de pureza, en tanto que la turbidez señala la presencia de contaminación, siendo necesaria su verificación al microscopio óptico.

I.3.1.24 b. Medio Warren modificado (Cepa Tulahuén - Tulo, de *Trypanosoma cruzi*)

La composición del mismo por cada 1.000 ml es 37 g de infusión de cerebro-corazón (Laboratorios DIFCO, Detroit, MI, USA), 20mg de hemina (tipo III, equina) disueltos en trietanolamina (50%, v/v) y 40 ml de suero de ternera, inactivado a 56 °C y filtrado.

I.3.1.25. Crecimiento y mantenimiento de *T. cruzi*

Los cultivos de *T. cruzi* se crecieron en los medios líquidos complejos monofásicos de LIT (Camargo, 1964) y Warren (Warren, 1960) a 26-28 °C, en semianaerobiosis y oscuridad. Se emplearon botellas de Roux, conteniendo entre 50 y 100 ml de medio previamente esterilizado en un autoclave apropiada durante 20 minutos.

Se usaron epimastigotes de la fase log o cultivos del comienzo del plateau para sembrar nuevos cultivos. La concentración inicial de cultivos fue de aproximadamente $2-5 \times 10^6$ flagelados/ml. El tiempo de generación media es alrededor de 24 horas. A la semana, los cultivos alcanzaron $5-10 \times 10^7$ células/ml. Para mejores rendimientos es aconsejable la agitación, aunque una agitación violenta es siempre dañina.

Luego de un determinado número de días después de la inoculación (5 a 7), las células se cosechan y lavan con cloruro de sodio (0,15 M).

El número de células (cepas Y y CL) se contó en cámara de Neubauer y/o en contadores de células electrónicos, después de la dilución de las muestras en formol conteniendo solución salina (1%, v/v). La concentración final de epimastigotes de la cepa Tulo se estimó midiendo la absorbancia de las suspensiones a 670 nm, previa obtención de una curva de calibración con suspensiones de epimastigotes de concentración conocida por recuento en cámara cuentaglóbulo. Con este método se encontró una relación lineal entre los valores de absorbancia y de concentraciones celulares (Docampo y col., 1978).

Los stocks de *T. cruzi* son mantenidos por repiques semanales en tubos de ensayo.

- Repique: El repique o inoculación es el pasaje de un cultivo de *T. cruzi*, exento de contaminación para el medio LIT o Warren. Este procedimiento se realizó al 7° día con cultivos de *T. cruzi* crecidos a 28 °C. La proporción es de 10 a 20% de inóculo; o sea se agregan 10 a 20 ml de *T. cruzi* a cada botella de Roux conteniendo 90 ml de medio.
- Curva de crecimiento: La curva de crecimiento tiene como objetivo verificar en la práctica las fases del crecimiento del microorganismo a través del conteo del número de células durante intervalos de tiempos iguales.
- Procedimiento para la preparación del inóculo: Antes de realizar el conteo del número de células presentes en los frascos de Roux, conteniendo *T. cruzi* de 7 días, se hace un examen microscópico para verificar la ausencia de contaminación y al mismo tiempo evaluar el factor de dilución necesario para el con

teo y la viabilidad de las células. Si el examen fue positivo, se procede al conteo del número de células haciendo una dilución 1:100 con PBS, en tubos de ensayo, a los efectos de no contaminar la botella de Roux. Finalmente se agrega el volumen de inóculo que es necesario adicionar al medio para tener una concentración de 10^5 células/ml.

Todas estas operaciones se llevan a cabo dentro de la cámara aséptica de flujo laminar, siendo el *T. cruzi* manipulado con todas las técnicas y precauciones posibles a fin de evitar cualquier tipo de contaminación.

- Curva de crecimiento (Ejemplo: en Medio Warren). Etapas:

- 1) Se prepara la solución de infusión de cerebro-corazón, se esteriliza y conserva en cámara fría.
- 2) Preparación y esterilización del suero-hemoglobina, a través de la membrana esterilizante y del filtro SEITZ.
- 3) Preparación del medio Warren en la cámara aséptica y colocación en la estufa para el test de esterilidad durante 48 horas a 37 °C.
- 4) Pasaje del medio Warren a tubos de ensayo con tapa, dentro de cámara aséptica. Colocarlos en la estufa pro-esterilidad durante 48 horas a 37 °C.
- 5) Se realiza el pasaje de un cultivo de microorganismos para el medio Warren en los tubos en la proporción de 10 a 15%. Antes de este pasaje se determina la concentración de microorganismos (número de células/ml) a través de un examen microscópico. Inmediatamente se hace una dilución de las células con PBS en la proporción 1:10 ó 1:100 según la evaluación visual de la concentración de células y se realiza el conteo de las mismas en una cámara de Neubauer. Se determina el número de células/ml.

Observaciones: Es imperativo realizar un examen al microscopio de carácter cuali y cuantitativo de todo cultivo de *T. cruzi*, antes del repique del mismo para el medio nutritivo. Este examen determinará la existencia de contaminación por otros microorganismos que invalidarían los resultados experimentales.

obtiene el inóculo de concentración correspondiente a 10^6 células/ml.

I.3.1.3. Extracción de la proteína enzimática

I.3.1.31. Preparación del homogenato

Al precipitado lavado de epimastigotes se le agregó perlas de vidrio (5 g/g células, peso húmedo) y se molió en un mortero durante 5 minutos, a 4 °C. Este procedimiento resulta en la completa ruptura de las células como se reveló por microscopía de contraste de fase (Docampo y Stoppani, 1979). El homogenato se suspendió en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 o eventualmente en buffer fosfato 0,05 M según los requerimientos de las actividades enzimáticas a determinar. La mayor parte de las perlas de vidrio se separó por decantación y la suspensión se centrifugó a 580 x g durante 10 minutos. Se descartó el precipitado (fracción nuclear-flagelar) y se conservó el sobrenadante para la determinación de precursores, porfirinas, hemo y actividades enzimáticas.

I.3.1.32. Fraccionamiento subcelular

En algunas experiencias, según se indique el homogenato obtenido por el procedimiento descrito en I.3.1.31. se sometió a centrifugación diferencial.

Las fracciones obtenidas fueron: a) fracción nuclear-flagelar, sedimentada a 580 x g durante 10 minutos; b) fracción mitocondrial, sedimentada a 30.000 x g durante 20 minutos; c) fracción microsomal, sedimentada a 105.000 x g durante 60 minutos y d) fracción sobrenadante. Las fracciones subcelulares a) y b) fueron lavadas con buffer fosfato de potasio 0,05 M pH 7,8, sacarosa 0,25 M y la fracción c) se lavó con buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4; cloruro de potasio 0,15 M.

I.3.2. Criithidia deanei

I.3.2.1. Cepas empleadas

Criithidia deanei, ATCC 30255, fue aislada del insecto *Z. leucogramus* por Galvão y col. (1970) y presenta como característica un endosimbionte, posiblemente de origen bacteriano.

La muestra aposimbiótica se obtuvo artificialmente, mediante el empleo de altas dosis de cloramfenicol (Mundim y Roitman, 1977).

I.3.2.2. Cultivo y crecimiento del tejido

I.3.2.2.1. Mantenimiento del tejido

Criithidia deanei (conteniendo endosimbionte) se mantuvo en un medio químicamente definido (Roitman y col., 1972), sin hemina.

La cepa aposimbiótica requirió nicotinamida (3 mg%) y hemina (1 µg%), los cuales fueron agregados al mismo medio definido (Mundim y Roitman, 1977).

El medio en alícuotas de 5,0 ml se distribuyó en tubos de rosca de 18 x 150 mm y se autoclavó a 120 °C, durante 20 minutos. Después del crecimiento a 28 °C durante 48 horas, los cultivos sembrados se guardaron en heladera. Las muestras se repicaron semanalmente.

I.3.2.2.2. Obtención de la masa de células

Para los experimentos, las células se crecieron en frascos de 3 litros conteniendo 1,5 litros del medio definido citado en I.3.3.2.1. El medio se autoclavó a 120 °C durante 20 minutos. El inóculo consistió de 30 ml de cultivos de 48 horas; se inocularon alrededor de 6×10^7 células /ml por frasco. La incubación se llevó a cabo en reposo, a 28 °C, durante 48 horas.

Después del crecimiento las células se recogieron por centrifugación a 2.000 x g durante 10 minutos y se lavaron 2 veces con buffer Tris-HCl 25 mM, sacarosa 250 mM, cloruro de potasio 5 mM, pH 7,0, en frío.

I.3.2.23. Conteo de los microorganismos

El conteo de los microorganismos se realizó mediante el empleo de una cámara hematocitométrica de Neubauer (Neubauer Improved Chamber).

I.3.2.3. Extracción de la proteína enzimática

Al precipitado de células lavado, obtenido según el procedimiento descrito en I.3.3.22. se le agregó perlas de vidrio (5 g/g células, peso húmedo) y la mezcla se molió en mortero durante 5 minutos a 4 °C. Este procedimiento resultó en la completa ruptura de las células, como se reveló por microscopía de contraste de fase. La mayor parte de las perlas de vidrio se separó por decantación. Las células rotas se resuspendieron en buffer Tris-HCl (25-50 mM) o en buffer fosfato (25-50 mM), aproximadamente 10 ml/g células (peso húmedo) a los pH's indicados, dependiendo de la enzima bajo estudio. La suspensión se centrifugó a 580 x g durante 10 minutos; el precipitado se descartó y el sobrenadante se empleó para medir actividades enzimáticas y contenido de precursores, porfirinas y hemo libre.

I.4. DETERMINACION DE LOS PRECURSORES ALA Y PBG

1,6 ml del sobrenadante de la centrifugación a 580 x g del homogenato, se desproteinizó por el agregado de 0,16 ml de TCA 50%. Se agitó vigorosamente y el precipitado proteico fue separado por centrifugación a baja velocidad. En el sobrenadante se determinó la presencia de ALA y PBG, por el método de Mauzerall y Granick (1956).

I.5. DETERMINACION DE PORFIRINAS

I.5.1. Libres

9 g de epimastigotes de *T. cruzi* (peso húmedo), fueron tratados con 90 ml de una mezcla acetato de etilo:ácido acético

te 15 minutos a baja velocidad y el extracto orgánico se lavó 4 veces con porciones de 25 ml de agua cada vez, para eliminar el ácido. Se controló la existencia de fluorescencia. La fase acetato de etilo se expuso a la luz durante 15 minutos; se extrajo con pequeños volúmenes de HCl 10% (Rimington, 1960) y se leyeron las absorbancias a 380 y 430 nm, y la absorbancia máxima, calculándose el contenido total de porfirinas, empleando la fórmula corregida de Rimington y Sveinsson (1950).

El esquema descripto se ilustra en la Figura I.1.

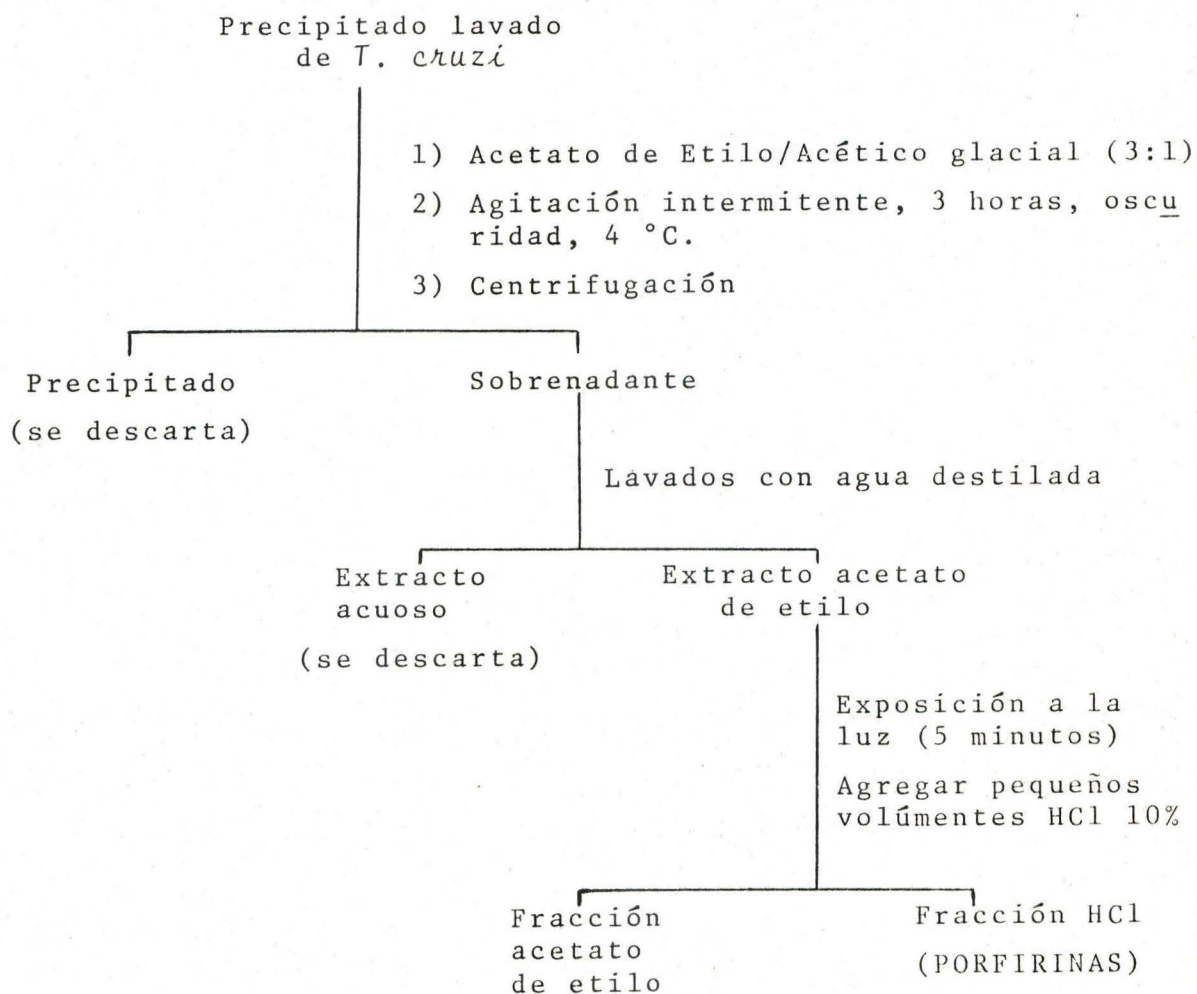


Figura I.1.: Esquema de extracción de porfirinas

I.5.2. Esterificadas

El extracto clorhídrico se evaporó en un evaporador Fis

te metanol:ácido sulfúrico (9:1, v/v). Se extrajo con cloroformo, se agregó un pequeño volumen de cloruro de sodio 7% para romper la emulsión y se determinó la cantidad de porfirinas presentes en el extracto clorofórmico espectrofotométricamente como en el caso descrito para las porfirinas libres. Se calculó el porcentaje de recuperación según:

$$\% \text{ Recuperación: } \frac{\text{Porfirinas esterificadas}}{\text{Porfirinas libres}} \times 100$$

Posteriormente la solución clorofórmica en la cual se midieron las porfirinas esterificadas totales se llevaron a sequedad en baño maría; el residuo se disolvió en un pequeño volumen de cloroformo y se sembró en una placa de sílica gel G de 0,25 cm de espesor. Las placas se secaron 1 hora a 100-105 °C y se mantuvieron, en un recipiente cerrado, sobre cloruro de calcio y ácido sulfúrico hasta su uso. Se sembraron además testigos de Proto IX, Copro III, Isocopro, Penta, Hexa, Firia y uroporfirinas.

Se empleó una cromatografía de tipo ascendente a temperatura ambiente que requiere dos desarrollos en el mismo sentido en dos cubas independientes.

El solvente para saturar las cubas se coloca por lo menos una hora antes.

En la primer corrida se emplea como solvente benceno:metiletilcetona (80:6, v/v). Se corre con este solvente hasta un tercio de la placa. La placa se retira de la primer cuba y se seca en corriente de aire tibio. El solvente de desarrollo de la segunda corrida es benceno:acetato de etilo:metanol;éter de petróleo (rango de ebullición 60-65 °C) en la proporción 50:1:2:6 (v/v/v/v). Se deja correr durante 90 minutos, luego se seca en corriente de aire tibio.

En todos los casos la posición de las manchas se determina por su fluorescencia bajo la luz UV y se las identifica por comparación con los testigos correspondientes.

I.6. DETERMINACION DE HEMO-LIBRE

Se obtuvo una curva de calibración siguiendo el procedimiento descrito por Porra y Jones (1963). La hemina se midió por el mismo procedimiento en el sobrenadante de 580 x g.

I.7. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

I.7.1. Suc.CoA-S

Se empleó el método descrito por Wider y Tigier (1970) ligeramente modificado. La mezcla de incubación contenía buffer Tris-HCl 25 mM pH 7,4; GSH 3 mM; ATP 5 mM; succinato de sodio 50 mM; hidroxilamina 0,48 M; cloruro de magnesio 13 mM y CoA 0,1 mM. La reacción se inició por el agregado de la solución enzimática incubándose 60 minutos a 37 °C y se detuvo por el agregado de la siguiente mezcla desproteinizante: TCA 25%, HCl 3 N, cloruro férrico 5%, en una relación de volúmenes 1:1:1; se centrifugó la proteína precipitada y se determinó el succinil hidroxamato férrico formado leyendo la densidad óptica de la solución a 540 nm, según el método descrito por Kaufman y Alivisatos (1955). La cantidad de succinil-hidroxamato formado, se obtuvo de una curva de calibración realizada previamente.

Unidad enzimática: se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de succinil-hidroxamato por hora, bajo las condiciones standard descriptas.

Actividad específica: se expresó como unidades de actividad por mg de proteína (UA/mg prot).

I.7.2. ALA-S

Se empleó el método de Wider y col. (1971), ligeramente modificado. El sistema de incubación contenía buffer Tris-HCl 25 mM pH 7,4; succinato de sodio 50 mM; glicina 50 mM; cloruro de magnesio 13 mM; CoA 0,1 mM; fosfato de piridoxal 4 mM; GSH 3 mM; EDTA 2 mM; Succinil CoA sintetasa (500 unidades) y la solución enzimática, en un volumen final de 1 ml. El contenido total del tubo se incubó durante 60 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de TCA 10%. El ALA formado se

determinó por el método de Mauzerall y Granick (1956) y el cromóforo Ehrlich se midió a 553 nm. Es importante destacar que para medir esta enzima se generó succinil CoA *in situ*.

Unidad enzimática: se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de ALA por hora, bajo las condiciones standards descriptas.

Actividad específica: se expresó como unidades de actividad por mg de proteína (UA/mg prot.).

I.7.3. DOVA-T

El sistema de ensayo utilizado para medir la formación de ALA contenía DOVA 5 mM, L-Alanina 20 mM, fosfato sódico 100 mM pH 7,5 y la solución enzimática, en un volumen final de 1 ml. Se llevó a cabo la incubación a 37 °C, a la luz y en anaerobiosis. Se detuvo la reacción por el agregado de 1 ml de TCA 10%. El ALA se convirtió en 2-metil-3-carboxi-4(3-ácido propiónico) pirrol), mediante el método de Mauzerall y Granick (1956), y el cromóforo Ehrlich fue medido a 553 nm. Se determinó también el DOVA remanente por el método descrito por Milligan y Baldwin (1967).

Unidad enzimática: se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de ALA por hora a 37 °C.

Actividad específica: se expresa en forma de unidades de actividad por mg de proteína (UA/mg prot.).

I.7.4. ALA-D

a) Las incubaciones se llevaron a cabo en tubos de Thunberg en anaerobiosis y a 37 °C. Se colocó la solución enzimática junto con el buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 y cisteína 10 mM. Este sistema se preincubó 30 minutos para activar la enzima y al cabo de ese tiempo, se dejó caer 0,1 ml de ALA 0,5 M desde el tubo lateral, a pH 7,4. La incubación se prosiguió por una hora con agitación mecánica a 80-90 oscilaciones por minuto. Después de la incubación se detuvo la reacción por el agregado de 0,15 ml de solución saturada de sulfato de cobre. Se agitó vigorosamente el tubo y el precipitado proteico se sepa

ró por centrifugación. El PBG formado se midió en el sobrenadante por el método de Moore y Labbe (1964).

- b) Se procedió de igual forma que en a), con la salvedad que al medio de incubación se le añadió sulfato de cinc (1,08 mM) (Brocklehurst y col., 1980).

Unidad enzimática: Se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de PBG por hora bajo las condiciones standards descriptas.

Actividad específica: se expresa en forma de unidades de actividad por mg de proteína (UA/mg prot).

I.7.5. PBG-asa

Se siguió el método de Battle y col. (1978) modificado. El sistema de incubación contenía 2 ml de la preparación enzimática (8,95 mg/ml), buffer Tris-HCl 46 mM pH 7,4 y 60 μ g de PBG (en 0,15 ml de buffer) en un volumen final de 2,7 ml, a pH 7,4. Las incubaciones se realizaron en anaerobiosis en tubos de Thunberg, en oscuridad, con agitación mecánica continua a 37 °C, durante 2 y 4 horas. Luego de la incubación se detuvo la reacción por el agregado de 0,3 ml de TCA 50%, para alcanzar una concentración final de 5% (p/v). Posteriormente se expuso la mezcla a la luz durante 20 minutos, para oxidar los porfirinógenos a porfirinas. Se separó el precipitado proteico por centrifugación y se determinó en los sobrenadantes las porfirinas totales formadas y la cantidad de PBG remanente. La cantidad total de porfirinas formadas por los incubados se determinó espectrofotométricamente en la solución ácida (Rimington, 1960), empleando la fórmula corregida de Rimington y Sveinsson (1950). Para la determinación del PBG se siguió el método de Moore y Labbe (1964). En todos los casos, para los cálculos se restaron los valores de porfirinas formadas y PBG consumido de los blancos correspondientes.

- Deaminasa: El sistema de incubación empleado fue el descripto para PBG-asa, empleando como temperatura de incubación 45 °C.

Unidad enzimática: se expresó como función del producto formado o del sustrato consumido; o sea nmol de porfirinas formadas o μ g de PBG consumido a los tiempos y temperaturas de incubación indicados.

Actividad específica: se expresó como unidades de actividad por mg de proteína (UA/mg prot.).

I.7.6. Hemo-S

Se siguió el método de Porra y Jones (1963), con algunas modificaciones según el organismo empleado.

- Trypanosoma cruzi: La mezcla de incubación contenía: porfirina (37, 35 ó 32 μ M, según se emplease proto-, meso- o deuteroporfirina, respectivamente); sulfato ferroso 0,1 mM y buffer fosfato de potasio 0,05 M pH 7,2; 7,5 u 8,0 (según se midiese formación de proto-, meso- o deuterohemo, respectivamente), en un volumen final de 4,2 ml. El sistema se preincubó 30 minutos a 37 °C, en anaerobiosis en tubos de Thunberg, oscuridad y con agitación mecánica continua. La reacción se inició por el agregado de la solución enzimática desde la cabeza del tubo. Se detuvo la reacción abriendo el tubo de Thunberg y agregando 1 ml de piridina y 0,5 ml de hidróxido de sodio 1 N y 1 ml de agua destilada. La mezcla fue dividida en partes iguales entre 2 cubetas agregándosele a una de ellas, 2 mg de ditionito de sodio, agente reductor, y a la otra, 50 μ l de ferricianuro de potasio 3 mM, agente oxidante. Se registró la diferencia espectral del piridin hemocromógeno reducido y oxidado. El hemo formado se calculó usando la ecuación de Porra y Jones (1963).

Determinación del efecto de metales: Las diversas sales metálicas indicadas, se agregaron desde la cabeza del tubo de Thunberg inmediatamente después del período de incubación.

Se consideró como valor control, al registrado sin agregado de sulfato ferroso.

- Crithidia deanei: Se siguió la misma metodología que la descrita para *T. cruzi*, con algunas variaciones. El sobrenadante de 580 x g en buffer fosfato de potasio 0,05 M pH 8,0 se preincubó 30 minutos a 37 °C, en anaerobiosis, en tubos de Thunberg con el sustrato porfirina (protoporfirina IX 37 μ M, mesoporfirina IX 35 μ M, deuteroporfirina IX 32 μ M). La reacción se inició por el agregado de ditionitrol 40 μ mol y sulfato ferroso 400 μ mol desde la cabeza del tubo de Tunberg. La mezcla de in

cubación (volumen final 4,2 ml) se incubó durante 1 hora, con agitación. La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de piridina; 0,5 ml de hidróxido de sodio 1 N y 1 ml de iodoacetamida. La diferencia espectral del piridinhemocromógeno reducido y oxidado se registró en la forma descripta previamente.

I.8. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION PROTEICA

Se empleó la técnica de Lowry y col. (1951) modificada mediante el agregado de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2%.

RESULTADOS

I. BIOSINTESIS DE HEMO EN *T. cruzi*

I.1. CEPA TULAHUEN

Como se anticipara, muy poco se conoce sobre la capacidad enzimática real de estos organismos para formar sus componentes esenciales del hemo. Hasta el presente excepto los datos de actividad de Deaminasa, negativa, en *Trypanosoma conorhini* y *Leishmania tarentolae* (Chang y col., 1975) y muy baja en *Leishmania mexicana amazonensis* (Chang y Chang, 1985) así como la única medición de ALA-D en este último parásito (Chang y Chang, 1985), no existe ninguna otra evidencia experimental referente a los niveles de actividad de las enzimas involucradas en el camino de las porfirinas.

Se decidió entonces iniciar un amplio estudio sobre la biosíntesis de tetrapirroles en estos hemoflagelados, para lo cual se seleccionó como organismo la forma epimastigote de *Trypanosoma cruzi*.

La Figura I.1. muestra los resultados de las medidas de actividad de varias de las enzimas del camino del hemo en epimastigotes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, crecidos en medio Warren. Se observa claramente el alto nivel de actividad de Suc.CoA-S, que estaría de acuerdo con la gran liberación de succinato al medio por parte de los hemoflagelados (Bowman y col., 1963), siendo en consecuencia esta enzima no limitante.

Como ya mencionáramos, se sabe que en una misma célula pueden coexistir dos rutas para la formación de ALA, una catalizada por ALA-S y la otra por DOVA-T. Vemos que en *T. cruzi*, considerando la actividad como una función de ALA formado, ambas enzimas presentan aunque bajos, iguales niveles de actividad. Cuando la actividad de DOVA-T se expresó en base a la cantidad de DOVA consumido, la actividad específica relativa fue 8 veces mayor; sin embargo, se sabe que el DOVA puede metabolizarse por varias rutas, por lo cual, en este caso sólo es relevante tener en cuenta la cantidad convertida en ALA.

Aún bajo óptimas condiciones el nivel de ALA-D, medida en presencia del activador Zn^{2+} (Brocklehurst y col., 1980), fue despreciable.

De los resultados surge la completa ausencia o inactivación de la PBG-asa y Deaminasa, cuando la velocidad se expresa en

función de las porfirinas formadas. En tanto que si bien bajo, existiría un cierto consumo de PBG.

La total funcionalidad de la Hemo-S se observa ya sea se emplee mesoporfirina o protoporfirina como sustrato. La formación de mesohemo es mayor que la de protohemo.

La Figura 1.2 muestra el contenido de ALA, PBG, porfirinas y hemo de los epimastigotes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, crecidos en medio Warren. Los niveles de ALA y PBG aunque detectables fueron muy bajos, indicando una capacidad bastante limitada para sintetizar estos precursores del camino del hemo. El contenido de porfirinas libres fue mucho más bajo aún: se encontró por cromatografía de capa delgada una débil mancha con un valor de Rf cercano al de la protoporfirina IX (0,95); se visualizaron además algunos indicios que sugerirían la presencia de coproporfirina, aunque estos resultados no fueron concluyentes; y también se observaron probablemente porfirinas no esterificadas que permanecieron en la línea de base.

Teniendo en cuenta que *T. cruzi* se cultivó en un medio conteniendo hemina, es muy probable que la cantidad de porfirinas detectadas represente aquellas adsorbidas por las células.

No se detectó hemo libre.

I.2. INFLUENCIA DE LA CEPA

- Medio LIT

La Figura 1.3 muestra los resultados de las medidas de actividad de varias de las enzimas del hemo, para las cepas Y y CL, crecidas en medio LIT.

No se observan marcadas diferencias en la actividad de Suc.CoA-S de los parásitos de las cepas Y y CL, crecidos en medio LIT.

La actividad de ALA-S es aproximadamente 2 veces más alta en los parásitos de la cepa Y que en los de la cepa CL. Sin embargo esta diferencia no se mantiene al analizar la otra ruta de síntesis de ALA, vía DOVA-T. En este caso la actividad de DOVA-T, es prácticamente igual a la de ALA-S, para los parásitos de la cepa Y, en tanto que para los de la cepa CL la enzima DOVA-T parecería más activa.

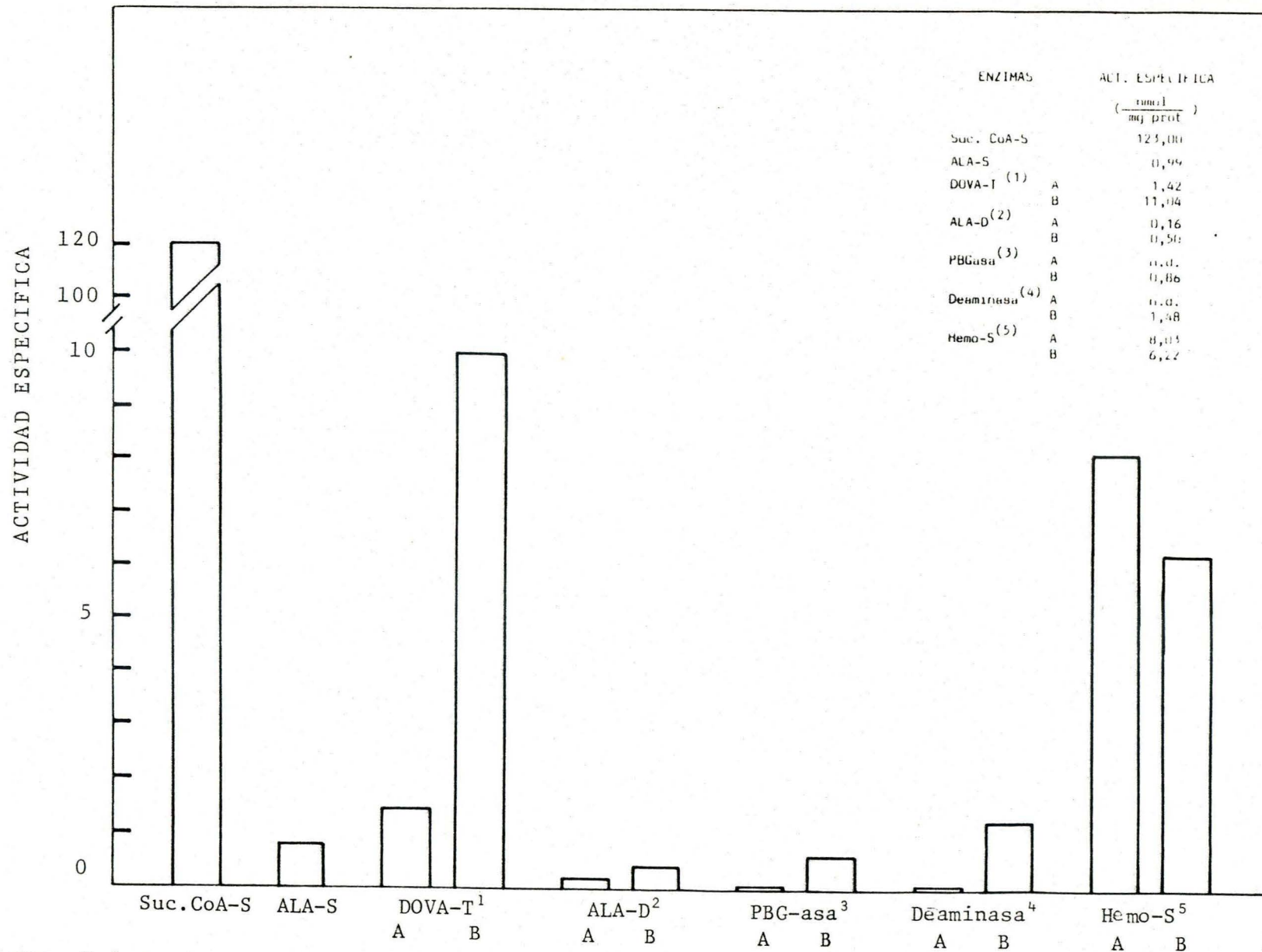


Figura I.1.: Actividades específicas de varias enzimas involucradas en el camino del hemo en *Trypanosoma cruzi* (Cepa Tula huén). Las condiciones experimentales son las descritas en Materiales y Métodos. Los valores de actividad específica se expresan como nmoles de producto formado o de sustrato consumido/mg proteína. (1): A: DOVA formado, B: DOVA consumido. (2): en ausencia (A) o en presencia (B) de Zn^{2+} en el medio de incubación. (3) y (4): A: porfirinas formadas, (B): PBG consumido. (5): A: mesohemo formado, B: protohemo formado. n.d.: no detectables ($< 1.0 \times 10^{-2}$ nmol/mg proteína).

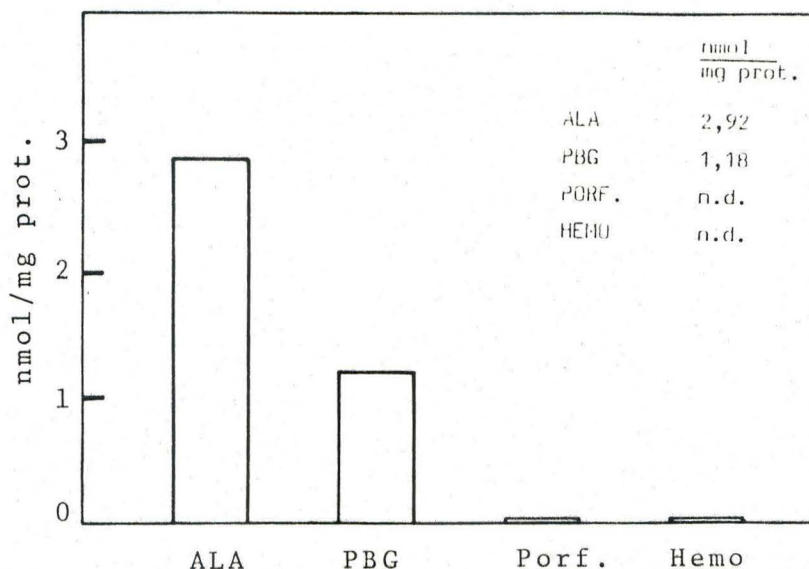


Figura I.2.: ALA, PBG, porfirinas y contenido de hemo en *T. cruzi* (Cepa Tulahuén).

Las condiciones experimentales son las indicadas en Materiales y Métodos.

Porf: porfirinas libres.

n.d.: niveles no detectables ($< 1,3 \times 10^{-3}$ nmol/mg prot.)

No se pudo detectar actividad de ALA-D, PBG-asa ni Deaminasa en ninguna de las dos cepas desarrolladas en el medio LIT.

Los resultados del ensayo de Hemo-S indican que en ambas cepas (Y y CL), la mayor actividad se registró mediante el empleo de mesoporfirina como sustrato y en este caso, la preparación proveniente de la cepa CL fue la más activa de todas y el doble que la de la cepa Y. En cuanto a la síntesis de protohemo, la cepa CL nuevamente resultó la de mayor actividad. Por último usando deuteroporfirina como sustrato, se registraron actividades bajas para ambas cepas, sólo ligeramente superior en la Y.

La Figura I.4 muestra los resultados del análisis del contenido de ALA, PBG, porfirinas y hemo, en las cepas Y y CL de *T. cruzi* crecidas en medio LIT.

Cuando los epimastigotes se desarrollan en medio LIT, solamente se detectó ALA en los pertenecientes a la cepa CL.

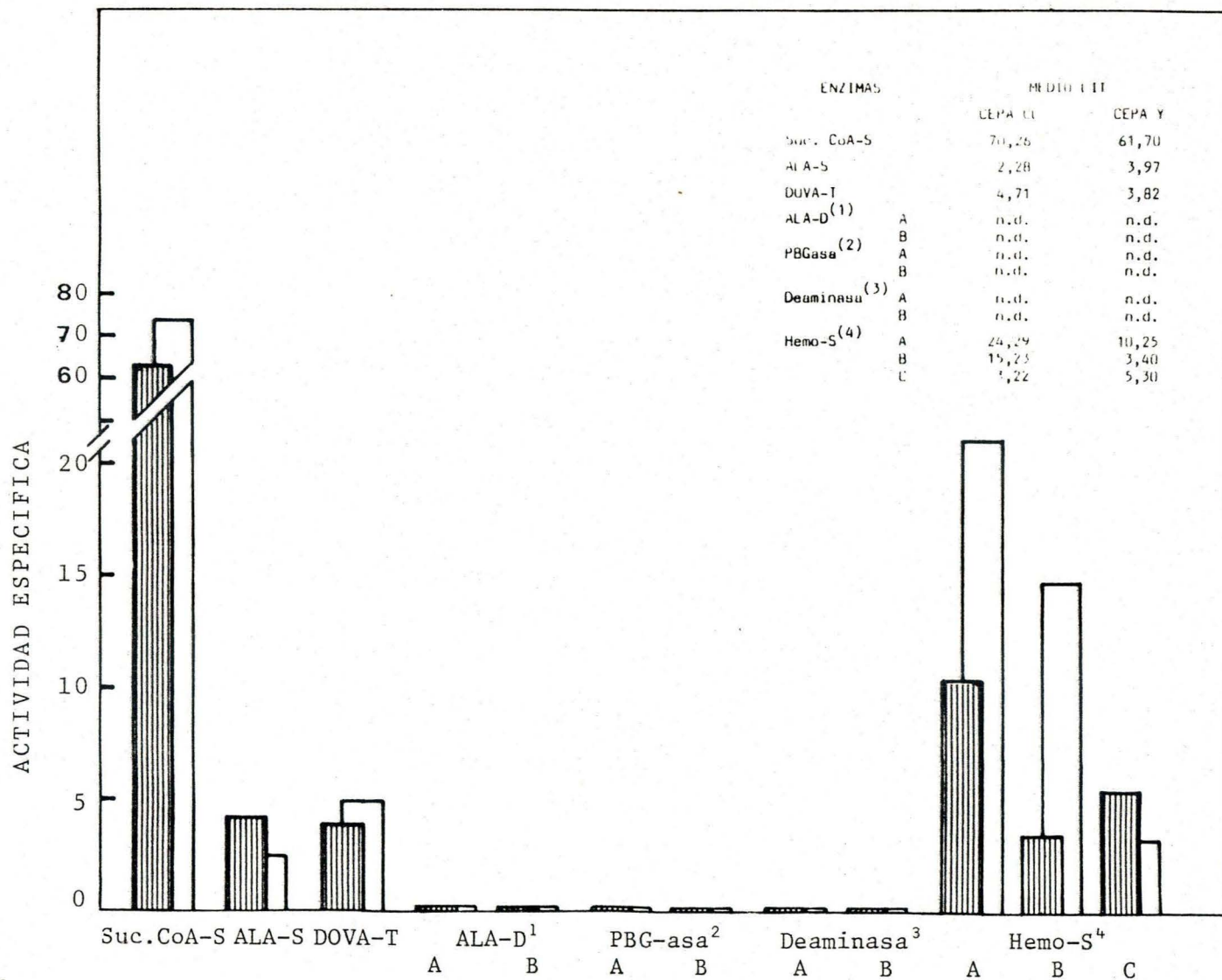


Figura I.3.: Influencia de la cepa de *T. cruzi*, sobre las actividades enzimáticas de la biosíntesis del hemo, para parásitos crecidos en medio LIT. Se emplearon epimastigotes de las cepa Y (▨) y CL (□). Los valores de actividad específica se expresan como nmol producto formado o de sustrato consumido/mg prot. (1): ausencia (A) o presencia (B) de Zn^{2+} en la mezcla de incubación. (2) y (3): A: porfirinas formadas, B: PBG consumido. (4): A: mesohemo, B: protohemo y D: deuterohemo formado.

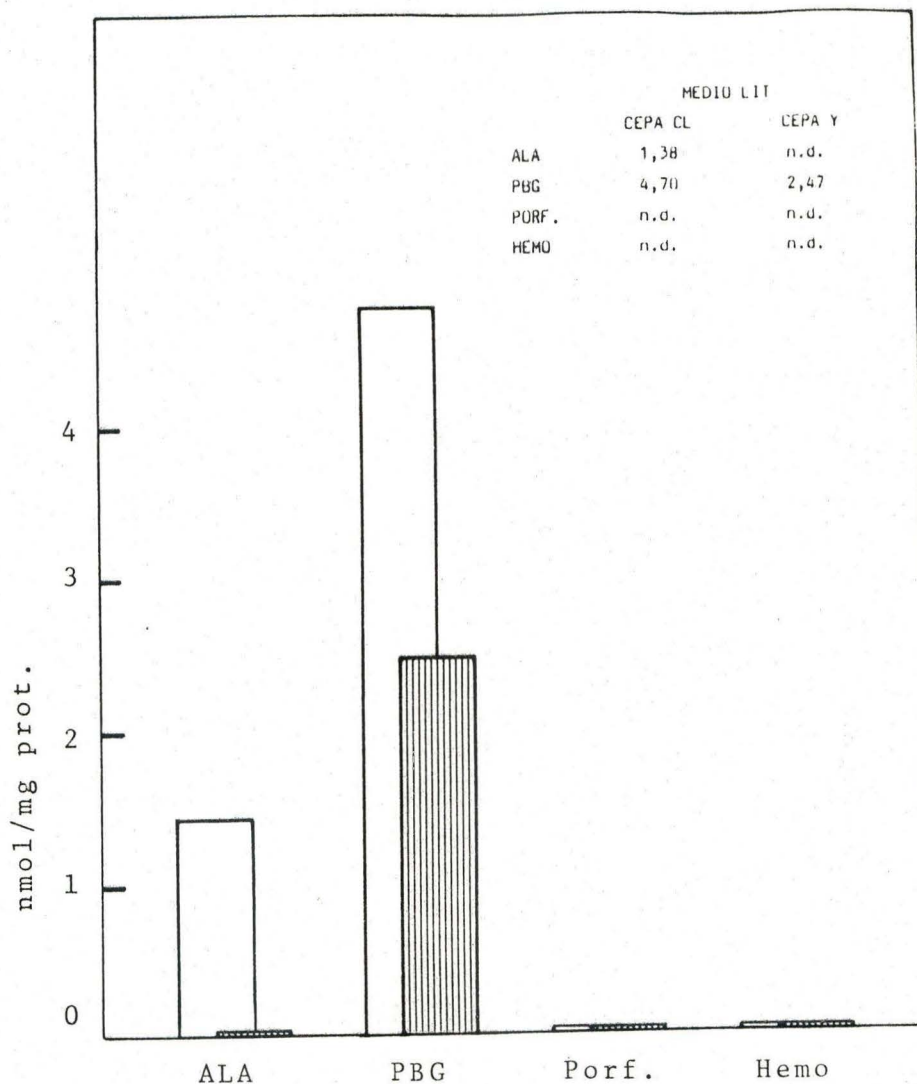


Figura I.4.: Contenido de ALA, PBG, porfirinas (porf.) y hemo en parásitos de las cepas CL (□) e Y (▨), crecidos en medio LIT. Las condiciones experimentales son las descritas en Materiales y Métodos. n.d: indica niveles no detectables. Los valores tabulados expresan nmol/mg prot.

En la cepa CL se detecta mayor contenido de PBG que en la cepa Y y en ninguna de ellas se pudieron medir porfirinas ni hemo.

- Medio Warren

La Figura I.5. muestra los resultados de las medidas de

actividad de varias de las enzimas del hemo, para las cepas Y y CL, crecidas en medio Warren.

El crecimiento de los parásitos en el medio Warren, permite detectar una marcada diferencia en la actividad de la enzima Suc.CoA-S según la cepa. Se observa que la actividad de esta enzima es 8 veces más alta en los organismos de la cepa CL que en aquellos que pertenecen a la cepa Y.

La actividad de ALA-S fue también ligeramente más alta para los parásitos de la cepa CL. Sin embargo no se detectó en los mismos actividad de la enzima DOVA-T. En el caso de la cepa Y, ambas rutas de biosíntesis de ALA serían igualmente activas.

Los resultados de medida de actividad de ALA-D mostrarían que esta enzima está ausente, carece de actividad o es prácticamente inactiva tanto en la cepa Y como en la CL cultivadas en medio Warren. Sin embargo, el agregado de Zn^{2+} puso de manifiesto la baja pero cierta actividad en los preparados provenientes de ambas cepas.

No hubo actividad de PBG-asa ni de Deaminasa, medida en base a la formación de porfirinas en ninguna de las cepas. Sin embargo, hubo consumo de PBG, por la preparación obtenida de la cepa CL.

La formación enzimática de meso-, proto- o deuterohemo, fue en todos los casos más alta para los parásitos de la cepa CL, y la mayor de todas se obtuvo empleando mesoporfirina como sustrato.

Vemos en la Figura I.6. que cuando los parásitos se crecieron en medio Warren, el contenido de ALA de los organismos de la cepa CL fue aproximadamente 6 veces el de la cepa Y. Con respecto al PBG, no se observa una diferencia tan marcada en función de la cepa, aunque es ligeramente mayor el valor detectado para la cepa Y.

En ninguna de las cepas Y o CL se detectaron porfirinas libres ni hemo.

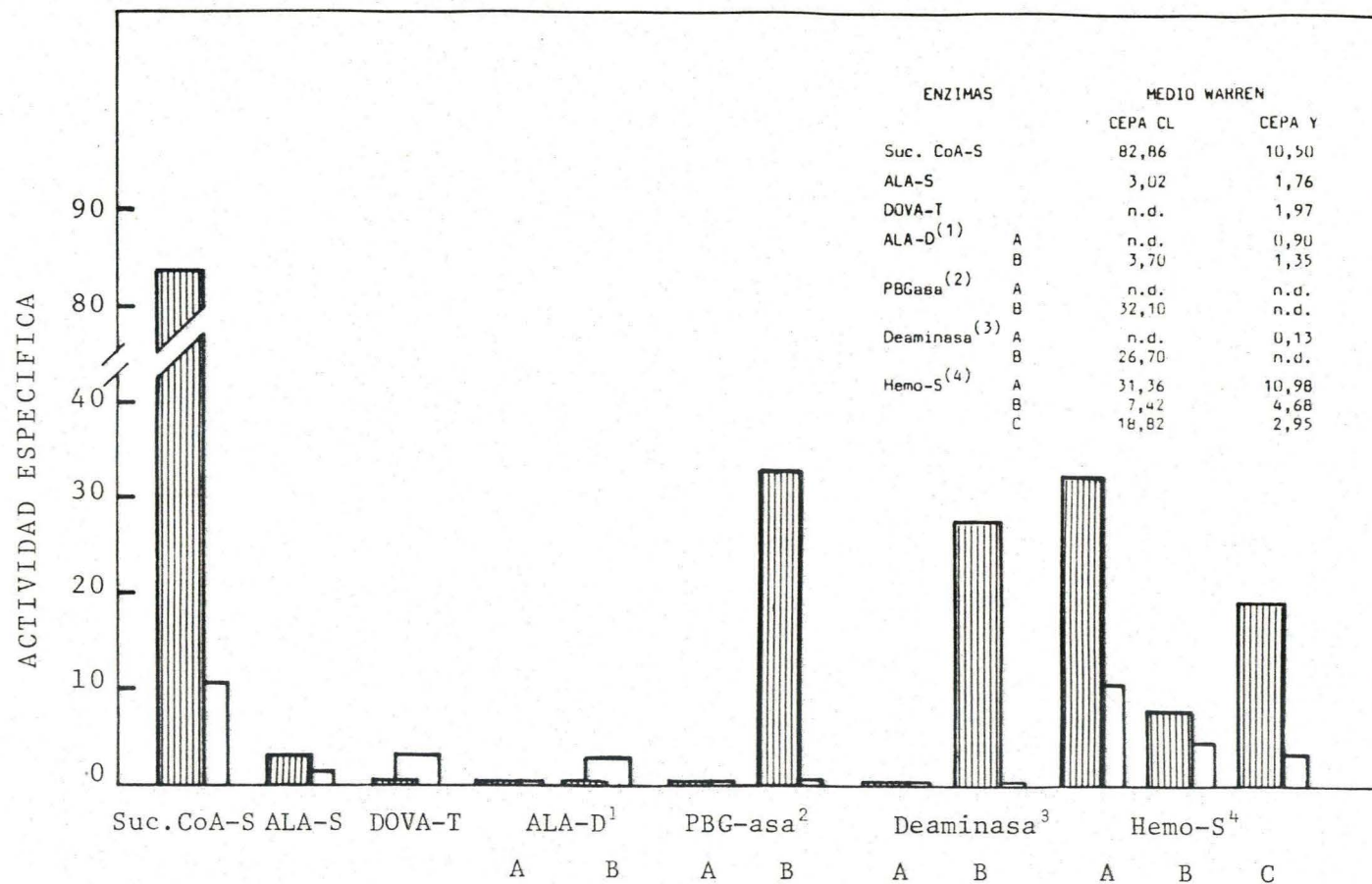


Figura I.5.: Influencia de la cepa de *T. cruzi*, sobre las actividades enzimáticas de la biosíntesis del hemo, para parásitos crecidos en medio Warren. Se emplearon epimastigotes de las cepas Y (□) y CL (▨). Los valores de actividad específica se expresan como nmol producto formado o de sustrato consumido/mg prot. (1): ausencia (A) o presencia (B) de Zn²⁺ en la mezcla de incubación. (2) y (3): A: porfirinas formadas, B: PBG consumido. (4): A: mesohemo, B: protohemo y D: deuterohemo formado.

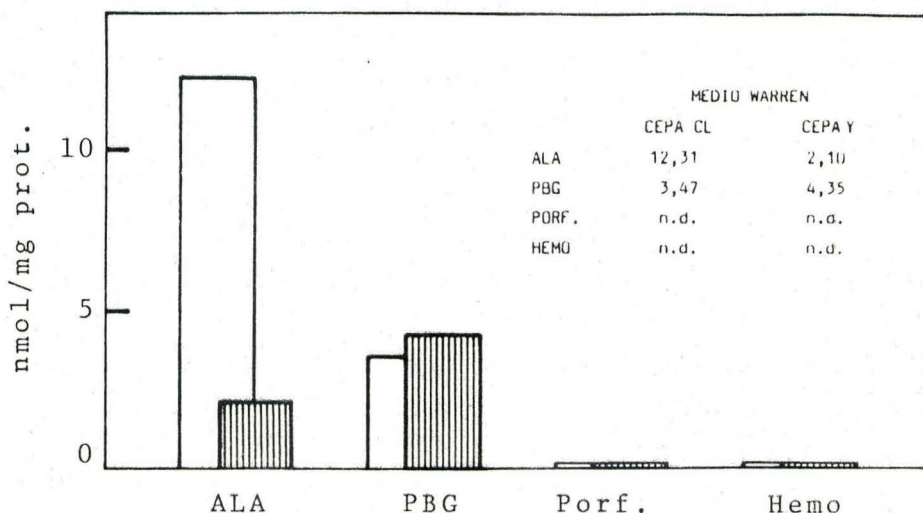


Figura I.6.: Contenido de ALA, PBG, porfirinas (porf.) y hemo en epimastigotes de las cepas Y (▨) y CL (□) de *T. cruzi*, crecidos en medio Warren. Las condiciones experimentales son las descritas en Materiales y Métodos. n.d.: niveles no detectables. Los valores tabulados expresan nmol/mg prot.

I.3. INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO

- Cepa CL

La Figura I.7. muestra los resultados de la medida de actividad de varias de las enzimas del camino del hemo en parásitos de la cepa CL de *T. cruzi*, crecidos en medio LIT o Warren.

La actividad de Suc.CoA-S es alta y el medio de cultivo pareciera ejercer poca influencia sobre la misma.

Tampoco existe una grandiferencia en cuanto a la actividad de ALA-S, aunque es ligeramente superior en los organismos crecidos en medio Warren que en aquellos crecidos en medio LIT. Sin embargo, se registra un cambio marcado al analizar la otra ruta posible de formación de ALA, a partir de DOVA por acción de la DOVA-T. Solamente se observa actividad de DOVA-T en parásitos de la cepa CL, crecidos en medio LIT.

No se pudo medir ALA-D en ninguno de los dos medios empleados para el crecimiento de la cepa CL. Sin embargo, el agre-

gado de Zn^{2+} a la preparación obtenida del parásito crecido en medio Warren, permitió detectar esta enzima.

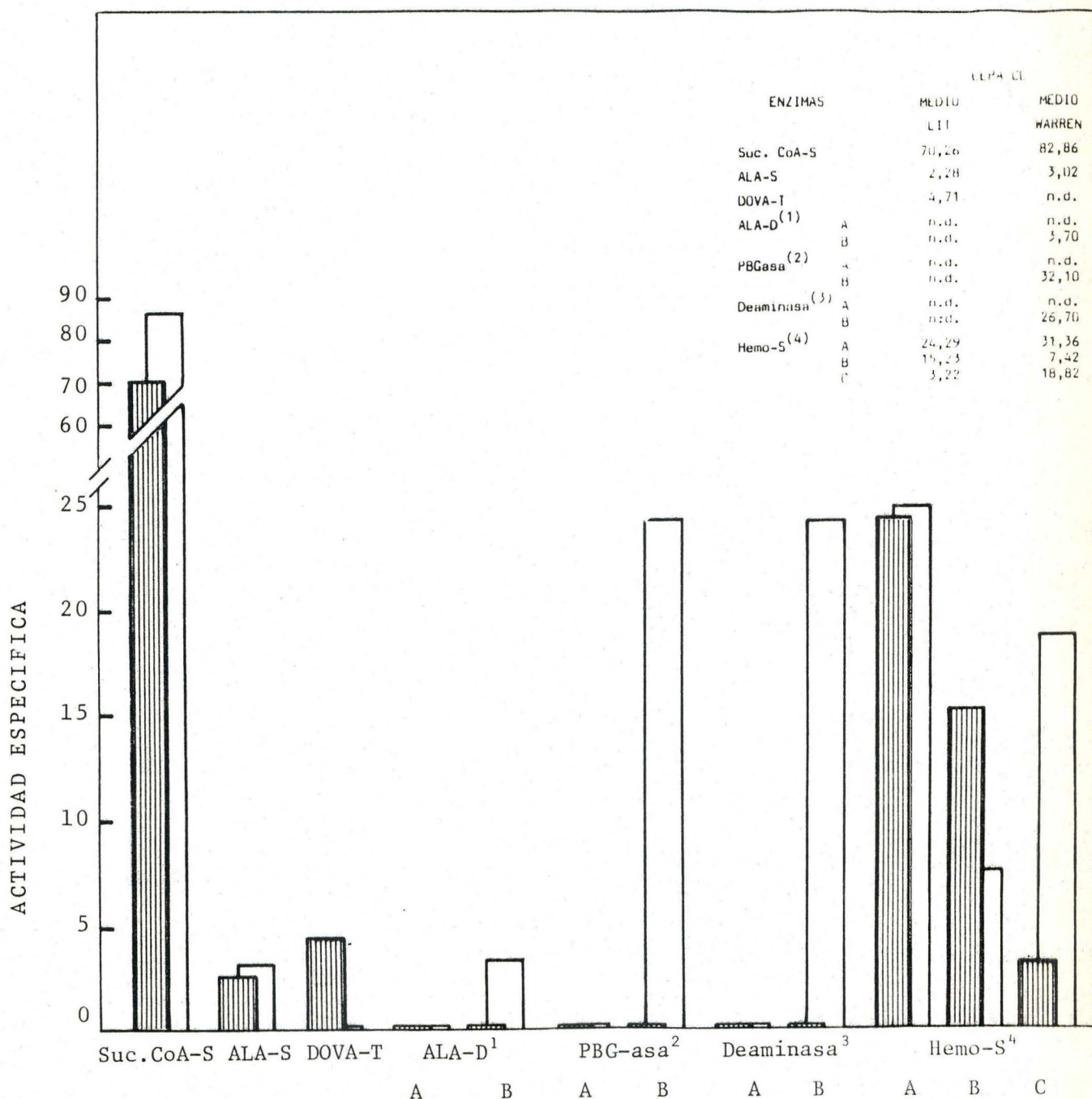


Figura I.7.: Influencia del medio de cultivo sobre las actividades enzimáticas de la biosíntesis del hemo en *T. cruzi*, cepa CL. Los valores de actividad específica se expresan como nmol producto formado o de sustrato consumido/mg prot. (1) En ausencia (A) o presencia (B) de Zn^{2+} , en el medio de incubación. (2) y (3): A: porfirinas formadas, B: PBG consumido. (4): A: mesohemo, B: protohemo y C: deuterohemo formado. n.d.: no se detectó actividad enzimática. Los epimastigotes de *T. cruzi* se cultivaron en medio LIT (▨) o Warren (□)

Tampoco fueron mensurables la PBG-asa y la Deaminasa, no por lo menos con la sensibilidad de los métodos empleados, en ninguno de los dos medios de cultivo, cuando la actividad se expresó como función de la cantidad de porfirinas formadas. Si se considera la velocidad de reacción en base a la cantidad de PBG consumido, solamente se la pudo medir en los parásitos de la cepa CL crecidos en medio Warren.

La actividad de Hemo-S expresada como mesohemo formado, es más alta para la cepa CL crecida en medio Warren que en medio LIT. Sin embargo cuando se expresa como protohemo formado, es dos veces más alta en los parásitos cultivados en medio LIT.

Con respecto a la formación de deuterohemo, nuevamente es mucho mayor (6 veces) para los extractos de parásitos desarrollados en medio Warren.

La Figura I.8. muestra la influencia del medio de cultivo sobre el contenido de ALA, PBG, porfirinas y hemo. Cuando los parásitos crecen en medio Warren, el contenido de ALA, es aproximadamente 10 veces mayor que en aquellos cultivados en medio LIT. El contenido de PBG, sin embargo, es ligeramente mayor en los parásitos crecidos en medio LIT. El contenido de porfirinas y hemo no fue mensurable.

- Cepa Y

La Figura I.9. muestra la gran influencia del medio de cultivo sobre las actividades enzimáticas de varias de las enzimas de la biosíntesis del hemo, para los parásitos de la cepa Y de *T. cruzi*.

Los resultados de la medida de actividad de Suc.CoA-S en los organismos crecidos en medio LIT son aproximadamente 6 veces más altos que los correspondientes en medio Warren.

También las actividades de ALA-S y DOVA-T, son aproximadamente 2 veces mayor para los parásitos crecidos en medio LIT.

Sin embargo, solamente cuando se empleó el medio Warren para el desarrollo de esta cepa, se observó cierta actividad, aunque baja, de ALA-D.

Asimismo, en ninguna de las condiciones se detectaron actividades de PBG-asa y Deaminasa, ya sea expresadas en función de la cantidad de porfirinas formadas como del PBG consumido.

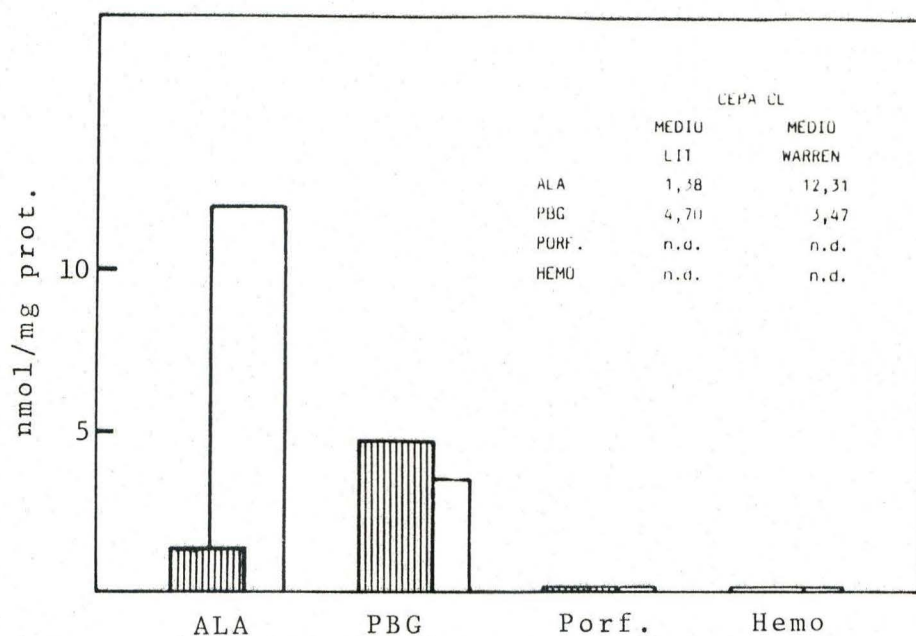


Figura I.8.: Influencia del medio de cultivo sobre el contenido de ALA, PBG, porfirinas (porf.) y hemo en epimastigotes de *T. cruzi*, cepa CL, crecidos en medio Warren (□) o LIT (▨). Los valores tabulados están expresados como nmol/mg prot. Las condiciones experimentales son las descritas en Materiales y Métodos. n.d.: niveles no detectables. Porf.: porfirinas libres

El medio de cultivo parece no afectar en la cepa Y, la actividad de Ferroquelatasa medida en función del mesohemo formado. Cuando se la expresa como protohemo, se registra tan solo un ligero aumento para los parásitos crecidos en medio Warren con respecto al LIT, situación ésta que se revierte cuando se la mide en base a la formación de deuterohemo.

La Figura I.10. muestra la influencia del medio de cultivo sobre el contenido de ALA, PBG, porfirinas y hemo. Los resultados indican la presencia de ALA únicamente en los organismos de la cepa Y crecidos en medio Warren, en tanto que no se detecta ALA en los parásitos cultivados en medio LIT.

El contenido de PBG fue 2 veces mayor en los parásitos de esta cepa crecidos en medio Warren.

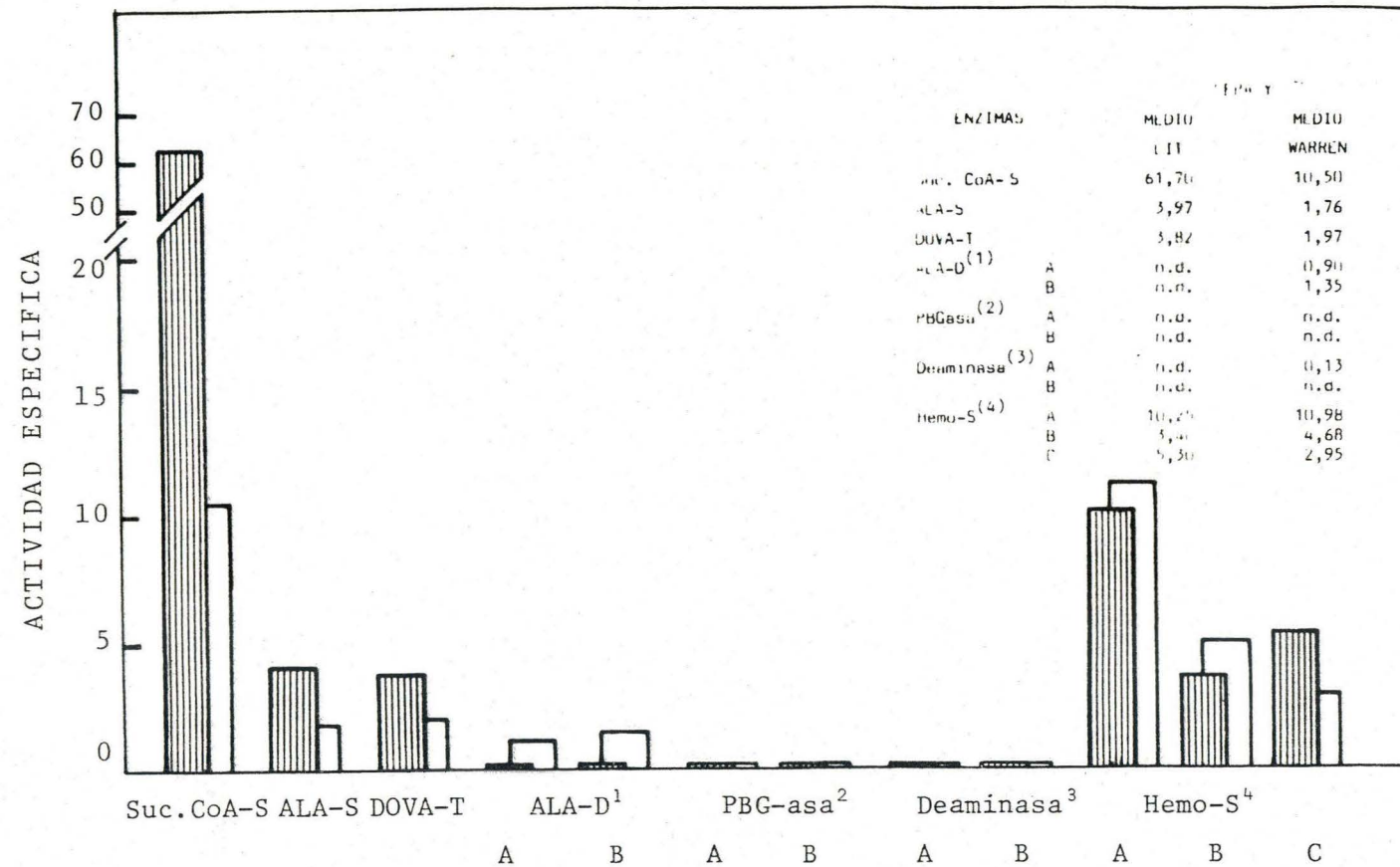


Figura I.9.: Influencia del medio de cultivo sobre las actividades enzimáticas de la biosíntesis del hemo en *T. cruzi*, cepa Y. Los valores de actividad específica se expresan como nmol de producto formado o de sustrato consumido/mg prot. (1): En ausencia (A) o presencia (B) de Zn^{2+} en el medio de incubación (2) y (3): A: porfirinas formadas, B: PBG consumido. (4): A: mesohemo, B: protohemo y C: deuterohemo formado. n.d.: no se detectó actividad enzimática. Los epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Y, se desarrollaron en medio LIT (|||||) o Warren (□).

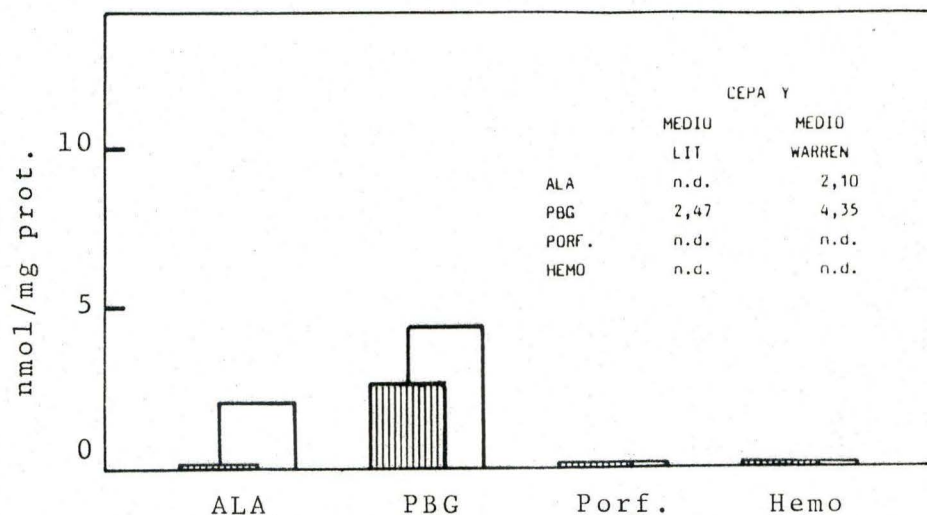


Figura I.10.: Influencia del medio de cultivo sobre el contenido de ALA, PBG, porfirinas y hemo en *T. cruzi*, cepa Y. Los epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* se desarrollaron en medio LIT (||||) o Warren (□). Los valores tabulados están expresados como nmol/mg prot. Las condiciones experimentales son las descritas en Materiales y Métodos. n.d.: niveles no detectables. porf.: porfirinas libres.

Tampoco en esta cepa se detectaron porfirinas o hemo libre.

II. BIOSINTESIS DE HEMO EN *Crithidia deanei*: INFLUENCIA DEL ENDOSIMBIONTE

Crithidia deanei pertenece junto con *C. oncopelti* y con *Blastocrithidia culicis* al grupo de flagelados que poseen organismos endosimbiontes de tipo bacteriano (Mc Ghee y Cosgrove, 1980). Se presume que las bacterias endosimbiontes suplirían al huésped con la capacidad biosintética de hemo (Chang y col., 1975). Sin embargo, se desconoce de que forma la presencia del endosimbionte podría regular las actividades enzimáticas de esta ruta de biosíntesis en el flagelado.

Teniendo en cuenta que *C. deanei* es un excelente modelo experimental para el estudio de las interacciones simbiote-huésped (Esteves y col., 1982) y considerando además que la cepa con endosimbionte no requiere hemina en su medio de cultivo, se inició un estudio acerca de la biosíntesis de porfirinas en estos organismos.

La Figura II.1. muestra el efecto del endosimbionte sobre la actividad biosintética de hemo en *C. deanei*.

No se pudo detectar actividad de las enzimas ALA-D, PBG-asa y Deaminasa en ninguna de las muestras.

Sin embargo, la presencia del endosimbionte indujo una sensible alteración en el perfil de algunas de las enzimas del camino biosintético de las porfirinas.

La actividad de las enzimas Suc.CoA-S y ALA-S fue el doble en las muestras conteniendo simbiote respecto de *C. deanei* aposimbiótica.

En cambio la actividad de DOVA-T fue más elevada en las células sin endosimbionte sólo cuando se midió en función del ALA formado.

El nivel de actividad de Hemo-S determinado usando como sustrato protoporfirina fue 2 veces superior en las células que contienen simbiotes. Cuando el sustrato utilizado fue mesoporfirina, no pudo detectarse ninguna diferencia entre *Crithidia deanei* con o sin endosimbionte; mientras que la formación de deuterohemo fue muy baja en ambos casos.

La Figura II.2. ilustra los resultados obtenidos al determinar el contenido de ALA, PBG, porfirinas y hemo en *Crithidia deanei*, con o sin endosimbionte.

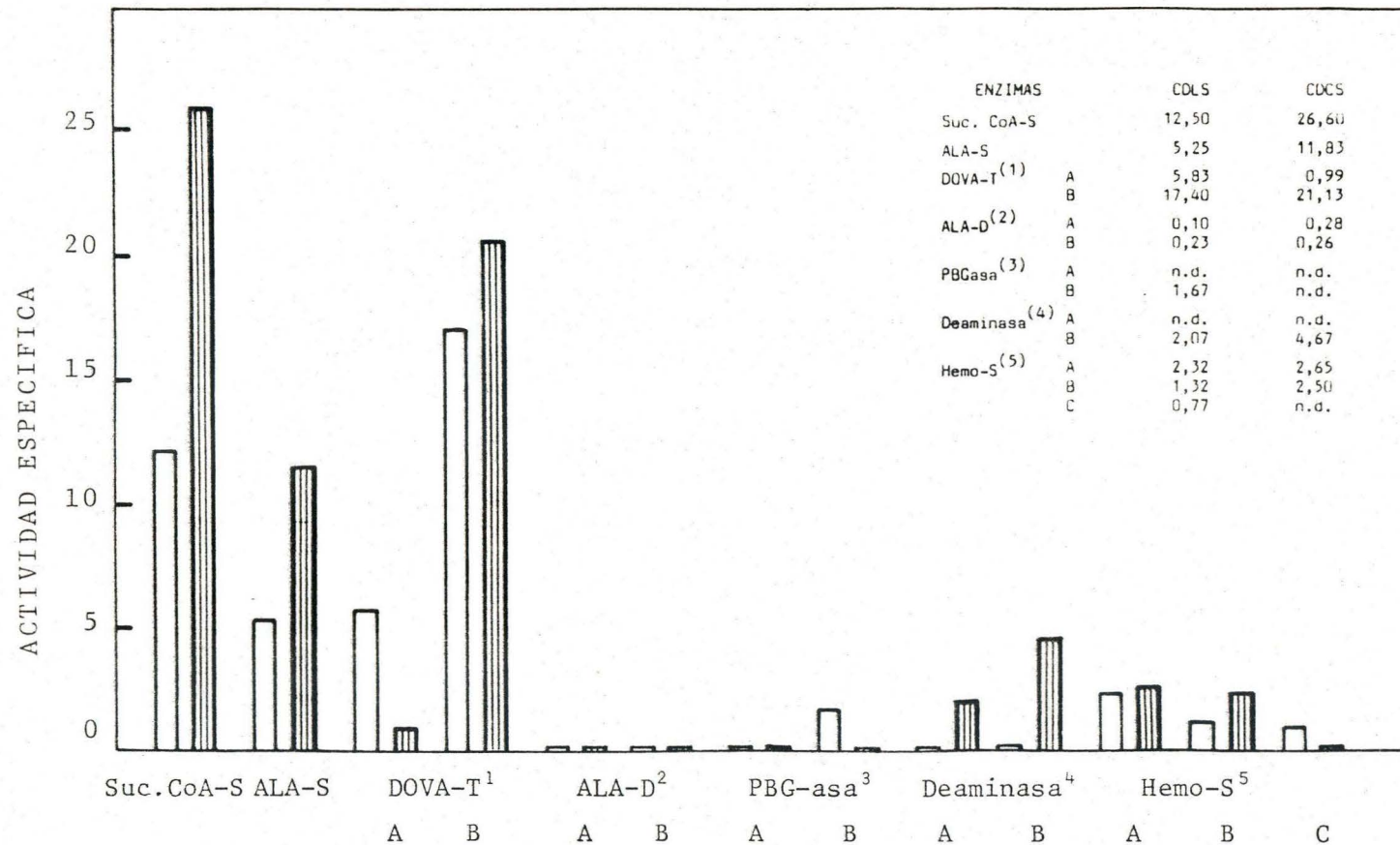


Figura II.1.: Actividad específica de varias enzimas involucradas en la biosíntesis de hemo en *Crithidia deanei*. Las actividades se expresan como nmol de producto formado o sustrato consumido por mg de proteína por hora bajo las condiciones standard de incubación correspondiente a cada enzima. CDLS: *Crithidia deanei* libre de simbioses (□). CDCS: *Crithidia deanei* con simbioses (▨). (1): A: ALA formado, B: DOVA consumido. (2): En ausencia (A) o presencia (B) de Zn²⁺ en el medio de incubación. (3) y (4): A: porfirinas formadas, B: PBG consumido. (5): A: mesohemo, B: protohemo y C: deuterohemo formado.

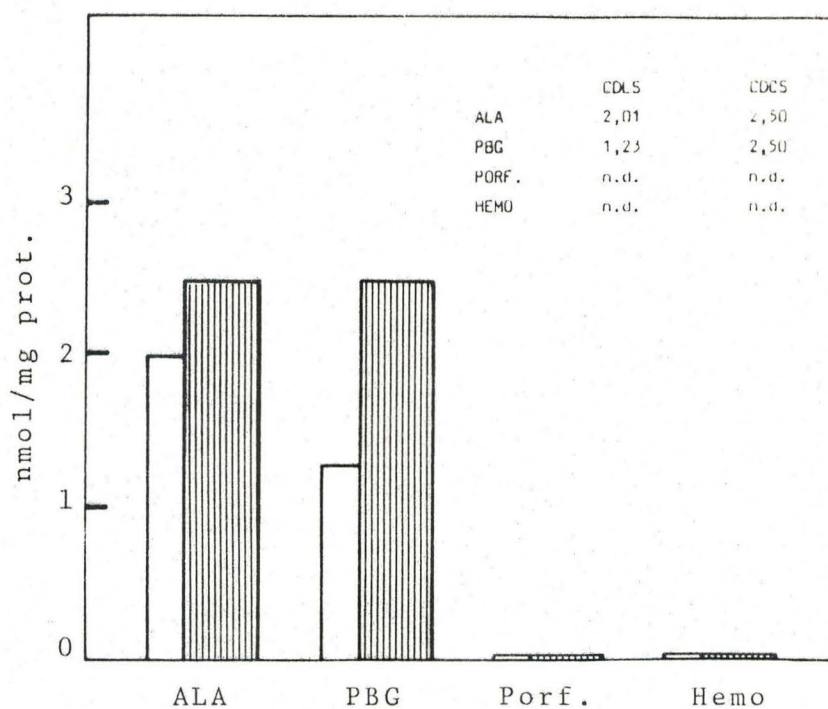


Figura II.2.: ALA, PBG, porfirina y hemo en *Cri
thidia deanei*.

Las condiciones experimentales son las descritas en Materiales y Métodos. Células libres de simbiontes (□, CDLS). Células conteniendo simbiontes (||||, CDCS). Porf: porfirinas libres. Los valores tabulados representan nmol/mg prot. n.d.: niveles no detectables ($< 1,0 \times 10^{-2}$ nmol/mg prot.)

La cantidad de ALA es prácticamente la misma en ambos casos.

Sin embargo, el contenido de PBG es 2 veces más alto en la cepa poseedora del endosimbionte.

No se pudieron detectar porfirinas ni hemo libre en la cepa con endosimbionte ni en la aposimbiótica

III. HEMO-SINTETASA DE *T. cruzi*

III.1. DISTRIBUCION SUBCELULAR

La Tabla III.1. muestra los resultados de un experimento típico de distribución subcelular de la enzima Hemo-Sintetasa (Hemo-S) de *T. cruzi* en las fracciones designadas como: nuclear-flagelar, mitocondrial, microsomal y soluble.

Se observa que la actividad enzimática está concentrada en la fracción celular particulada que sedimenta a 30.000 x g, identificada como mitocondrial.

Tabla III.1.: Ubicación subcelular de la Ferroquelatasa en *T. cruzi*

FRACCION SUBCELULAR	ACTIVIDAD ESPECIFICA	
	Meso	Proto
Nuclear	0	0
Mitocondrial	43,28	12,46
Microsomal	8,87	1,88
Soluble	0,86	0

Las condiciones experimentales son las descritas en Materiales y Métodos. Se emplearon epimastigotes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, crecidos en medio Warren.

Además bajo estas condiciones la actividad de Hemo-S medida empleando mesoporfirina como sustrato, es aproximadamente 4 veces el valor obtenido con el sustrato natural, protoporfirina.

Este hallazgo es interesante pues si se logra demostrar experimentalmente que el parásito es incapaz de utilizar mesohemo para su desarrollo, se abre la posibilidad de bloquear la formación del protohemo esencial, afectando así mediante la administración de mesoporfirina, selectivamente el crecimiento del parásito.

III.2. ESTABILIDAD

En general la mayoría de los ensayos se han llevado a cabo con células recién cosechadas. Además en estudios preliminares se observó que una vez fraccionado el tejido, ocurría una rápida inactivación de la enzima, de manera que era necesario emplearlo dentro del mismo día.

Sin embargo, para ciertos estudios es preciso disponer de mayor cantidad de material que el proveniente de un solo batch de cultivo; en base a ello se investigó la estabilidad de la Hemo-S cuando las células se almacenaron bajo diferentes condiciones.

La Figura III.1. muestra el efecto del almacenamiento a -70°C de las células recién cosechadas y enteras, sobre la actividad de Hemo-S. Se observa que la enzima es muy estable, no pierde actividad dentro de las primeras cuatro semanas y aún luego de 50 días retiene un 25% de su actividad original.

En la Figura III.2. se ilustran los resultados de un ensayo similar, salvo que en una primera etapa se preparó el homogenato por ruptura de las células como se indica en Materiales y Métodos, y posteriormente se lo almacenó a -20°C . En este caso, ya a los 5 días se apreció un 50% de inactivación y a los 12 no se detectó actividad.

III.3. EFEECTO DEL TRITON X-100

Teniendo en cuenta que se planeaba emplear el Tritón X-100 para la posterior liberación de la enzima de la fracción particulada, se resolvió estudiar el efecto del mismo sobre la actividad de Hemo-S; los datos obtenidos se encuentran en la Tabla III.2. Se observa una clara inhibición del 40 y 72% para la

formación de proto- y mesohemo, respectivamente. Este efecto podría atribuirse a la posible interferencia del detergente en la interacción lípido proteína de la enzima, que se sabe es necesaria para su actividad (Simpson y Poulson, 1977; Taketani y Tokunaga, 1981).

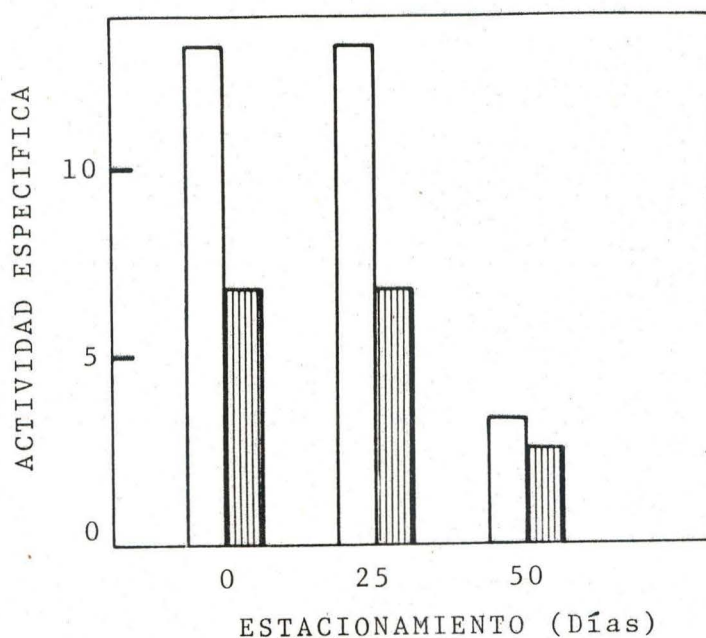


Figura III.1.: Efecto del almacenamiento sobre la actividad de Hemo-S de *T. cruzi*. Las condiciones experimentales son las indicadas en Materiales y Métodos. Las células cosechadas y enteras se guardaron a -70°C . La actividad se midió empleando como sustrato porfirina: mesoporfirina (□) o deuteroporfirina (▨).

III.4. pH OPTIMO

La influencia del pH óptimo sobre la formación de protohemo se ilustra en la Figura III.3., en la cual se observa claramente la existencia de un máximo agudo y bien definido al pH 7,2.

Los resultados de un ensayo similar se muestran en la Figura III.4. para la formación de mesohemo. En este caso, el pH

óptimo también se encuentra en una zona netamente neutra, siendo su valor de 7,5.

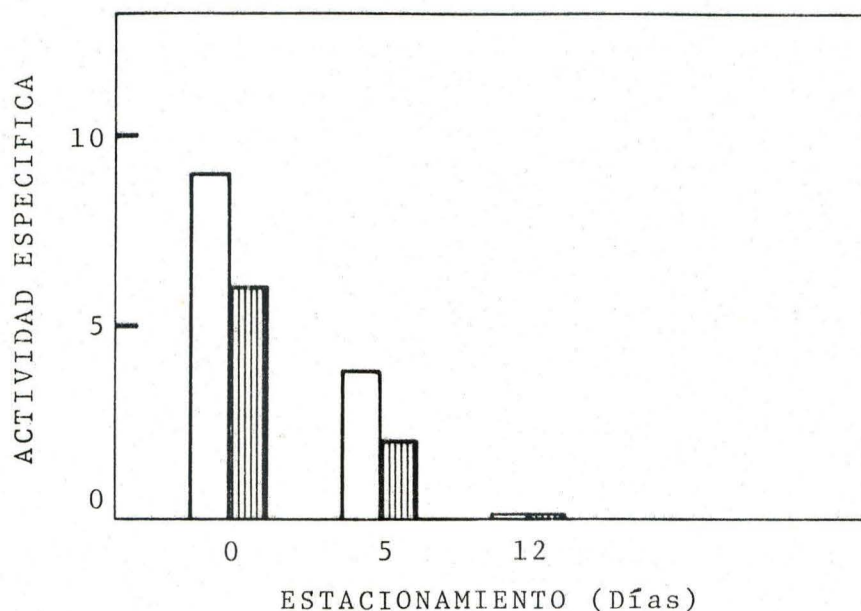


Figura III.2.: Efecto del almacenamiento sobre la actividad de Hemo-S de *T. cruzi*.

Las condiciones experimentales son las indicadas en Materiales y Métodos. Se preparó el homogenato y se lo guardó a -20°C . A los tiempos indicados, se procesaron las muestras y se midió la actividad enzimática en la fracción mitocondrial empleando como sustrato porfirina: mesoporfirina (□) o deuteroporfirina (▨).

III.5. EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA

La Figura III.5. muestra los resultados obtenidos al examinar el efecto de distintas cantidades de preparación enzimáticas sobre la actividad de Hemo-S.

Estos estudios permitieron encontrar tanto para la formación de mesohemo como para la de protohemo un óptimo de actividad, cuando se emplearon 2 mg de proteína. La síntesis máxima de deuterohemo se obtuvo al utilizarse entre 2 y 4 mg de enzima.

En cada caso, a valores por encima o por debajo de los óptimos, se observa una clara disminución en la actividad enzimática.

tica.

En consecuencia, se decidió usar 2 mg de proteína en la mezcla standard de incubación.

Tabla III.2.: Efecto del Tritón X-100 sobre la actividad de Ferroquelatasa de *T. cruzi*.

SUSTRATO	ACTIVIDAD ESPECIFICA		INHIBICION %
	+ Tritón X-100	- Tritón X-100	
Meso	3,53	12,38	72
Proto	3,74	6,27	40

Las condiciones experimentales son las descritas en Materiales y Métodos. Se empleó Tritón X-100 a una concentración final de 0,5% (v/v). La actividad enzimática se determinó usando la fracción particulada (sedimentada a 30.000 x g) de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, crecida en medio Warren.

III.6. EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO PORFIRINA

El efecto de meso-, proto- y deuteroporfirina sobre la velocidad de síntesis de meso-, proto- y deuterohemo se ilustra en las Figuras III.6., III.7. y III.8. respectivamente. Se observan perfiles bastante análogos para los tres sustratos porfirina empleados.

La máxima actividad de Hemo-S corresponde a valores de concentración de 35, 37 y 32 μM , para meso-, proto- y deuteroporfirina respectivamente.

A concentraciones superiores a 30 μM se apreció una clara inhibición por sustrato, particularmente con proto- y meso-porfirina.

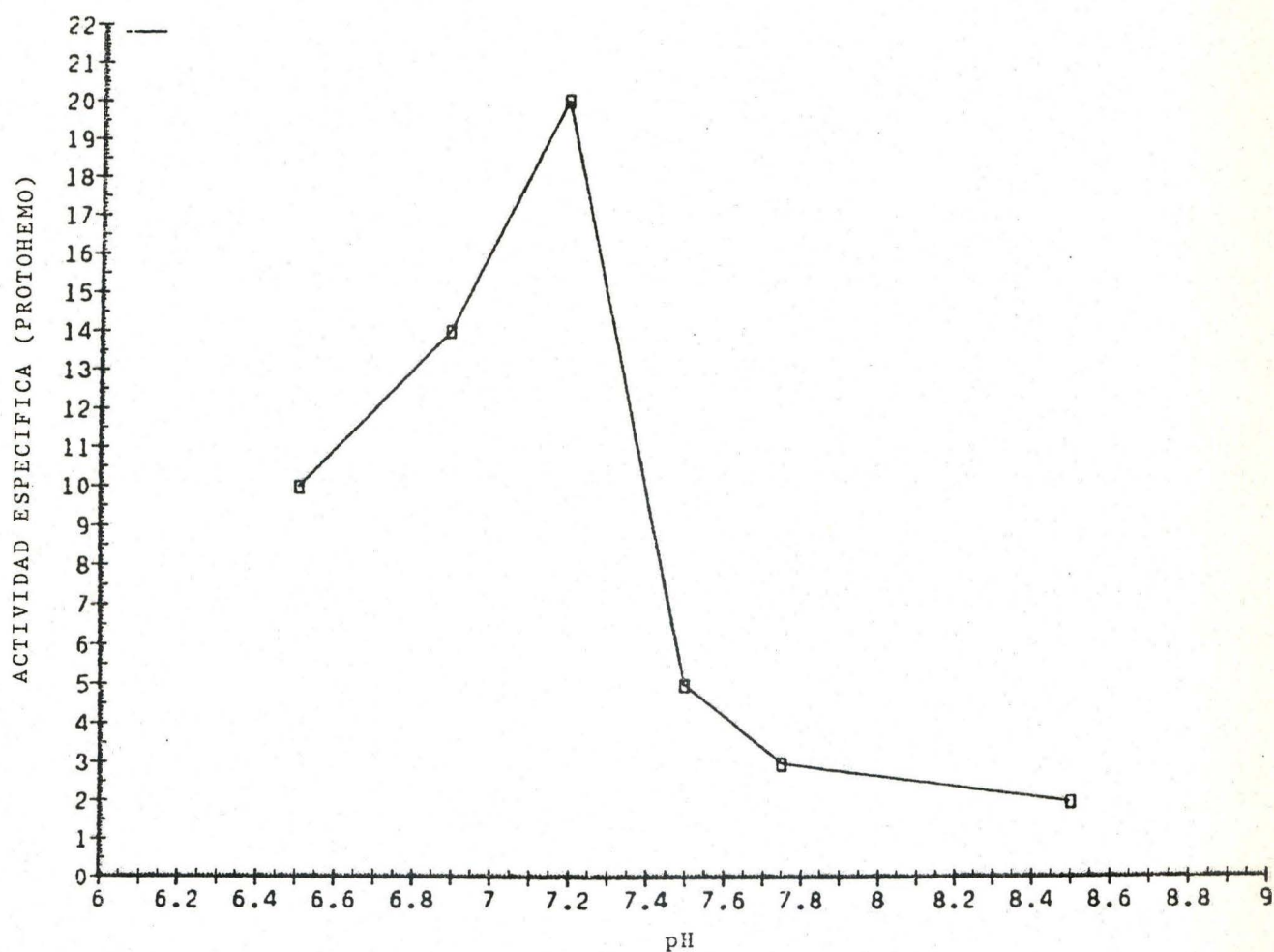


Figura III.3.: Curva de pH óptimo para Hemo-S de *T. cruzi* (formación de protohemo).

Las condiciones experimentales son las indicadas en Materiales y Métodos. Se empleó la fracción particulada (sedimentada a 30.000 x g) de *T. cruzi*, cepa Tulahuén. El rango de pH comprendido entre 6,4 y 8,5 se cubrió empleando buffer fosfato de potasio 0,05 M y Tris-HCl 0,05 M. La actividad de Hemo-S se determinó usando como sustrato porfirina: protoporfirina.

III.7. EFECTO DE ALGUNOS METALES SOBRE LA ACTIVIDAD

Existen numerosas evidencias experimentales que indican que la capacidad de esta enzima para insertar diferentes metales en el núcleo tetrapirrólico depende de la especie y de su habilidad para sintetizar hemos, clorofilas y corrinas (Johnson y Jones, 1964). Por otro lado se sabe que en general la actividad de la Ferroquelatasa depende de la presencia de grupos -SH por cuanto se inactiva por reactivos de tioles, así como por Hg^{2+} y Pb^{2+} .

(Jones, 1984) y en algunos casos el Mn^{2+} y Co^{2+} también son inhibitorios (Hanson y Dailey, 1984).

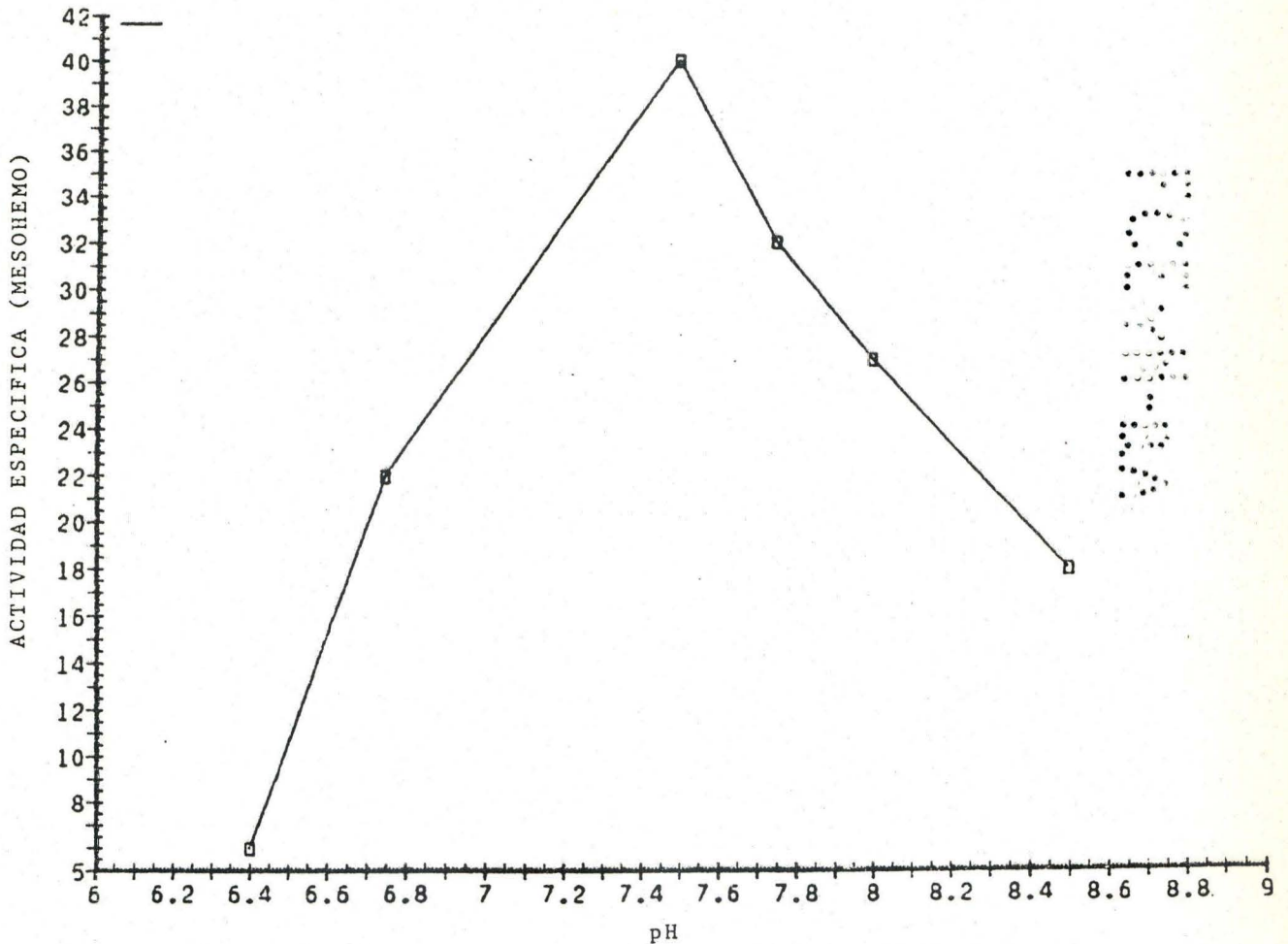


Figura III.4.: Curva de pH óptimo para Hemo-S de *T. cruzi* (Formación de mesohemo).

Las condiciones experimentales son las indicadas en la Figura III.3., salvo que la actividad de Hemo-S se determinó usando como sustrato porfirina: mesoporfirina.

La enzima de hígado bovino es en cambio más activa en presencia de Zn^{2+} que de Fe^{2+} (Taketani y Tokunaga, 1982). De manera que resultó de interés estudiar la acción de algunos metales sobre la actividad de la Hemo-S de *T. cruzi*.

En la Figura III.9. vemos que el agregado de Fe^{2+} 100 μM incrementa varias veces la actividad de Hemo-Sintetasa obtenida a partir del hierro endógeno; lo mismo ocurre en cuanto a la inserción de Zn^{2+} a 100 μM , en tanto que la presencia de Cu^{2+} y Co^{2+} no parecen afectar la formación de hemo, totalmente inhibida por el Mn^{2+} y Mg^{2+} .

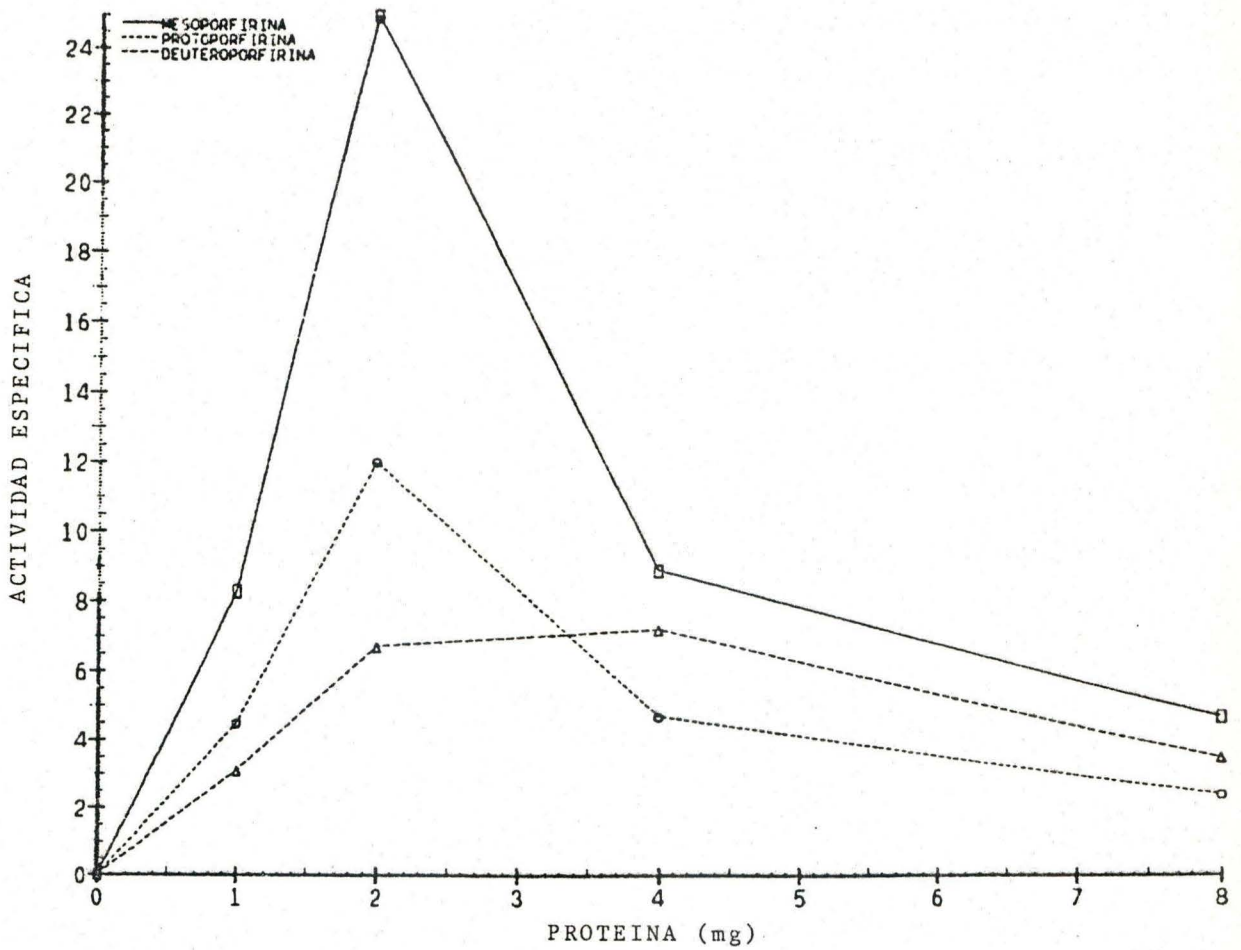


Figura III.5.: Efecto de la cantidad de proteína sobre la actividad de Hemo-S de *T. cruzi*. Se empleó la fracción particulada (sedimentada a 30.000 x g) de *T. cruzi*, cepa Tulahuén. La actividad se midió empleando como sustrato porfirina: (□) mesoporfirina, (○) protoporfirina y (△) deuteroporfirina. Las restantes condiciones experimentales son las descritas en Materiales y Métodos.

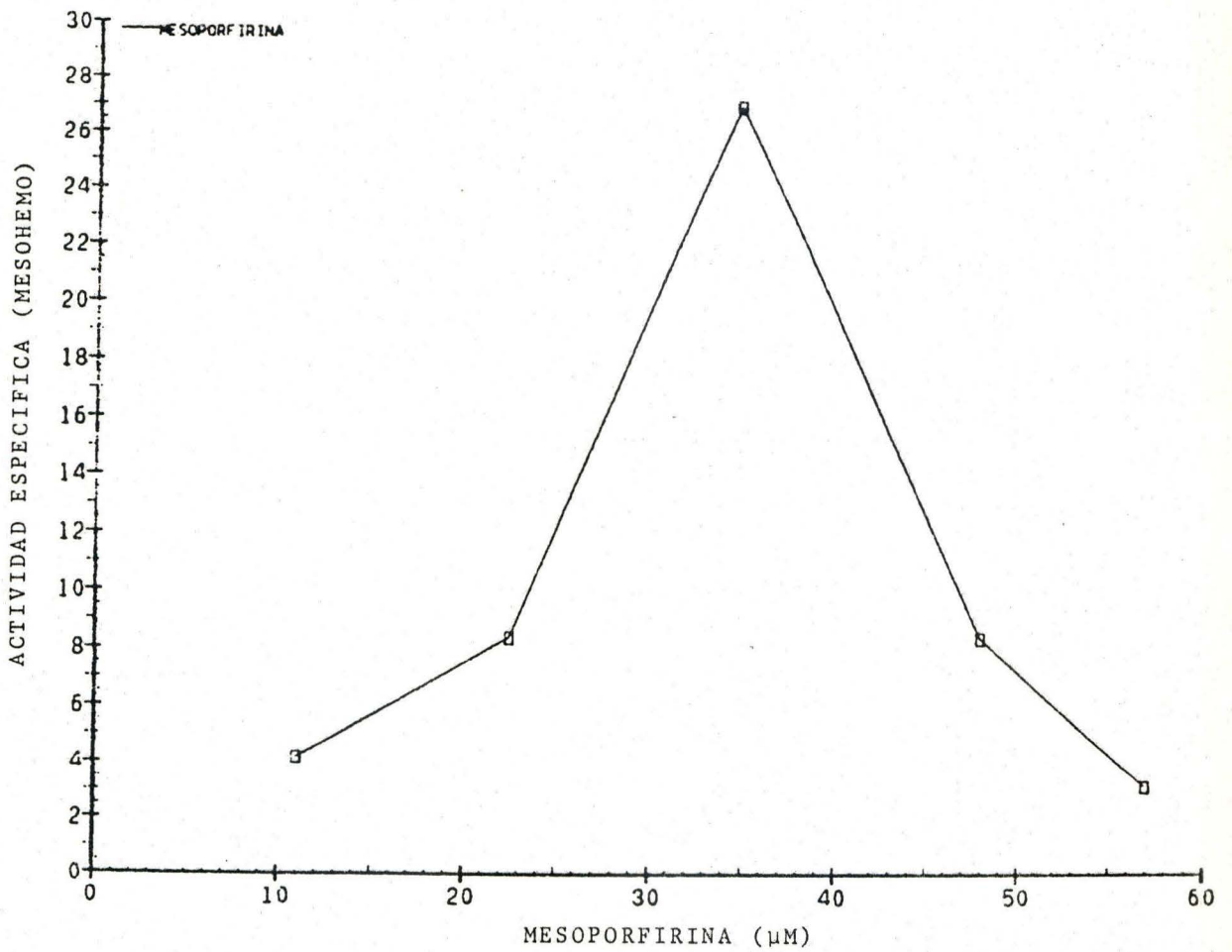


Figura III.6.: Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de Hemo-S de *T. cruzi* (formación de mesohemo). Se empleó como fuente de enzima la fracción particulada (sedimentada a 30.000 x g) de *T. cruzi*, cepa Tulahuén. La actividad se midió usando mesoporfirina como sustrato porfirina. Las restantes condiciones experimentales son las indicadas en Materiales y Métodos.

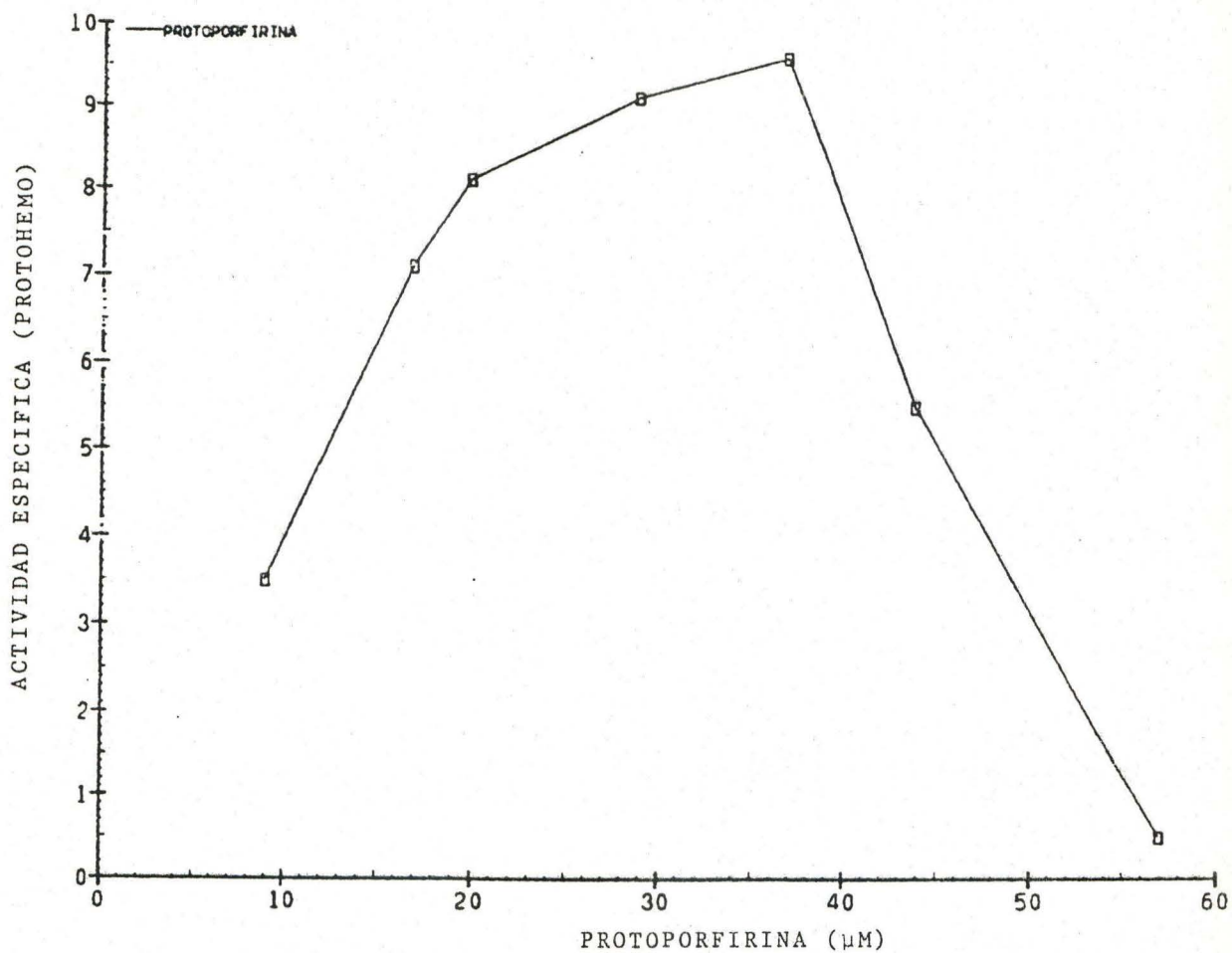


Figura III.7.: Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de Hemo-S de *T. cruzi* (formación de protohemo). Se empleó como fuente de enzima la fracción particulada de *T. cruzi*, cepa Tula huén, sedimentada a 30.000 x g. La actividad se midió usando protoporfirina como sustrato porfirina. Las restantes condiciones experimentales son las indicadas en Materiales y Métodos.

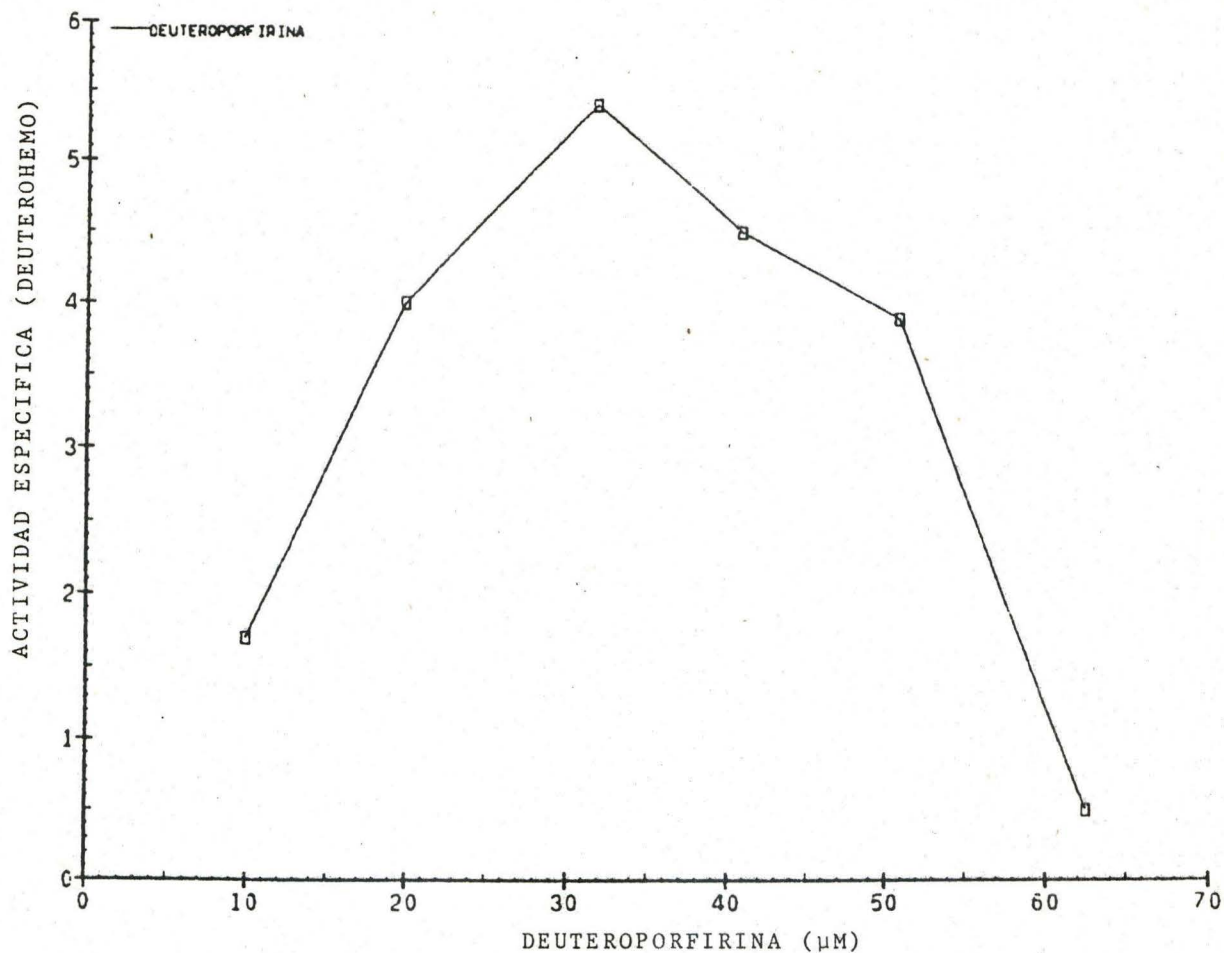


Figura III.8.: Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de Hemo-S de *T. cruzi* (formación de deuterohemo). Se empleó como fuente de enzima la fracción particulada de *T. cruzi*, cepa Tula-huén, sedimentada a 30.000 x g. La actividad se midió usando deuteroporfirina como sustrato porfirina. Las restantes condiciones experimentales son las indicadas en Materiales y Métodos.

La combinación de Fe^{2+} (100 μM) y Zn^{2+} a concentraciones variables (entre 50 y 500 μM) (Figura III.10.) produjo un notable aumento de actividad y son interesantes los datos obtenidos cuando manteniendo como antes el agregado de Fe^{2+} fijo a 100 μM , se modificaron las concentraciones de Cu^{2+} , que a valores mayores que 100 μM y aún a menores, se comportó ahora como un inhibidor.

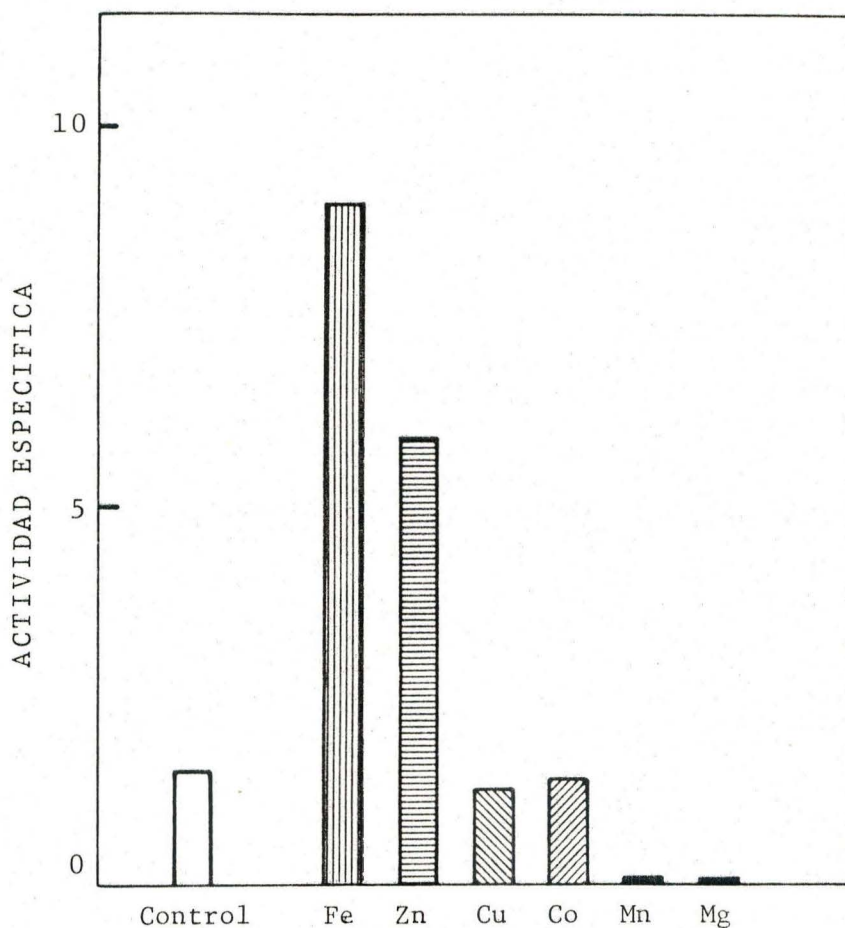


Figura III.9.: Efecto de metales sobre la actividad de Hemo-S de *T. cruzi*.

Se empleó como fuente de enzima la fracción particulada de *T. cruzi* (cepa Y), sedimentada a $30.000 \times g$, y como sustrato porfirina: protoporfirina. El efecto de los diversos metales se ensayó a una concentración final de $100 \mu M$ en la mezcla de reacción. Las restantes condiciones experimentales son las detalladas en Materiales y Métodos, excepto que no se agregó hierro a la mezcla de incubación, de manera que en el control se ha medido la formación de protohemo a partir del hierro endógeno (Romslo, 1980).

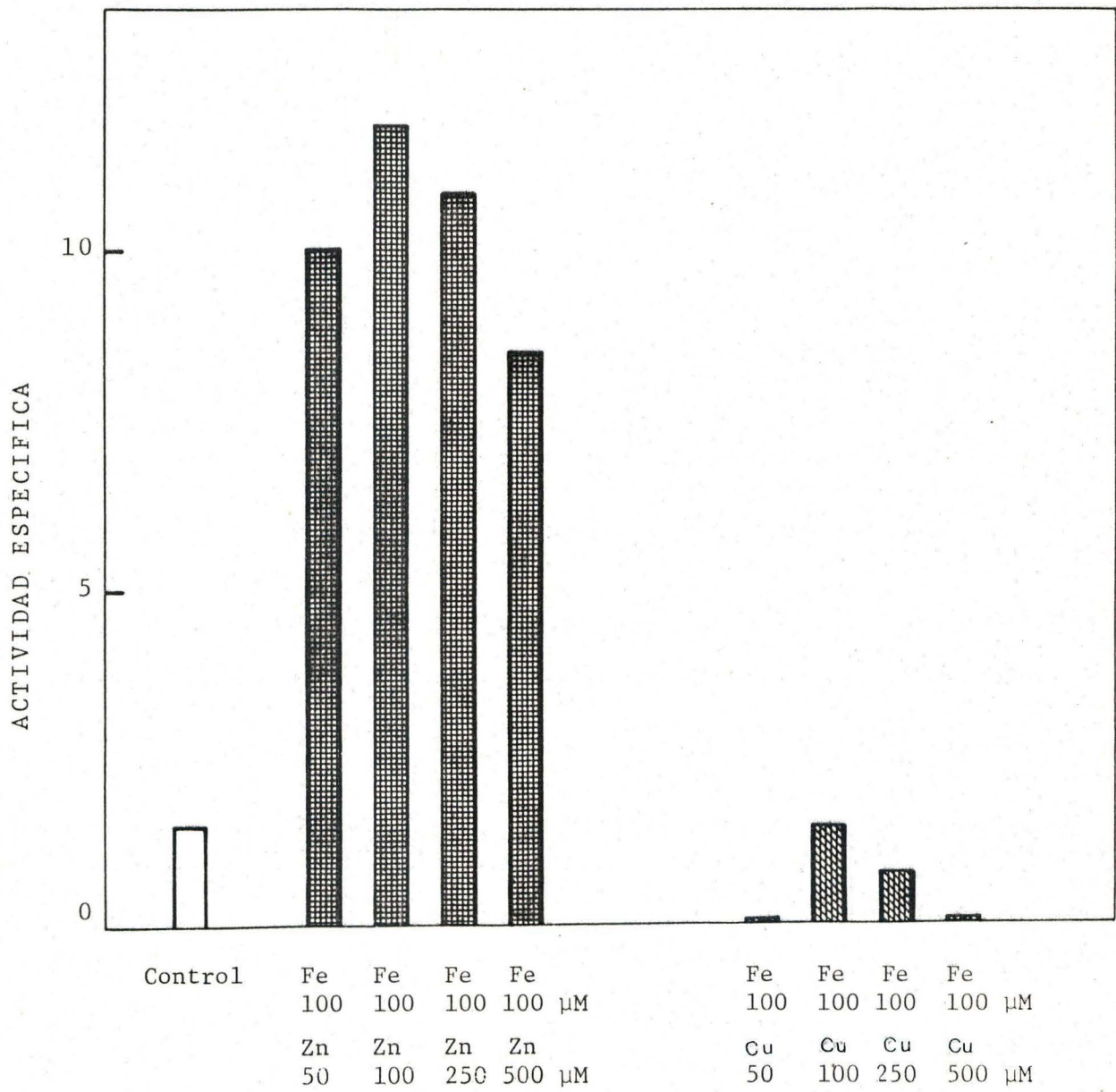


Figura III.10.: Efecto combinado del Fe^{2+} con iones Zn^{2+} y Cu^{2+} sobre la actividad de Hemo-S de *T. cruzi*. El efecto de los diversos metales se ensayó a las concentraciones finales indicadas, agregados a la mezcla de incubación. Las restantes condiciones experimentales son la señaladas en la Figura III.9.

**DISCUSION
Y
CONCLUSIONES**

I. BIOSINTESIS DE HEMO EN *T. cruzi*, CEPA TULAHUEN

Como ya mencionáramos, si bien durante más de 50 años fue un hecho conocido que compuestos hémicos, bajo la forma de hemoglobina, hematina o hemina, constituyeron un singular factor de crecimiento, característico de los hemoflagelados parasíticos (Lwoff, 1951), resultaba muy llamativo que aún no se hubiera dilucidado la razón del requerimiento por esas porfirinas. Se aceptaba que evidentemente podía deberse a su incapacidad para sintetizar el hemo, lo cual podría ser la consecuencia de una deficiencia parcial o total del camino biosintético. Recordando por otra parte que los citocromos (aa_3 , b y c_{558}) son constituyentes esenciales de la maquinaria respiratoria de *T. cruzi* (Boiso y Stoppani, 1973; Docampo y col., 1978; Stoppani y col., 1980), resultaba sumamente interesante y atractiva, en base a la experiencia de este laboratorio, llevar a cabo un estudio acerca de la real capacidad de este hemoflagelado para formar porfirinas y sus precursores. Y este trabajo se inició empleando, como hemos indicado, la forma epimastigote de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*.

Los resultados obtenidos fueron por igual importantes y estimulantes; se midió por primera vez directamente la actividad de varias de las enzimas del camino de las porfirinas, además del contenido de precursores, porfirinas y hemo libres. Los niveles detectados de estos últimos compuestos fueron tan bajos o nulos, que resultaba evidente la capacidad fuertemente limitada del parásito para formar sus propios metabolitos. Esta hipótesis se vio plenamente confirmada con los datos de actividades enzimáticas. Se encontró un nivel alto de Succinil CoA Sintetasa, señalando que esta enzima no sería la limitante. De las dos rutas que llevan a la formación de ALA, la del ALA-S y de la DOVA-T, si tenemos en cuenta solamente los valores de actividad medidos en función de la cantidad de producto resultante, podemos decir que ambas enzimas eran igualmente activas; otro hallazgo interesante, dado que en la actualidad se ha establecido que en un buen número de fuentes ALA-S y DOVA-T son análogamente funcionales (Varticovski y col., 1980; Beale y col., 1981; Noguchi y Mori, 1981; Bajkowski y Friedman, 1982). Podemos agregar que de acuerdo a los niveles de actividad hallados en *T. cruzi*, se podría asignar a esta etapa un carácter regulatorio, similar al observado en la mayoría de los tejidos (Lascelles, 1964).

La medición de ALA-D, ya sea en forma directa o bien agregando Zn^{2+} al medio de incubación, un conocido reactivante de la enzima (Brocklehurst y col., 1980), reveló que los niveles de ALA-D en *T. cruzi* eran casi indetectables; en consecuencia insuficientes para mantener una síntesis adecuada de PBG. Hasta aquí podríamos haber establecido entonces que una de las razones de esa incapacidad de *T. cruzi* para formar porfirinas sería una falla a la altura del ALA-D. Sin embargo, tampoco se hallaron valores de actividad mensurables de PBG-asa o Deaminasa, explicando una vez más, la total ausencia de porfirinas libres y de acuerdo con el único dato, hasta ese momento de una medida de Deaminasa en un parásito de esta familia, correspondiente a Chang y col. (1975). Estos hallazgos sugerirían entonces también la falta o inactivación completa del complejo enzimático responsable de la ciclación del PBG en el primer tetrapirrol intermediario de esta cadena metabólica.

Recordemos que ya en 1934, Lwoff había observado que en *Crithidia fasciculata*, la sangre, hematina o hemina, podían reemplazarse por la protoporfirina, que permitía el crecimiento y estimulaba la respiración del hemoflagelado, de lo cual surgía que el mismo podría incorporar hierro en la molécula de la porfirina. Algunos años después, Granick y Gilder (1947) hallaron lo mismo para *H. influenzae* y más recientemente, en cultivos libres de simbiosis de *Blastocrithidia culicis* y *Crithidia oncopelti* (Chang y col., 1975). Estos resultados estaban también revelando, indirectamente que la enzima que insertaba el hierro en la protoporfirina, es decir la Hemo-S debía ser funcional en estos parásitos. Sin embargo también se demostró que otras cepas de *H. influenzae*, la variedad 571 de *Staphylococcus aureus* y *Leishmania tarentolae* solamente respondían al agregado de compuestos del hemo y no a la protoporfirina, sugiriendo que carecerían de Hemo-S o ésta sería inactiva (Jensen y Thofern, 1953; Gaughan y Krassner, 1971). En este trabajo, se ha establecido que la cepa Tula-huén de *T. cruzi* pertenece al primer grupo de hemoflagelados, ya que ha sido posible detectar una buena actividad enzimática, empleando diferentes porfirinas como sustrato.

Recapitulando, se ha demostrado experimentalmente por primera vez que en *T. cruzi* las enzimas particuladas Suc.CoA-S, ALA-S, DOVA-T y Hemo-S, son fácilmente detectables y funcionales, en tanto que el ALA-D, la PBG-asa (y la Deaminasa) y probablen

te las demás enzimas del camino del hemo ubicadas en el citosol, están ausentes o son completamente inactivas. Estos hallazgos nos han llevado a proponer, que los tripanosomátidos deben haber perdido parte de su capacidad de biosíntesis del hemo, probablemente a causa de mutaciones de aquellos genes estructurales involucrados en la síntesis de las llamadas enzimas solubles; en consecuencia el flagelado toma del huésped el sustrato porfirina, produciéndose así un tipo de cooperación complementaria entre huésped y parásito que permite al último desarrollarse. Por qué o cómo han ocurrido estas mutaciones, aún no tenemos la respuesta a estos interrogantes y la explicación es también especulativa; sin embargo, estos datos pueden resultar útiles para el desarrollo de alguna alternativa terapéutica dirigida lógicamente a la destrucción selectiva del *T. cruzi*, si encontráramos la forma de disociar esa especie de compartimentalización celular para la biosíntesis del hemo entre parásito y huésped, que deprive al primero del protohemo y consecuentemente impida su multiplicación.

II. BIOSINTESIS DE HEMO EN *T. cruzi* y *Criethidia deanei*

INFLUENCIA DE LAS CEPAS Y EL MEDIO DE CULTIVO Y DEL ENDOSIMBIONTE

- De las cepas y medios de cultivo:

Una vez establecido que en la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, el requerimiento nutricional por compuestos del hemo se debía a la incapacidad del parásito para sintetizar su propio hemo a causa de la ausencia o inactividad de las llamadas enzimas solubles del camino de las porfirinas, era importante intentar generalizar este concepto a otras cepas de *T. cruzi*, en vista de que algunas cepas de este parásito exhiben algunas diferencias en su comportamiento biológico. Recordemos que precisamente, Brener y Chiari (1963) y Brener (1973) habían demostrado que la variada respuesta biológica de diferentes cepas de *T. cruzi* dependía por ejemplo de cambios en su morfología. Algunas cepas, tales como la cepa Y, muestran una predominancia de formas alargadas, mientras que otras tales como la CL, tienen una predominancia de formas más anchas. Se ha sugerido que las últimas son las responsables de la infección de las células vertebradas mientras que las formas anchas presentan mayor capacidad para infectar el huésped invertebrado.

Los estudios llevados a cabo incubando las formas sanguíneas de *T. cruzi* con sueros conteniendo anticuerpos contra el parásito, indican que la superficie celular del parásito puede variar de una cepa a otra.

Kretlli y Brener (1976) y Kretlli (1978) analizaron profundamente este aspecto, demostrando que mientras el suero aglutinaba las formas sanguíneas de la cepa Y, no lo hacía con los de la cepa CL. Kretlli (1978) demostró además que los tripomastigotes de la cepa Y, aislados de ratones en el pico de parasitemia, se lisaban al incubarlos en presencia de suero humano normal, fresco e inactivado. Esta lisis era dependiente de la activación, principalmente a través del camino alternativo del complemento, por inmunoglobulinas adheridas a la superficie del parásito. Los tripomastigotes de la cepa CL a pesar de poseer también inmunoglobulinas adheridas a su superficie celular no son capaces de activar el complemento. Todos estos datos indican la existencia de diferencias entre las cepas Y y CL de *T. cruzi*, que podrían estar relacionadas con su superficie celular y podrían ex-

plicar las diferencias que se encontraron en la interacción de las dos cepas con macrófagos. Los macrófagos pueden desempeñar un rol importante en la resistencia del huésped a la infección por *T. cruzi*. Sin embargo, el *T. cruzi* puede penetrar y multiplicarse en estas células. Por estos motivos, la interacción macrófago-*T. cruzi* también ha sido extensamente estudiada en ambas cepas (Alcántara y Brener, 1978; Kipnis y col., 1979; Meirelles y col., 1980). Los resultados de Alcántara y Brener (1978) y de Kipnis y col (1979) muestran una marcada diferencia en la capacidad de los tripomastigotes de las dos cepas para infectar macrófagos de ratón. Aquellos de la cepa Y fueron 20-30 veces (Alcántara y Brener, 1978) o 6 veces (Kipnis y col., 1979) más infectivos que aquellos de la cepa CL. Los resultados de Meirelles y col. (1980), usando macrófagos de pollo, también indicaron que los tripomastigotes de la cepa Y eran más infectivos que aquellos de la cepa CL. Sin embargo, la diferencia en el porcentaje de células infectadas no fue tan marcada como la encontrada para macrófagos de ratón. Después de 6 horas de contacto, observaron que 80% y 40% de las células estaban infectadas con las cepas Y y CL respectivamente. Considerando el número promedio de parásitos/célula, la diferencia es acentuada, dado que después de 12 horas prácticamente todos los tripomastigotes de la cepa Y estaban dentro de los macrófagos, mientras que muchos de los tripomastigotes de la cepa CL no penetraron, sino que permanecieron en el medio de cultivo. Este mismo grupo de investigadores, encontró también diferencias significativas en la capacidad para infectar los macrófagos por parte de las formas epimastigotes de ambas cepas, después de un corto período de incubación. Prácticamente todos los macrófagos se infectaron con epimastigotes de la cepa CL, mientras que sólo un 50-67% se infectaron con epimastigotes de la cepa Y. Sin embargo, de todos estos resultados aún no surge claramente cuáles podrían ser los factores involucrados en los diferentes comportamientos *in vivo* e *in vitro* de las cepas Y y CL.

Otra diferencia que existe entre estas dos cepas es con respecto a su tropismo tisular (Melo y Brener, 1978). Cuando la cepa Y se inocula en ratones, muestra un marcado tropismo por células del sistema fagocítico mononuclear, mientras que la cepa CL tiene un tropismo por células musculares. Se observó, por ejemplo, un extremadamente alto parasitismo de bazo, hígado y médula ósea en ratones inoculados con la cepa Y, en tanto que

cuando fueron inoculados con la cepa CL, los parásitos estaban prácticamente ausentes en estos órganos. Aparentemente las formas tripomastigotes sanguíneas presentan diferencias que facilitan o previenen su captación por macrófagos del sistema fagocítico mononuclear. Es decir, que este fenómeno de captación dependería no sólo de la estructura de la membrana del macrófago sino también de variaciones en las propiedades de membrana de los distintos parásitos. Estos estudios son sumamente importantes dado que las diferencias en la distribución de *T. cruzi* podrían ser factores sumamente importantes que influirían en la patogenia de la enfermedad de Chagas. En la actualidad, existen diversos grupos de trabajo dedicados al estudio de la existencia de este fenómeno de tropismo tisular en humanos.

Las existencia de esas diferencias biológicas, patológicas e inmunológicas entre las cepas Y y CL, las convierte en modelos clásicos para el estudio de cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Resultó entonces de interés confirmar o no los datos obtenidos con la cepa Tulahuén en estas dos cepas del hemoflagelado. Además de las razones fundamentadas anteriormente la elección de las cepas Y y CL, para nuestros estudios, se debe también a que ambas habían sido aisladas en áreas endémicas de enfermedad de Chagas, donde se están llevando a cabo investigaciones relacionadas con epidemiología, prevención y control de la enfermedad por diversos grupos de investigadores, con los cuales se ha establecido una importante comunicación.

Con respecto al medio de crecimiento, evidencias previas han sugerido que el mismo podría interferir con la exposición de los sitios que contienen o unen azúcares localizados sobre la superficie celular (Araujo-Jorge y De Souza, 1984).

De manera que se decidió ampliar el enfoque al estudio de la influencia de este otro factor.

- De *Crithidia deanei* y el endosimbionte:

El requerimiento de *C. deanei* por hemo (Mundim y col., 1974) es el mismo que el encontrado en otros flagelados de insectos libres de endosimbiontes. Este requerimiento, también observado en *Rickettsia* (Myers y col., 1972), bacterias (Lascelles, 1962) y posiblemente en algunos insectos hematófagos (Lwoff, 1951) indica una lesión metabólica en la cadena biosintética de

hemo de estos organismos. Sin embargo, el crecimiento de *C. deanei* (Mundim y col., 1974), *C. oncopelti* y *Blastocrithidia culicis* (Chang y col., 1975), todos organismos poseedores de endosimbiontes de tipo bacteriano, en un medio libre de hemina sugiere que los endosimbiontes aportarían la capacidad biosintética de hemo al huésped flagelado. En el presente trabajo se demuestra que las bacterias endosimbiontes aumentan la actividad de varias enzimas asociadas con el camino biosintético de hemo en *C. deanei*.

- De los resultados:

Nuestros datos demuestran que el contenido de ALA varía marcadamente de acuerdo a la cepa de *T. cruzi* y al medio empleado para su crecimiento. La cantidad de ALA es mucho menor cuando los parásitos crecen en medio LIT que en medio Warren. Los epimastigotes de la cepa Y contienen mucho menos ALA que aquellos de la cepa CL. Es importante señalar que no se pudo detectar ALA en los epimastigotes de la cepa Y crecidos en medio LIT. La concentración de ALA encontrada en epimastigotes de *T. cruzi* (cepas Y y CL, crecidos en medios Warren y LIT, respectivamente), es del mismo orden que la encontrada en *Crithidia deanei*. Sin embargo, la concentración de ALA en epimastigotes de la cepa CL crecidos en medio Warren, es aproximadamente 6 veces más alta que la hallada en los parásitos de la cepa Y.

La incapacidad para utilizar ALA por los tripanosomátidos, ya había sido revelada mediante estudios nutricionales en *Leishmania tarentolae* (Gaugham y Krassner, 1971) y *Blastocrithidia culicis* y *Crithidia oncopelti* (Chang y col., 1975). Sin embargo, se demostró que el ALA podía penetrar en *L. tarentolae* (Gaugham y Krassner, 1971). La detección de ALA, en *Crithidia deanei* crecida en un medio químicamente definido, que no posee ALA, indica que por lo menos este tripanosomátido es capaz de sintetizar este intermediario metabólico.

Con relación al PBG, nuestros datos muestran que su concentración no varía marcadamente de acuerdo con la cepa. La concentración de PBG en *T. cruzi* es más alta que la encontrada en *Crithidia deanei* con o sin endosimbionte.

Los estudios nutricionales previos llevados a cabo en muchos miembros de la familia Tripanosomatidae, asociados a la ob

servación de la baja, si alguna, cantidad de porfirinas y hemo en las 3 cepas de *T. cruzi* analizadas (Tulahuén, Y y CL) y en las cepas que contienen simbiontes de *Crithidia deanei*, y en *C. oncopelti* y *B. culicis* (Chang y col., 1975), apoyan la teoría de que los tripanosomátidos son incapaces de una adecuada síntesis de porfirinas o hemo.

Como señaláramos la participación de succinil CoA a través de su condensación con glicina para producir ALA es un paso bien establecido, que forma parte de la biosíntesis de porfirinas. En consecuencia, la enzima Suc.CoA-S está involucrada en el camino de los tetrapirroles (Batlle y col., 1975). Nuestras observaciones indican una cierta variación en la actividad de la enzima de acuerdo a la cepa y al medio de crecimiento. En el caso de *T. cruzi*, es alta para los parásitos de la cepa CL crecidos en medio Warren y muy baja para los parásitos de la cepa Y crecidos en este mismo medio. Esta observación sugiere que los componentes del medio Warren podrían inhibir la síntesis o expresión de esta enzima en epimastigotes de la cepa Y. La baja actividad de Suc.CoA-S no es una característica de los epimastigotes de la cepa Y dado que ellos muestran una alta actividad cuando se los transfieren al medio LIT. Los estudios usando epimastigotes de la cepa Tulahuén, habían revelado una actividad de Suc.CoA-S del orden de 12 y 1,5 veces mayor que la observada para epimastigotes de las cepas Y y CL, respectivamente. En *Crithidia deanei*, la actividad de Suc.CoA-S detectada fue relativamente baja.

Recordemos que teniendo en cuenta que el ALA se puede formar por la vía del ALA-S y por el llamado camino de los 5 carbonos a partir del DOVA en una reacción mediada por la DOVA-T, también se midieron ambas actividades en estas cepas. Los datos obtenidos indican la presencia de ambas rutas para la formación de ALA, en *T. cruzi*. La única excepción la encontramos con los parásitos de la cepa CL crecidos en medio Warren, para los cuales no pudo detectarse actividad de DOVA-T. En general, la actividad de ambas enzimas fue mucho menor que la encontrada en *Crithidia deanei*.

El ALA-S fue activa en todas las cepas de *T. cruzi*, pero notemos que su actividad fue mucho menor que la detectada en *Crithidia deanei* conteniendo endosimbionte.

La observación de que los epimastigotes de la cepa CL crecidos en medio Warren no expresan actividad de DOVA-T, sugiere

re que en este caso la síntesis de ALA depende exclusivamente del funcionamiento de la enzima ALA-S.

Nuestras medidas de actividad de ALA-D, PBG-asa y Deaminasa en las cepas Tulahuén, Y y CL de *T. cruzi* sugieren ausencia o total inactivación de las mismas. En el caso de PBG-asa y Deaminasa, solamente cuando la actividad se midió como función de la cantidad de PBG consumido en lugar de porfirinas formadas, pudo detectarse actividad en las cepas CL y Tulahuén, crecidas en medio Warren. Sin embargo, es probable que este consumo se deba a reacciones laterales que convierte al PBG en productos diferentes de los porfirinógenos (Frydman y col., 1972), por lo tanto sin relevancia para la síntesis de hemo.

Teniendo en cuenta que la Hemo-S cataliza la inserción de hierro en diferentes porfirinas, estudiamos el comportamiento de esta enzima en extractos de *T. cruzi*, empleando como sustratos proto-, meso- y deuteroporfirina.

Nuestros datos muestran que usando meso- o protoporfirina como sustrato, la actividad es mucho más alta en los parásitos de la cepa CL que en aquellos de la cepa Y. Estos resultados confirman los obtenidos previamente con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, confirmando así la total funcionalidad de la Ferroquelatasa en este hemoflagelado.

Chang y col. (1975) hallaron resultados similares en *B. culicis* y *C. oncopelti*.

También demostramos en este trabajo que la Hemo-S es activa en *C. deanei*, con o sin endosimbionte, aunque los niveles fueron menores en las distintas cepas de *T. cruzi*.

Los datos obtenidos en el presente trabajo, han demostrado por primera vez que la cepa de *T. cruzi*, así como el medio en el cual se cultivan los parásitos tienen una marcada influencia sobre la actividad de varias de las enzimas involucradas en la biosíntesis del hemo, confirmándose sin embargo en otras cepas y en *C. deanei*, el esquema de funcionalidad enzimática encontrado originalmente para la cepa Tulahuén y la propuesta de una inadecuada biosíntesis del hemo por parte de los hemoflagelados. Un razonamiento similar como lo hemos señalado, se hacía extensivo a *Crithidia*, en cuyo caso la presencia del endosimbionte, aumentaría la actividad de algunas enzimas y el contenido de precursores con respecto al flagelado libre de endosimbionte. Estos ha-

llazgos demuestran que los flagelados conteniendo endosimbionte exhiben mayor funcionalidad enzimática que los flagelados sin endosimbiontes. Este evento, agregado a que *C. deanei* poseedora de endosimbiontes puede ser cultivada en un medio carente de hemina, sugiere que la presencia del endosimbionte aumenta una limitada capacidad biosintética de la cadena del hemo de los tripanosomátidos, suplementando ciertas enzimas de esa vía.

Enfatizamos el hecho de que todas las enzimas del camino biosintético del hemo que fueron detectadas en *T. cruzi* (cepas Tulahuén, Y y CL) así como en *Crithidia deanei*, son particuladas, mientras que aquellas confinadas al citoplasma se hallan ausentes o son inactivas; revelando así que los tripanosomátidos serían deficientes en la síntesis de las enzimas solubles. Es interesante acotar que algunas de las enzimas del camino glicolítico detectadas en estos parásitos también son particuladas y están localizadas dentro de un tipo especial de peroxisoma designado como glicosoma (Opperdoes y col., 1977).

III. HEMO SINTETASA DE *T. cruzi*

Teniendo en cuenta que la Hemo-S de *T. cruzi* resultó ser totalmente funcional y con el objeto de establecer si existían algunas diferencias definidas entre el comportamiento de la enzima del flagelado y el huésped se estudiaron entonces algunas propiedades de la Hemo-S de *T. cruzi*, empleándose las cepas Tula-huén o Y, obteniéndose, como se esperaba prácticamente los mismos resultados.

De los resultados obtenidos hasta el momento podemos señalar que la Hemo-S de *T. cruzi* exhibe una serie de características similares a la enzima de otras fuentes, como por ejemplo su localización celular; prácticamente concentrada en la fracción particulada identificada como la mitocondrial (Lockhead y Goldberg, 1961; Tokunaga y Sano, 1972; Ulvik y Romslo, 1978). Esta distribución le impone ciertas restricciones a la enzima, y a su vez le confiere algunas propiedades regulatorias, sus sustratos, metal y porfirina deben atravesar las membranas mitocondriales y una vez formado el hemo, éste debe ser transferido de la matriz al citosol, donde tiene lugar la síntesis de la proteína de los citocromos de manera que pueda unirse a las diferentes apoproteínas para dar lugar finalmente a la holoproteína activa. Teniendo en cuenta que el protohemo posee una importante función en el control de la síntesis de las apoproteínas (Ochoa y De Haro, 1979), además de formar parte de los citocromos mismos, se podría pensar en la posibilidad de afectar selectivamente su formación en el parásito. Así, dado que también hemos demostrado que la Hemo-S de *T. cruzi* es capaz de emplear meso, deuterio y protoporfirina como sustratos, y que es varias veces más activa con el primero de ellos, si se puede demostrar *in vivo*, que el parásito no se desarrolla cuando reemplazamos el protohemo por mesohemo, la administración de mesoporfirina podría afectar específicamente la replicación del flagelado.

Esta es una posibilidad que debe considerarse, para la cual se han iniciado algunos estudios de tipo nutricional y enzimáticos; aún con poco éxito, por cuanto debe resolverse primero, cuál debe ser la forma más adecuada de administración de la porfirina, dado que estos compuestos son conocidos fotosensibilizadores, y su aplicación como agentes terapéuticos, como en el caso del cáncer (Kessel y col., 1986) produce reacciones cutáneas

adversas. Además, teniendo en cuenta que otras porfirinas como la 2,4 bis-acetaldeuteroporfirina y la 2,4-disulfonato deuteroporfirina son inhibidores competitivos de la Hemo-S de mamíferos (Dailey y Fleming, 1983) pero muy buenos sustratos de la enzima de bacterias (Dailey y col., 1986), lo cual sugiere que el sitio de unión de la porfirina en la Hemo-S de bacterias difiere del sitio de unión en mamíferos, sería importante establecer si el comportamiento de la Hemo-S de *T. cruzi* es similar al de las bacterias. De esta forma dispondríamos de otras alternativas en cuanto al tipo de porfirina y esto es particularmente interesante, pues se están preparando éteros derivados de las porfirinas mencionadas que son 10 veces más efectivos que los empleados hasta ahora en el tratamiento del cáncer (Rimington y col., 1986).

Se ha evidenciado también, como en otras fuentes que la interacción lípido-proteína es importante para la actividad (Taketani y Tokunaga, 1981; Hanson y Dailey, 1984) y tampoco ha habido diferencias significativas en cuanto al pH óptimo, aún empleando otros sustratos además de la protoporfirina.

Sin embargo, otro comportamiento aparentemente característico de la Hemo-S de *T. cruzi* que debemos destacar ha sido su reactividad frente a diferentes metales. En general se ha encontrado que cierto número de metales divalentes pueden actuar como sustratos (Jones, 1984), tales como Fe^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y aún Cu^{2+} . De ellos el Fe^{2+} será el sustrato natural, a pesar de que a pH's neutro o ligeramente alcalinos, como suele ser el caso para la enzima de la mayoría de las fuentes, es relativamente inestable y tiende a oxidarse a Fe^{3+} , de manera que la célula debe recurrir a algún mecanismo para mantener el hierro al estado reducido, y recientemente se ha demostrado incorporación enzimática de Fe^{3+} en la Ferroquelatasa de *Rp. spheroides* (Moody y Dailey, 1985). Algunos metales, como Cd^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} se incorporan con igual facilidad enzimática y no enzimáticamente en las porfirinas, de manera que estos son aspectos a considerar; otros metales como Pb^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} y en algunas condiciones Cu^{2+} son inhibidores de la enzima y Mg^{2+} no ha tenido efecto (Hanson y Dailey, 1984; Jones, 1984; Dailey y col., 1986).

Nuestros datos han demostrado que el Fe^{2+} será también el mejor sustrato de la Hemo-S de *T. cruzi*, aunque el Zn^{2+} se incorpora con buena actividad y vimos que Cu^{2+} y Co^{2+} no alteraban la enzima, confirmándose que Mn^{2+} era inhibitorio y también Mg^{2+} .

El agregado simultáneo de Zn^{2+} y Fe^{2+} produjo una estimulación de la actividad; pero lo más interesante fue que la presencia de Cu^{2+} , además del sustrato natural Fe^{2+} en la mezcla de incubación, convirtió al primero en un inhibidor de la Hemo-S de *T. cruzi*. Este comportamiento diferencial frente al Cu^{2+} es un punto que se investigará en detalle por cuanto abre otra posibilidad de destruir selectivamente al parásito, inactivando en forma específica su Hemo-S.

REFERENCIAS

INTRODUCCION - I

- Adler, S. (1934) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 28, 201.
- Akhtar, M.; Abboud, M.M.; Barnard, G.; Jordan, P. & Zaman, Z. (1976) *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 273, 117.
- Akhtar, M. & Jordan, P.M. (1979) *Compr. Org. Chem.* 5, 1121.
- Anderson, P. & Desnick, R.J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 1993.
- Anderson, W.A. & Ellis, R.A. (1965) *J. Protozool.* 12, 483.
- Aoki, Y.; Wada, O.; Urata, G.; Takaku, F. & Nakao, K. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 568.
- Aragonés, A.; García, R.; San Martín de Viale, L.; Tomio, M. & Grinstein, M. (1972) *An. Asoc. Qca. Arg.* 60, 239.
- Bajkowski, A. & Friedmann, H.J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2207.
- Barreiro, O.L.C. de (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 178, 412.
- Batlle, A.M. del C.; Benson, A. & Rimington, C. (1965) *Biochem. J.* 97, 731.
- Batlle, A.M. del C.; Ferramola, A.M. & Grinstein, M. (1967) *Biochem. J.* 64, 80.
- Batlle, A.M. del C.; Llambías, E.B.C.; Wider de Xifra, E.A. & Tigier, H.A. (1975) *Int. J. Biochem.* 6, 591.
- Batlle, A. & Rossetti, M. (1977) *Int. J. Biochem.* 8, 251.
- Batlle, A.M. del C. & Stella, A.M. (1978) *Int. J. Biochem.* 9, 861.
- Batlle, A.M. del C.; Stella, A.M.; Ferramola, A.M.; Sopena, Y.; Wider de Xifra, E.A. & Sancovich, H.A. (1978) *Int. J. Biochem.* 9, 401.
- Battersby, A.; Buckley, D.; Mac. Donald, E. & Williams, D. (1977 b) *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 117
- Battersby, A.; Fookes, C.; Matcham, G. & Mc Donald, E. (1980) *Nature* 285, 17.
- Battersby, A.R. & Mc Donald, E. (1975) en "Porphyrins and Metalloporphyrins" (Smith, K.M.; ed.). Elsevier, Amsterdam, p. 61.
- Battersby, A.; Mc Donald, E.; Williams, D. & Wrziger, H.J. (1977 a) *Chem. Soc. Chem. Comm.* 113.
- Beale, S.I. (1978) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 95.
- Beale, S.I.; Gough, S.P. & Granick, (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2719.
- Berry, A. & Jordan, P. (1981) *Biochem. Soc. Trans.* 9 (3) 593.

- Bogorad, L. (1955) *Science* 121, 878.
- Bogorad, L. (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 516.
- Bogorad, L. (1976) en "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" (Goodwin, T.W.; ed.), Academic Press, New York, vol 1, capítulo 2.
- Brigs, D.W.; Condie, L.W.; Sedman, R.M. & Tephly, T.R. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4996.
- Brown, E.G. (1958) *Biochem. J.* 70, 313.
- Burnham, B.F. (1962) *Biochem. J.* 84, 15 P.
- Burnham, B.F. (1970) *Methods Enzymol.* 17 A, 195.
- Burnham, B.F. & Lascelles, J. (1963) *Biochem. J.* 87, 462.
- Burton, G.; Fagerness, P.; Hosozawa, S.; Jordan, P. & Scott, J. (1979) *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 202.
- Carell, E.F. & Kahn, J.S. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.* 108, 1.
- Cavaleiro, J.A.S.; Kenner, G.W. & Smith, K.M. (1974) *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* 1, 1188.
- Conford, P. (1964) *Biochem. J.* 91, 64.
- Cookson, C. & Rimington, C. (1953) *Nature* 171, 875.
- Cowperthwaite, J.; Weber, M.M.; Packer, L. & Hutner, S.H. (1953) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 56, 972.
- Cha, S. & Park, R. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 1968.
- Chang, K.P. (1983) *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 14, 267.
- Chang, C.S. & Chang, K.P. (1985) *Mol. Biochem. Parasit.*, 267.
- Chang, K.P.; Chang, C.S. & Sassa, S. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2979.
- Chang, K.P. & Trager, W. (1974) *Science* 183, 531.
- Cheh, A. & Neilands, J. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 1060.
- Chu, T. & Chu, E. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 215, 377.
- De Carvalho, T.U. & De Souza, W. (1977) *J. Parasitol.* 63, 1116.
- De Carvalho, T.U.; Souto-Pradón, T. & De Souza, W. (1979) *Exp. Parasitol.* 47, 297.
- De Souza, W.; Grynberg, N. & Nery-Guimarães, F. (1975) *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 9, 143.
- De Souza, W.; Rossi, M.A.; Kitajima, E.W.; Santos, R. & Roitman, I. (1976) *Can. J. Microbiol.* 22, 197.
- De Vernuil, H.; Grandchamp, B. & Nordmann, Y. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 611, 174.
- Dressel, E.I.B. & Falk, J.E. (1953) *Nature* 172, 1185.
- Dressel, E.I.B. & Falk, J.E. (1956) *Biochem. J.* 63, 80.

- Dzelzkalns, V.; Foley, T. & Beale, S.I. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 216, 196.
- Ehteshamuddin, A.F.M. (1963) Biochem. J. 107, 446.
- Elder, G. (1982) en "Abstracts VIIIth Tetrapyrrole Meeting", Southampton.
- Elder, G.; Evans, J.; Jackson, J. & Jackson, A. (1978) Biochem. J. 169, 215.
- Falk, J.; Dressel, E.; Benson, A. & Knight, B. (1956) Biochem. J. 63, 87.
- Falk, J.E.; Dressel, E.I.B. & Rimington, C. (1953) Nature 172, 292.
- Feldman, F. & Lichtman, H.C. (1967) Biochim. Biophys. Acta 141, 653.
- Finelli, V.; Klauder, D.; Karaffa, M. & Petering, H. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 303.
- Finelli, V.; Murthy, L. Peirand, W. & Petering, H. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 1418.
- Fischer, H. & Orth, H. (1937) en "Die chemie des Pyrrols II 1. A Kadem. Verlagsgesell, Shaft, Leipzig . Photostatic Editions. Ann. Arbor Univ. Press, 1946 and Johson Reprint Corp., New York, 1968.
- Foley, T. & Beale, S.L. (1982) Plant Physiol. 70, 1495.
- Foley, T.; Dzelzkalns, V. & Beale, S.I. (1982) Plant Physiol. (Bethesda) 70, 219.
- Frydman, R. & Feinstein, G. (1974) Biochim. Biophys. Acta 350, 358.
- Frydman, R. & Frydman, B. (1975 a) FEBS Lett. 52, 317.
- Frydman, B. & Frydman, R. (1975 b) Acc. Chem. Res. 8, 201.
- Fumagalli, S.; Kotller, M.; Rossetti, M. & Batlle, A. (1985) Int. J. Biochem. 17, 485.
- García, R. (1973) Trabajo de Tesis (UBA).
- Gassman, M.; Pluscec, J. & Bogorad, L. (1968) Plant Physiol. 43, 1411.
- Gautham, P.L.Z. & Krassner, S.M. (1971) Comp. Biochem. Physiol. 39 B, 5.
- Gibson, K.D.; Laver, W.G. & Neuberger, A. (1958) Biochem. J. 70, 71.
- Gibson, K.; Matthew, M.; Neuberger, F. & Tait, G. (1961) Nature 192, 204.
- Grandchamp, B. & Nordmann, Y. (1977) Biochem. Biophys. Res. Comm. 74, 1089.

- Grandchamp, B.; Phung, N. & Nordman, Y. (1978) *Biochem. J.* 176, 97.
- Granick, S. (1955 a) en "CIBA Foundation Symposium on Porphyrins: Biosynthesis and Metabolism" (Wolstenholme Miller, G.; ed.) E.C.P., London, p. 143.
- Granick, S. (1955 b) *Absts. 128th Meeting Am. Chem. Soc.*, 69 C.
- Granick, S. & Gilder, H. (1947) *Adv. Enzymol.* 7, 305.
- Granick, S. & Mauzerall, D. (1958 a) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 75, 115.
- Granick, S. & Mauzerall, D. (1958 b) *J. Biol. Chem.* 232, 1119.
- Granick, S. & Sassa, S. (1971) en "Metabolic Regulation" (Vogel, H.; ed.). New York y London, Academic Pres, p. 77.
- Granick, J.; Sassa, S.; Granick, S.; Levere, R. & Kappas, A. (1973) *Biochem. Med.* 8, 149.
- Granick, S. & Urata, G. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 821.
- Heywood, P.; Weinman, D. & Lipman, M. (1974) *J. Protozool.* 21, 232.
- Higuchi, M. & Bogorad, L. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 244, 401.
- Hoare, D. & Heath, H. (1958) *Nature* 181, 1592.
- Jackson, A.H.; Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Evans, N.; Games, D.E.; Matlin, S.A.; Elder, G.H. & Smith, S.G. (1976) *Phil. Trans. R. Soc. London B.* 273, 191.
- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 435.
- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 449, 1.
- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1977 a) *Biochim. Biophys. Acta* 459, 141.
- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1977 b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, 429.
- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 544, 540.
- Janovy Jr., J.; Lee, K.W. & Brumbangh, J.A. (1974) *J. Protozool.* 21, 53.
- Jensen, J. & Thofern, E. (1953) *Z. Naturforsch* 86, 599.
- Jordan, P.M. & Berry, A. (1981) *Biochem. J.* 195, 177.
- Jordan, P.; Burton, G.; Nordlov, H.; Schneider, H.; Pryde, L. & Scott, J. (1979) *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 204.
- Jordan, P. & Shemin, D.J. (1973) *Biol. Chem.* 248, 1019.

- Kardish, R. & Woods, J. (1980) *J. Appl. Biochem.* 2, 159.
- Kidder, G.W. & Dutta, B.N. (1958) *J. Gen. Microbiol.* 18, 621.
- Kikuchi, G.; Kumar, A.; Talmage, P. & Shemin, D. (1958 b) *J. Biol. Chem.* 233, 1214.
- Kikuchi, G.; Shemin, D. & Bachman, B.J. (1958 a) *Biochim. Biophys. Acta* 28, 219.
- Kipe-Nolt, J. & Stevens, S. Jr. (1980) *Plant Physiol.* 65, 126.
- Klein, O. & Senger, H. (1978 a) *Photochem. and Photobiology* 27, 203.
- Klein, O. & Senger, H. (1978 b) *Plant Physiol.* 62, 10.
- Koopmann, G. & Batlle, A.M. del C. (1986) *Int. J. Biochem.*, en prensa.
- Kotler, M.; Fumagalli, S.; Juknat, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1986) *Int. J. Biochem.*, en prensa.
- Labbe, R.F.; Kurumuda, T. & Onisawa, J. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 3, 403.
- Labbe-Bois, R. & Volland, C. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 179, 565.
- Lascelles, J. (1964) en "Tetrapyrrole Biosynthesis and its regulation", Benjamin, New York.
- Lascelles, J. (1967) *Biochem. J.* 66, 65.
- Laver, W.G.; Neuberger, A. & Underfriend, S. (1958) *Biochem. J.* 70, 4.
- Lockwood, W. & Rimington, C. (1957) *Biochem. J.* 75, 372.
- Lwoff, M. (1933) *Ann. Inst. Pasteur* 51, 55.
- Lwoff, M. (1938) *C.r. Hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris* 206, 504.
- Lwoff, M. (1951) en "Biochemistry and Physiology of Protozoa" (Lwoff, A.; ed.) Academic Press, New York, vol. I, p. 129.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A. M. del C. (1970 a) *Biochim. Biophys. Acta* 220, 553.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1970 b) *FEBS Lett.* 9, 180.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1970 c) *FEBS Lett.* 6, 285.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A. (1971 a) *Biochim. Biophys. Acta* 227, 180.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A. (1971 b) *Biochem. J.* 121, 327.
- Llambías, E.B.C.; Locascio, G. & Batlle, A.M. del C. (1971) *Anal. As. Q. Arg.* 59, 271.
- Maria, T.A.; Tafuri, W. & Brener, Z. (1972) *Ann. Trop. Med. Parasit.* 66, 423.

- Marver, H.S.; Strand, G.; Swanson, W.; Manning, F. & Branchaud, R. (1972) *Anal. Biochem.* 47, 457.
- Marver, H.S.; Tschudy, D.P.; Perlroth, D.P. & Rechcigl, M. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 4323.
- Melo, M.N. (1982) Tesis de Doctorado, U.F.M.G., Brasil.
- Miyagi, K.; Kaneshima, M.; Kawakami, J.; Nakada, F.; Petryka, Z. & Watson, C. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6172.
- Miyagi, K. & Watson, C. (1972) *Blood* 39, 13.
- Molyneux, D.H. & Robertson, E. (1974) *Ann. Trop. Med. Parasit.* 8, 369.
- Moore, M. R.; Beattie, A.D.; Thompson, G.G. & Goldberg, A. (1971) *Clin. Science* 40, 81.
- Muthukrishnan, S.; Malathi, K. & Padmanaban, G. (1972) *Biochem. J.* 129, 31.
- Muthukrishnan, S.; Padmanaban, G. & Sarma, P.S. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4241.
- Nandi, D.L. (1971) *Arch. Biophys.* 142, 157.
- Nandi, D.L. & Shemin, D. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 1236.
- Nandi, D.L. & Waygood, E.R. (1965) *Can. J. Biochem.* 43, 1605.
- Nandi, D.L. & Waygood, E.R. (1967) *Can. J. Biochem.* 45, 327.
- Neuberger, A. & Scott, J.J. (1953) *Nature* 172, 1093.
- Neve, R.; Labbe, R. & Aldrich, R. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* 78, 691.
- Newton, B.A. (1957) *J. Gen. Microbiol.* 17, 708.
- Newton, B.A. & Horne, R.W. (1957) *Exp. Cell Res.* 13, 563.
- Nishimura, J.S. & Grinnel, F. (1972) en "Advances in Enzymology" (Meister, ed.), Wiley and Son. Chichester, vol 36, p. 186.
- Noguchi, T. & Mori, R. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 10335.
- Novy, F.G.; Mc Neal, W.J. & Torrey, H.N. (1907) *J. Infect. Dis.* 4, 223.
- Oashi, A. & Kikuchi, G. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 178, 607.
- O'Daly, J.A. & Bretaña, A. (1976) *Int. J. Parasitol.* 6, 271.
- Osanai, M. & Rembold, H. (1974) *Happe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 355, 327.
- Porra, R. & Falk, J. (1964) *Biochemical J.* 90, 69.
- Porra, R.J. & Irving, E.A. (1970) *Biochem. J.* 116, 42 P.
- Porra, R.J.; Irving, E.A. & Tennick, A.M. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 148, 37.
- Poulson, R. & Polglase, W. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 329, 256.

- Poulson, R. & Polglase, W.J. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 6367.
- Poulson, R. & Polglase, W. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 1269.
- Poulson, R. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 3730.
- Ramaswamy, K. & Nair, P.M. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 293, 269.
- Rasmussen, G. & Kushner, J. (1979) *J. Lab. Clin. Med.* 93, 54.
- Roitman, C.; Roitman, I. & Azevedo, H.P. (1972) *J. Protozool.* 19, 346.
- Romeo, G. & Levin, E. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 230, 330.
- Rossetti, M.V. (1978) Trabajo de Tesis (UBA).
- Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1977) *Int. J. Biochem.* 268.
- Rossetti, M.V.; Juknat, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1977) *Int. J. Biochem.* 8, 781.
- Rossetti, M.V.; Juknat de Geralnick, A.; Kotler, M.; Fumagalli, S. & Batlle, A.M. del C. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 761.
- Salvador, G.F. (1978) *Plant Sci. Lett.* 13, 351.
- Sancovich, H.; Batlle, A. & Grinstein, M. (1969) *Biochem. Biophys. Acta* 191, 130.
- Sancovich, H.; Ferramola, A.; Batlle, A.; Kivilevick, A. & Grinstein, M. (1976) *Acta Physiol. Latinoam.* 26, 376.
- Sano, S. (1958) *Acta Haematol. Japan* 21, 237.
- Sano, S. & Granick, S. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 1473.
- Sassa, S.; Granick, S. & Kappas, A. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 244, 419.
- Scott, A.; Burton, G.; Jordan, P.; Matsumoto, H.; Fagerness, P. & Pryde, L. (1980) *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 384.
- Schulman, M.P. & Richert, D.A. (1957) *J. Biol. Chem.* 226, 181.
- Seehra, J. & Jordan, P. (1980) *J. Am. Chem. Soc.* 102, 6841.
- Seehra, J.S.; Jordan, P.M. & Akhtar, M. (1983) *Biochem. J.* 209, 709.
- Senekjie, H.A. (1943) *Am. J. Trop. Med.* 23, 523.
- Senekjie, H.A. & Lewis, R.A. (1945) *Am. J. Trop. Med.* 25, 345.
- Shemin, D. (1976) *Phil. Trans. R. Soc. London, B.* 273, 109.
- Shemin, D. & Rittenberg, D. (1945) *J. Biol. Chem.* 159, 567.
- Shemin, D. & Russel, C.S. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* 75, 4873.
- Simpson, L. (1968) *J. Cell Biol.* 37, 660.
- Sjöström, M. (1976) *J. Microsc. Bio Cell.* 22, 415.
- Smith, A. & Francis, J. (1979) *Biochem. J.* 183, 455.
- Smith, A. & Francis, J. (1981) *Biochem. J.* 195,

- Stafforini, D.M.; Polo, C.; Stella, A.M.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 757.
- Steiger, F.R. & Steiger, E. (1976) *J. Parasitol.* 64, 437.
- Stella, A.; Parera, V.; Llambías, E. & Batlle, A. (1971) *Biochem. Biophys. Acta* 252, 481.
- Tait, G.H. (1972) *Biochem. J.* 128, 1159.
- Tigier, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Locascio, G. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 151, 300 .
- Tigier, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Locascio, G. (1970) *Enzymologia* 38, 43.
- Tomio, J.M. & Grinstein, M. (1968) *Eur. J. Biochem.* 6, 80.
- Trager, W. (1957) *J. Protozool.* 4, 269.
- Trager, W. (1974) en "Trypanosomiasis and Leishmaniasis with Special reference to Chagas disease" CIBA Foundation Symposium 20 (new-series). Associated Scientific Publishers. Amsterdam, p. 225.
- Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. & Sano, S. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 294.
- Tsukamoto, J.; Yoshinaga, T. & Sano, S. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 570, 167.
- Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. & Sano, S. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 751.
- Varticovsky, I.; Kushner, J.P. & Burnham, B.F. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 739.
- Vickerman, K. & Tetley, L. (1977) *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 55, 441.
- Weinstein, J.D. & Beale, S.I. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 6799.
- White, D.C. & Granick, S. (1963) *J. Bacteriol.* 85, 842.
- Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1973) *Enzyme* 16, 128.
- Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1975) en "Porphyrins in Human Diseases", Karger, Basel ,p. 36.
- Wider de Xifra, E.A.; Batlle, A.M. del C. & Tigier, H. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 235, 511.
- Wider de Xifra, E.A. & Tigier, H. (1971) *Enzymologia* 41, 217.
- Williams, D.; Morgan, E.; Mc Donald, E. & Battersby, A. (1981) *Biochem. J.* 193, 301.
- Wintrobe, M.M. (1950) *Harvey Lectures* 45, 87.
- Yamasaki, H. & Moriyama, T. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 227, 698.
- Yoshinaga, T. & Sano, S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4727.

- Yubisui, T. & Yoneyama, Y. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 150, 77.
- Zaitseva, G.N. & Salikhov, T.A. (1972) Dokl. Akad. Nauk. SSSR 205, 424.
- Zaitseva, G.N. & Salikhov, T.A. (1973) Izv. Akad. Nauk. SSSR 2, 252.

INTRODUCCION - II

- Anderson, K.E. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 543, 313.
- Barnes, R.; Connelly, J.L. & Jones, O.T.G. (1972) *Biochem. J.* 128, 1043.
- Bonkowsky, H.L.; Bloomer, J.R.; Ebert, P.S. & Mahoney, M.J. (1975) *J. Clin. Invest.* 56, 1139.
- Clark, P. & Walsh, R.J. (1959) *Nature* 184, 1730.
- Cole, S.P.C. & Marks, G.S. (1984) *Molec. Cell Biochemistry* 64, 127.
- Cole, S.P.C.; Vavasour, E.J. & Marks, G.S. (1979) *Biochem. Pharmacol.* 28, 3533.
- Cole, S.P.C.; Whitney, R.A. & Marks, G.S. (1981 a) *Mol. Pharmacol.* 20, 395.
- Cole, S.P.C.; Zelt, D.T. & Marks, G.S. (1981 b) *Mol. Pharmacol.* 19, 477.
- Dailey, H.A. (1977) *J. Bacteriol.* 132, 302.
- Dailey, H.A. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 14714.
- Dailey, H.A. & Fleming, J.E. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 11453.
- Dailey, H.A.; Lascelles, J. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 160, 523.
- De Matteis, F. & Gibbs, A.H. (1975) *Biochem. J.* 146, 285.
- De Matteis, F.; Gibbs, A.H.; Jackson, A.H. & Weerasinghe, S. (1980) *FEBS Lett.* 119, 109.
- Fleischer, E.B.; Choi, E.I.; Hambright, P. & Stono, A. (1964) *Inorg. Chem.* 3, 1284.
- Goldin, B.R. & Little, H.N. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 171, 321.
- Grinstein, M.; Bannerman, R.M. & Moore, C.V. (1959) *Blood* 14, 476.
- Hanson, I. & Dailey, H.A. (1984) *Biochem. J.* 222, 695.
- Heikel, T.; Lockwood, W.H.; Rimington, C. (1958) *Nature* 182, 313.
- Honeybourne, C.L.; Jackson, J.T. & Jones, O.T.G. (1979) *FEBS Lett* 98, 207.
- Johnson, A. & Jones, O.T.G. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 93, 171.
- Jones, M.S. & Jones, O.T.G. (1969) *Biochem. J.* 113, 507.
- Jones, M.S. & Jones, O.T.G. (1970 a) *Biochem. J.* 119, 453.
- Jones, M.S. & Jones, O.T.G. (1970 b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1072.

- Jones, O.T.G. (1967) *Phytochemistry* 6, 1355.
- Jones, O.T.G. (1968) *Biochem. J.* 107, 113.
- Jones, O.T.G. (1983) en "Metals and Micronutrients" (Robes, D. A. y Pierpont, W.S.; eds.). Academic Press, London, p. 125.
- Kassner, R.J. & Walchak, H. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 304, 294.
- Kasuga, S.; Konno, K. & Sakai, Y (1954) *J. Jap. Biochem. Soc.* 26, 282.
- Koller, M.E. (1979) *FEBS Lett.* 100, 47.
- Koller, M.E. & Romslo, I. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 461, 283.
- Koller, M.E.; Romslo, I. & Flatmark, T. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 449, 480.
- Krueger, R.C.; Melnick, I. & Klein, J.R. (1956) *Arch. Biochem. Biophys.* 64, 302.
- Labbe, R.F. & Hubbard, N. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 41, 185.
- Labbe, R.F. & Hubbard, N. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 52, 130.
- Labbe, R.F.; Hubbard, N. & Caughey, W.S. (1963) *Biochemistry* 2, 372.
- Labbe, R.F. & Nielsen, L. (1976) en "Porphyrins in Human Diseases" (Doss, M.; ed.). Karger, Basel, p. 141.
- Langelaan, D.E.; Losowsky, M.S. & Toothill, C. (1969) *Clin. Chim. Acta* 26, 245.
- Little, H.N. & Jones, O.T.G. (1970) *Biochem. J.* 156, 309.
- Lockhead, A.C. & Goldberg, A. (1961) *Biochem. J.* 78, 146.
- Mac Kay, R.; Druyan, R.; Getz, G.S. & Rabinowitz, M. (1969) *Biochem. J.* 114, 455.
- Mailer, K.; Poulson, R.; Dolphin, D. & Hamilton, A.D. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 777.
- Mauzerall, D. & Granick, S. (1958) *J. Biol. Chem.* 232, 1141.
- Mazanowska, A. & Dancewicz, A.M. (1970) *Acta Biochim. Polonica* 17, 1.
- Mazanowska, A.; Dancewicz, A.M.; Malinowzka, T. & Kowalski, E. (1969) *Eur. J. Biochem.* 7, 583.
- Mazanowska, A.M.; Neuberger, A. & Tait, G.H. (1966) *Biochem. J.* 98, 117.
- Neuberger, A. & Tait, G.H. (1964) *Biochem. J.* 90, 607.
- Onisawa, J. & Labbe, R.F. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 724.
- Ortiz de Montellano, P.R.; Beilan, H.S.; Kunze, K.L. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 78, 1490.

- Phillips, J.N. (1967) *Enzymologia* 32, 13.
- Porra, R.J. (1975) *Anal. Biochem.* 68, 289.
- Porra, R.J. & Jones, O.T.G. (1963) *Biochem. J.* 87, 186.
- Porra, R.J. & Ross, B.D. (1965) *Biochem. J.* 94, 557.
- Rifkind, A.B. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4636.
- Ruth, G.R.; Schwartz, S. & Stephenson, B. (1977) *Science* 198, 199.
- Sawada, H.; Takeshita, M.; Sugita, T. & Yoneyama, T. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 178, 145.
- Simpson, D.M. & Poulson, R. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 482, 461.
- Sinclair, P.; Gibbs, A.H.; Sinclair, J.F. & De Matteis, F. (1979) *Biochem. J.* 178, 529.
- Taketani, S. & Tokunaga, R. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 12748.
- Taketani, S. & Tokunaga, R. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127, 443.
- Tanaka, S.; Nagahama, S.; Takeshita, M. & Yoneyama, Y. (1976) *J. Biochem. (Tokyo)* 80, 1067.
- Tephly, T.R.; Gibbs, A.H. & De Matteis, F. (1979) *Biochem. J.* 180, 241.
- Tephly, T.R.; Hasegawa, E. & Baron, J. (1971) *Metabol. Clin. Exp.* 20, 200.
- Tokunaga, R. & Sano, S. (1966) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 25, 489.
- Vavra, J.D.; Mayer, V.K. & Moore, C.V. (1964) *J. Lab. Clin. Med.* 63, 736.
- Vogeler, W.R. & Mingioli, E.S. (1967) *Clinic. Res.* 15, 36.
- Walters, T.R.; Gribble, T.J. & Schwartz, H.C. (1963) *Nature* 197, 1213.
- Yoneyama, Y.; Tamai, A.; Yasuda, T. & Yoshikawa, H. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 105, 100.

INTRODUCCION - III

- Alfieri, S.C. & Camargo Plessman, E. (1982) Exp. Parasitol. 53, 371.
- Camargo, E.P. (1979) en "Tesis de Libre Docencia" Instituto de Química de la USP, Brasil.
- Chang, K.P. (1974) J. Protozool. 21, 699.
- Chang, K.P. & Dave, C. (1980) en "Endocytobiology, Endosymbiosis and Cell Biology" (Schwemmler, W. y Schenk, H.E.A.; eds.) de Gruyter, Berlín, New York, vol 1, p. 349.
- De Souza, W. (1983) Int. Rev. Cytol. 86, 197.
- Gill, J.W. & Vogel, H.J. (1963) J. Protozool. 10, 148.
- Gutteridge, W.E. & Mac Adam, R.F. (1971) J. Protozool. 18, 637.
- Hoare, C.A. & Wallace, F.G. (1966) Nature, London 212, 1385.
- Levine, N.D.; Lorliss, J.O.; Cox, F.E.G.; Deroux, G.; Grain, J.; Honigberg, B.M.; Leedale, G.H.; Loebich, A.R.; Lom, J.; Merinfeld, E.G.; Page, F.C.; Poljansky, G.; Sprague, V.; Vavra, J. & Wallace, F.G. (1980) J. Protozool. 27, 37.
- Mc Ghee, R.B. & Cosgrove, W.B. (1980) Microbiol. Rev. 44, 140
- Molyneux, D.H. & Ashford, R.W. (1983) en "The Biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, Parasites of Man and Domestic Animals". Taylor y Francis Ltd., London.
- Mundim, M.H.; Roitman, I.; Hermans, M.A. & Kitajima, W. (1974) J. Protozool. 21, 518.
- Simpson, L. (1972) Int. Rev. Cytol. 32, 139.
- Vickerman, K. & Preston, T.M. (1976) en "Biology of Kinetoplastida" (Lumsden, W.H.R. y Evans, D.E.; eds.) Academic Pres, New York. p. 35.

INTRODUCCION - IV

- Agosin, M.; Náquira, C.; Capdevila, J. & Paulin, J. (1976) Int. J. Biochem. 7, 585.
- Alves, M.J.M. & Colli, W. (1974) J. Protozool. 21, 575.
- Araujo, F.G.; Handman, E. & Remington, J.S. (1980) J. Protozool. 27, 397.
- Baernstein, H.D. & Tobie, E.J. (1955) Exp. Parasitol. 4, 548.
- Boiso, J.F. de & Stoppani, A.O.M. (1972) Experientia 28, 1162.
- Boiso, J.F. de & Stoppani, A.O.M. (1973) J. Protozool. 20, 673.
- Borst, P. & Hoeijmakers, J.H. (1979) Plasmid 2, 20.
- Boveris, A.; Sies, H.; Martino, E.E.; Docampo, R.; Turrens, J. F. & Stoppani, A.O.M. (1980) Biochem. J. 188, 643.
- Boveris, A. & Stoppani, A.O.M. (1977) Experientia 33, 1306.
- Bowman, I.B.R. & Flynn, I.W. (1976) en "Biology of the Kinetoplastida" (Lumsden, W.H.R. y Evans, D.A.; eds.). Academic Press, New York. vol 1, p. 435.
- Bowman, I.B.R.; Tobie, E.J. & von Brand, Th. (1963) Comp. Biochem. Physiol. 9, 105.
- Brack, C. (1968) Acta Trop. 25, 289.
- Brack, C.; Delain, E.; Riou, G. & Festy, B. (1972) J. Ultrastruct. Res. 39, 568.
- Brener, Z. (1973) Annu. Rev. Microbiol. 27, 347.
- Brener, Z. & Alvarenga, N. (1976) en "New Approaches in American Trypanosomiasis". Pan American Health Organization, Washington, D.C. p. 83.
- Cannata, J.J.B. & Cazzulo, J.J. (1984) Mol. Biochem. Parasit. 11, 37.
- Cannata, J.J.B.; Docampo, R.; Valle, E.; Franke de Cazzulo, B. M. & Cazzulo, J.J. (1980) Medicina (Buenos Aires) 40 (Suppl. 1), 145.
- Carvalho, R.M.G.; Meirelles, M.N.L.; De Souza, W. & Leon, W. (1981) Infect Immun. 33, 546.
- Castro, C.; Hernández, R. & Castaneda, M. (1981) Mol. Biochem. Parasitol. 2, 219.
- Cazzulo, J.J.; Franke de Cazzulo, B.M. & Segura, E.L. (1980) Comp. Biochem. Physiol. 67B, 163.
- Chagas, C. (1909) Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1, 159.
- Chagas, C. (1911) Mem. Inst. Oswaldo Cruz 3, 219.

- Chiari, E.; De Souza, W.; Romanha, A.J.; Chiari, C.A. & Brener, Z. (1978) *Acta Trop.* 35, 113.
- De Souza, W. (1976) *J. Microsc. Biol. Cell* 25, 189.
- De Souza, W. (1984) *Int. Rev. Cyt.* 86, 197.
- De Souza, W.; Martinez-Palomo, A. & Gonzales-Robbles, A. (1978) *J. Cell Sci.* 33, 285.
- De Souza, W. & Meyer, H. (1976) *Z. Parasitenkd.* 46, 179.
- De Souza, W.; Meza, I.; Martinez-Palomo, A.; Sabanero, M.; Souto-Padrón, T. & Meirelles, M.N.I. (1983) *J. Parasitol.* 69, 138.
- Días, E. (1934) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 28, 1.
- Docampo, R.; Boiso, J.F. de & Stoppani, A.O.M. (1974) *Rev. Soc. Arg. Microbiol.* 6, 7.
- Docampo, R.; Bosio, J.F. de; Stoppani, A.O.M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 502, 466.
- Dwyer, D.M. (1980) *J. Protozool.* 27, 176.
- Franke de Cazzulo, B.M. & Cazzulo, J.J. (1982) *Comp. Biochem. Physiol.* 71B, 321.
- Fulton, J.D. & Spooner, D.F. (1956) *Biochem. J.* 63, 475.
- Gutteridge, W.E. (1976) en "American Trypanosomiasis Research" Scientific Publication number 318. Pan American Health Organization Washington, p. 135.
- Gutteridge, W.E. (1978) en "Chagas Disease", Scientific Publication. Pan American Health Organization, Washington. 347, p. 48.
- Gutteridge, W.E. & Coombs, G.H. (1977) en "Biochemistry of Parasitic Protozoa" The Macmillan Press Ltd, London.
- Gutteridge, W.E.; Cover, B. & Gaborak, M. (1978) *Parasitology* 76, 159.
- Gutteridge, W.E. & Rogerson, G.W. (1979) en "Biology of the Kinetoplastid" (Lumsden, W.H.R. y Evans, E.A.; eds.). Academic Press, New York, p. 619.
- Hammond, D.J. & Gutteridge, W.E. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 718, 1.
- Hammond, D.J. & Gutteridge, W.E. (1983) *Molec. Biochem. Parasitol.* 7, 319.
- Hill, G. (1972) en "Comparative Biochemistry of Parasites" Academic Press, New York, London.
- Hill, G.C. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 456, 149.
- Hill, G.C. & Anderson, W.A. (1970) *Exp. Parasitol.* 28, 356.
- Hill, G.C. & Cross, G.A.M. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 305, 590.

- Hoare, C.A. & Wallace, F.G. (1966) *Nature (London)* 212, 1385.
- Hunt, R.C. & Ellar, D.J. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 339, 173.
- Juan, S.M.; Cazzulo, J.J. & Segura, E.L. (1979) *Comp. Biochem. Physiol.* 63 B, 531.
- Kallinikova, V.D. (1981) *Int. Rev. Cytol.* 69, 105.
- Martinez-Palomo, A.; De Souza, W. & Gonzalez-Robles, A. (1976) *J. Cell Biol.* 69, 507.
- Mc Ghee, R.B. & Cosgrove, W.B. (1980) *Microbiol. Rev.* 44, 140.
- Meirelles, M.N.L.; Chiari, E. & De Souza, W. (1982) *Acta Trop.* 39, 195.
- Meyer, H. & De Oliveira, M. (1948) *Parasitology* 39, 91.
- Meyer, H. & De Souza, W. (1976) *J. Protozool.* 23, 385.
- Morel, C.; Chiari, E.; Camargo, E.P.; Mattei, D.M.; Romanha, A. J. & Simpson, L. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 6810.
- Morel, C. & Simpson, L. (1980) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 1070.
- Muniz, J. & Borrielo- A. (1945) *Rev. Bras. Biol.* 5, 563-576.
- Nogueira, N.; Bianco, C. & Cohn, Z. (1975) *J. Exp. Med.* 146, 157.
- Nogueira, N. & Cohn, Z. (1976) *J. Exp. Med.* 33, 546.
- Opperdoes, F.R. & Borst, P. (1977) *FEBS Lett.* 80, 360.
- Opperdoes, F.R. & Cottem, D. (1982) *FEBS Lett.* 143, 60.
- Paulin, J.P. (1975) *J. Cell Biol.* 66, 404.
- Pereira, M.E.A.; Loures, M.A.; Villalta, F. & Andrade, A.F.P. (1980) *J. Exp. Med.* 152, 1375.
- Piessmann Camargo, E.; Coelho, A.; Moraes, G. & Figueredo, E. N. (1978) *Exp. Parasitol.* 46, 141.
- Ray, S.K. & Cross, G.A.M. (1972) *Nature New Biol.* 237, 174.
- Riou, G. & Delain, E. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 62, 210.
- Riou, G. & Pantrizel, R. (1969) *J. Protozool.* 16, 509.
- Riou, G. & Paoletti, C. (1967) *J. Mol. Biol.* 28, 377.
- Riou, G. & Yot, P. (1977) *Biochemistry* 16, 2390.
- Rogerson, G.W. & Gutteridge, W.E. (1977) *J. Protozool.* 24, 42A.
- Rogerson, G.W. & Gutteridge, W.E. (1979) *Int. J. Biochem.* 10, 1019.
- Rogerson, G.W. & Gutteridge, W.E. (1980) *Int. J. Parasitol.* 10, 131.
- Schotelius, J. (1982) *Z. Parasitenk.* 68, 147.
- Sies, H.; Koch, O.R.; Martino, E. & Boveris, A. (1979) *FEBS Lett.* 103, 287.

- Simpson, L. (1972) *Int. Rev. Cytol.* 32, 139.
- Stoppani, A.O.M. & Boiso, J.F. de (1973) *Experientia* 29, 1494.
- Stoppani, A.O.M.; Docampo, R.; Boiso, J.F. de & Frasc, A.C.C. (1980) *Mol. Biochem. Parasitol.* 2, 3.
- Szarfman, A.; Queiroz, T. & De Souza, W. (1980) *J. Parasitol.* 66, 1055.
- Tanowitz, H.; Wittner, M.; Sveda, M. & Soeiro, R. (1975) *J. Parasitol.* 61, 1065.
- Taylor, M.B.; Berhausen, H.; Heyworth, P.; Messenger, N.; Rees, L.J. & Gutteridge, W.E. (1980) *Int. J. Biochem.* 11, 117.
- Vickerman, K. (1969) *J. Cell Sci.* 5, 163.
- Vickerman, K. & Preston, T.M. (1976) en "Biology of Kinetoplastida" (Lumsden, W.H.R. y Evans, D.E.; eds.) Academic Press, New York, p. 35.
- Villalta, F.V. & Leon, W. (1979) *J. Parasitol.* 65, 188.
- Von Brand, T. (1973) en "Biochemistry of Parasites". Second Edition. Academic Press, New York, London.
- Weatherbee, J. A. (1981) *Int. Rev. Cytol.* 12, 113.
- Zeledon, R.; Alvarenga, N.J. & Schosinsky, K. (1977) en "Chagas Disease". Pan American Health Organization. Publ. N°347.

INTRODUCCION - V

- Alfieri, S.C. & Plessman Camargo (1982) *Exp. Parasitol.* 53, 371.
- Anderson, D.R.; Hopps, H.E.; Barile, M.F. & Bernheim, B.C. (1965) *J. Bacteriol.* 90, 1387.
- Bannister, L.H. (1979) *Proc. Roy. Soc. London B* 204, 141.
- Brooker, B.E. (1971) *Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.) Zool.* 22, 89.
- Burgdorfer, W.; Brinton, L.P. & Hughes, L.E. (1970) *J. Parasitol.* 56 (11), 42.
- Camargo, E.P. & Freymuller, E. (1977) *Nature London* 270, 52.
- Chang, K.P.; Chang, C.S. & Sassa, S. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2979.
- Chang, K.P. & Dave, C. (1980) en "Endocitobiology, Endosimbiosis and Cell Biology" (Schwemmler, W. y Schenk, H.E.A.; eds.) vol 1, p. 349.
- Chang, K.P. & Trager, W. (1974) *Science* 183, 531.
- Figueredo, E.N.; Yoshida, N.; Roitman, C. & Camargo, E.P. (1978) *J. Protozool.* 25, 546.
- Galinari, S. & Camargo, E.P. (1978) *Exp. Parasitol.* 46, 277.
- Gutteridge, W.E. & Macadam, R.F. (1971) *J. Protozool.* 18, 637.
- Hoare, C.A. (1972) en "The Trypanosomes of Mammals: A zoological Monograph", Blackwell, Oxford.
- Lwoff, M. (1951) en "Biochemistry and Physiology of Protozoa" (Lwoff, A.; ed.) Academic Press, New York, vol I, p. 129.
- Margulis, L. (1970) en "Origin of Eukariotic Cells". Yale Univ. Press, New Haven.
- Mc Ghee, R.B. & Cosgrove, W.B. (1980) *Mic. Rev.* 44, 140.
- Mundim, M.H. (1975) Tesis, Instituto Microbiología, UFRJ, Brasil.
- Mundim, M.H.; Roitman, I.; Hermans, M.A. & Kitajima, E.W. (1974) *J. Protozool.* 21, 518.
- Myers, W.F.; Osterman, J.V. & Wisseman, C.L., Jr. (1972) *J. Bacteriol.* 109, 89.
- Newton, B.A. (1956) *Nature (London)*, 177, 279.
- Newton, B.A. (1957) *J. Gen. Microbiol.* 17, 708.
- Newton, B.A. & Horne, R.W. (1957) *Exp. Cell Research* 13, 563.
- Novy, F.G.; Mc Neal, W.J. & Torrey, H.N. (1907) *J. Inf. Dis.* 4, 233.

- Vickerman, K. (1976) en "Biology of the Kinetoplastida" (Lumsden, N.H.R. y Evans, D.A.; eds.). Academic Press, New York, vol 1, p. 1.
- Wallace, F.G. (1966) Exp. Parasitol. 18, 124.
- Weiss, E. (1973) Bacteriol. Rev. 37, 259.
- Weiss, E. & Wilson, N.M. (1969) J. Bacteriol. 97, 719.
- Yoshida, N. & Camargo, E.P. (1978) J. Bacteriol. 136, 1184.
- Zuckerman, A. & Lainson, R. (1977) en "*Leishmania*. Parasitic Protozoa" (Kreier, J.P.; ed.). Academic Press, New York, vol.1. p. 57.

MATERIALES Y METODOS

- Batlle, A.M. del C.; Wider de Xifra, E.A.; Stella, A.M. (1978) Int. J. Biochem. 9, 871.
- Blocklehurst, D.; Xifra, E.A.; Batlle, A.M. del C. (1980) Int. J. Biochem. 12, 791.
- Camargo, E.P. (1964) Rev. Inst. Med. Trop., S. Paulo 6, 93.
- Docampo, R.; Boiso, J.F. & Stoppani, A.O.M. (1978) Biochem. Biophys. Acta 502, 466.
- Docampo, R. & Stoppani, A.O.M. (1979) Archs. Biochem. Biophys. 197, 317.
- Dörnermann, D. & Senger, H. (1980) Biochim. Biophys. Acta 628, 35.
- Galvão, A.B.; Oliveira, R.L.; Carvalho, A.L.M. & Veiga, G.P. (1970) Rev. Goiana Med. 16, 229.
- Kaufman, S. & Alivisatos, S.G.A. (1955) J. Biol. Chem. 216, 141.
- Mauzerall, M. & Granick, S. (1956) J. Biol. Chem. 219, 435.
- Milligan, L.P. & Baldwin, R.L. (1967) J. Biol. Chem. 242, 1095.
- Moore, D.J. & Labbe, R.F. (1964) Clin. Chem. 10, 1105.
- Mundim, M.H. & Roitman, I. (1977) J. Protozool. 24 (2), 329.
- Porra, R.J. & Jones, O.T.G. (1963) Biochem. J. 87, 181.
- Rimington, C. (1960) Biochem. J. 75, 620.
- Rimington, C. & Sveinsson, S.L. (1950) J. Clin. Lab. Invest. 2, 209.
- Roitman, C.; Roitman, I. & Azevedo, H.P. (1972) J. Protozool. 19, 346.
- Warren, L. (1960) J. Parasitol. 46, 529.
- Wider de Xifra, E.; Batlle, A.M. del C. & Tigier, H.A. (1971) Biochim. Biophys. Acta 235, 511.
- Wider, E.A. & Tigier, H.A. (1970) FEBS Lett. 9, 30.

RESULTADOS

- Chang, C.S. & Chang, K.P. (1985) *Molec. Biochem. Parasitol.* 16, 267.
- Chang, K.P.; Chang, C.S. & Sassa, S. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2979.
- Bowman, I.B.R.; Tobie, E.J. & Von Brand, Th. (1963) *Comp. Biochem. Physiol.* 9, 105.
- Brocklehurst, D.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 791.
- Esteves, M.J.G.; Andrade, A.F.B. & Angluster, J. (1982) *Eur. J. Cell. Biol.* 26, 244.
- Hanson, J.W. & Dailey, H.A. (1984) *Biochem. J.* 222, 695.
- Johnson, A. & Jones, O.T.G. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 93, 171.
- Jones, O.T.G. (1984) *Ann. Rev. Biochem.*, 125.
- Mc Ghee, R.B. & W.B. Cosgrove (1980) *Microbiol. Rev.* 44, 140.
- Romslo, I. (1980) en "Iron in Biochemistry and Medicina" (Jacobs, A. y Warwood, M.; eds.) Academic Press, London. vol 2, p. 325.
- Simpson, D.M. & Poulson, R. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 482, 461.
- Taketani, S. & Tokunaga, R. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 12748.
- Taketani, S. & Tokunaga, R. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127, 443.

DISCUSSION

- Alcántara, A. & Brener, Z. (1978) *Acta Trop.* 35, 209.
- Araujo-Jorge, T.C. & De Souza, W. (1984) *Acta Trop.* 41, 17.
- Bajkowski, A.S. & Friedmann, H.C. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2207.
- Batlle, A.M. del C.; Llambías, E.B.C.; Wider de Xifra, E. & Tigier, H.A. (1975) *Int. J. Biochem.* 6, 591.
- Beale, S.I.; Foley, T. & Dzelzkalns, U. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1666.
- Boiso, J.F. de & Stoppani, A.O.M. (1973) *Experientia* 29, 1494.
- Brener, Z. (1973) *Annu. Rev. Microbiol.* 27, 347.
- Brener, Z. & Chiari, E. (1963) *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 5, 220.
- Brocklehurst, D.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 791.
- Chang, K.P.; Chang, C.S. & Sassa, S. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2979.
- Dailey, H.A. & Fleming, J.E. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 11453.
- Dailey, H.A.; Fleming, J.E. & Harsen, B.M. (1986) *J. Bacteriol.* 165, 1.
- Docampo, R.; Boiso, J.F. de & Stoppani, A.O.M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 502, 466.
- Frydman, R.B.; Tomaro, M.L.; Wanschelbaum, A. & Frydman, B. (1972) *FEBS Lett.* 26, 203.
- Gaughan, P.L.Z. & Krassner, S.M. (1971) *Comp. Biochem. Physiol.* 39 B, 5.
- Granick, S. & Gilder, H. (1947) *Adv. Enzymol.* 7, 305.
- Hanson, J.W. & Dailey, H.A. (1984) *Biochem. J.* 222, 695.
- Jensen, J. & Thofern, E. (1953) *Naturforsch* 86, 599.
- Jones, O.T.G. (1984) *Ann. Rev. Biochem.*, 125.
- Kessel, D.; Chang, C.K. & Musselmann, B. (1986) en "Methods in Porphyrin photosensibilization. Plenum Press Co., N.Y., p. 213.
- Kipnis, T.L.; Calich, V.L.G. & Dias Da Silva, W. (1979) *Parasitology* 78, 89.
- Krettli, A.U. (1978) Tesis de Doctorado, Universidad de Minas Gerais, Brasil.
- Krettli, A.U. & Brener, Z. (1976) *J. Immunol.* 116, 755.

- Lascelles, J. (1962) en "The Bacteria" (Gunsalus, I.C. y Stainer, R.Y.; eds). Academic Press, New York, vol III, p. 335.
- Lascelles, J. (1964) en "Tetrapyrrole Biosynthesis and its Regulation" Benjamin, W.A., Inic. New York, Amsterdam.
- Lóckhead, A.C. & Goldberg, A. (1961) Biochem. J. 78, 146.
- Lwoff, A. (1934) Zentbl. Bakt. Parasitenkd. Abd I. Orig. 130, 497.
- Lwoff, M. (1951) en "Biochemistry and Physiology of Protozoa" (Lwoff, A.; ed.). Academic Press, New York, p. 131.
- Meirelles, M.N.L.; De Araujo-Jorge, T.C. & De Souza, W. (1980) Parasitology 81, 373.
- Melo, R.C. & Brener, Z. (1978) J. Parasitol. 64 (3), 475.
- Moody, M.D. & Dailey, H.A. (1985) J. Bacteriol., 1120.
- Mundim, M.H.; Roitman, J.; Hermans, M.A. & Kitajima, E.W. (1974) J. Protozool. 21 (4), 518.
- Myers, W.F.; Osterman, J.V. & Wisseman, C.L. Jr. (1972) J. Bacteriol. 109, 89.
- Noguchi, T. & Mori, R. (1981) J. Biol. Chem. 256, 10335.
- Ochoa, S. & De Haro, C. (1979) Ann. Rev. Biochem. 48, 549.
- Opperdoes, F.R.; Borst, P.; Bakker, S. & Leene, W. (1977) Eur. J. Biochem. 76, 29.
- Rimington, C.; Sommer, S. & Moan, N. (1986) Int. J. Biochem., en prensa.
- Stoppani, A.O.M.; Docampo, R.; Boiso, J.F. & Frasch, A.C.C. (1980) Molec. Biochem. Parasitol. 2, 3.
- Taketani, S. & Tokunaga, R. (1981) J. Biol. Chem. 256, 12748.
- Tokunaga, R. & Sano, S. (1972) Biochim. Biophys. Acta 264, 263.
- Ulvik, R. & Romslo, I. (1978) Biochim. Biophys. Acta 541, 251.
- Varticowski, I; Kushner, J.P. & Burnham, B.F. (1980) Int. J. Biochem. 12, 739.

RESUMEN

RESUMEN

Una característica nutricional de todos los tripanosomá tidos excepto aquellos infectados con bacterias simbiotes, es el requerimiento por compuestos del hemo para su desarrollo, que se acepta está directamente relacionado con una incapacidad para su biosíntesis. Sin embargo, son fragmentarios los datos experimentales que lo demuestran.

Se llevó a cabo entonces un estudio acerca de la real capacidad biosintética del hemo por parte de dos organismos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae: el patógeno *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, y el no patógeno *Crithidia deanei*, que se caracteriza por poseer simbiotes intracelulares.

El trabajo se inició empleando la forma epimastigote de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*. Se midió por primera vez directamente la actividad de varias de las enzimas del camino de las porfirinas, además del contenido de precursores, porfirinas y hemo libres. Los niveles detectados de estos últimos compuestos fueron tan bajos o nulos, que resulta evidente la capacidad fuertemente limitada del parásito para formar sus propios metabolitos. Esta hipótesis se vió plenamente confirmada con los datos de actividades enzimáticas. Se ha demostrado que las enzimas particuladas Suc.CoA-S, ALA-S, DOVA-T y Hemo-S son fácilmente detectables y funcionales, en tanto que el ALA-D, la PBG-asa (y la Deaminasa) y probablemente las demás enzimas del camino del hemo ubicadas en el citosol están ausentes o son completamente inactivas.

Una vez establecido que en la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, el requerimiento nutricional por compuestos del hemo, se debía a una inadecuada biosíntesis del mismo, por parte de los hemoflagelados, se consideró importante analizar otras dos cepas del parásito (Y y CL), que presentan ciertas diferencias biológicas, patológicas e inmunológicas. Los datos obtenidos en el presente trabajo han demostrado por primera vez, que la cepa de *T. cruzi* así como el medio (LIT o warren) en el cual se cultivan los parásitos tienen una marcada influencia sobre la actividad de varias de las enzimas involucradas en la biosíntesis del hemo: Suc.CoA-S,

ALA-S, DOVA-T y Hemo-S. Las medidas de actividad de ALA-D, PBG-asa y Deaminasa sugieren nuevamente, ahora en las cepas Y y CL, la ausencia o total inactivación de las mismas.

Nuestros resultados demuestran también que el contenido de ALA varía marcadamente de acuerdo a la cepa de *T. cruzi* y al medio empleado para su crecimiento; sin embargo, no se observó tal variación en el caso del PBG. No se detectaron porfirinas libres ni hemo en ninguna de estas dos cepas de *T. cruzi*.

Estos hallazgos nos han llevado a proponer, que los tripanosomátidos deben haber perdido parte de su capacidad de biosíntesis del hemo, probablemente a causa de mutaciones de aquellos genes estructurales involucrados en la síntesis de las llamadas enzimas solubles. Un enfoque similar se hace extensivo a *Crithidia deanei*, en cuyo caso la presencia del endosimbionte aumentaría la actividad de algunas enzimas y el contenido de precursores, con respecto al flagelado libre de endosimbionte. Estos datos demuestran que los flagelados conteniendo endosimbionte exhiben mayor funcionalidad enzimática que los flagelados sin endosimbiontes. Este evento, agregado a que *C. deanei* poseedora del endosimbionte, puede ser cultivada en un medio carente de hemo, sugiere que la presencia del endosimbionte aumenta una limitada capacidad biosintética de la cadena del hemo de los tripanosomátidos, suplementando ciertas enzimas de esa vía.

Teniendo en cuenta que la Hemo-S de *T. cruzi* resultó ser totalmente funcional y con el objeto de establecer si existían algunas diferencias definidas entre el comportamiento de la enzima del flagelado y el huésped, se estudiaron algunas propiedades de la Hemo-S de *T. cruzi*, empleándose las cepas Tulahuén o Y.

De los resultados obtenidos hasta el momento, podemos señalar que la Hemo-S de *T. cruzi*, exhibe una serie de características similares a la enzima de otras fuentes, como por ejemplo: su localización celular, interacción lípido-proteína y pH óptimo. Se encontró que prácticamente toda la actividad enzimática estaba concentrada en la fracción celular particulada que sedimenta a 30.000 x g, identificada como la mitocondrial. Se midió la enzima empleando proto, meso y deuteroporfirina como sustratos. El Tritón X-100 inhibió 40 y 70% la formación de proto y mesohemo.

El pH óptimo estuvo entre 7,2 y 7,5 para las distintas porfirinas usadas como sustratos. La cantidad de proteína y el tiempo de almacenamiento influyeron sobre la actividad enzimática.

Asimismo hemos demostrado que la Hemo-S de *T. cruzi* es varias veces más activa con mesoporfirina como sustrato. Estos datos pueden resultar útiles para el desarrollo de alguna alternativa terapéutica dirigida lógicamente a la destrucción selectiva del *T. cruzi*. Si se puede demostrar *in vivo* que el parásito no se desarrolla cuando reemplazamos el protohemo por mesohemo, la administración de mesoporfirina podría afectar específicamente la replicación del flagelado.

Sin embargo, otro comportamiento aparentemente característico de la Hemo-S de *T. cruzi* que debemos destacar ha sido su reactividad frente a diferentes metales.

Nuestros resultados han demostrado que el Fe^{2+} es el mejor sustrato de la Hemo-S de *T. cruzi*, aunque el Zn^{2+} se incorporó con buena actividad. Cu^{2+} y Co^{2+} no alteraron la actividad enzimática, en tanto que Mn^{2+} y Mg^{2+} eran inhibitorios. El agregado simultáneo de Zn^{2+} y Fe^{2+} produjo una estimulación de la actividad, pero lo más interesante fue que la presencia de Cu^{2+} , además del sustrato natural Fe^{2+} en la mezcla de incubación, convirtió al primero en un inhibidor de la Hemo-S de *T. cruzi*. Este comportamiento diferencial frente al Cu^{2+} es un punto que se investigará en detalle por cuanto abre otra posibilidad de destruir selectivamente al parásito, inactivando en forma específica su Hemo-S.



Prof. Dr. ALCIRA M. del C. BATLLE
DIRECTORA
CENTRO DE INVESTIGACIONES SOBRE
PORFIRINAS Y PORFIRIAS-CIPYP
CONICET-FCEN, UBA



SUMMARY

A nutritional characteristic of all trypanosomatids except those infected with symbiotic bacteria is its growth requirement for heme compounds. It is commonly accepted that this porphyrin requirement must be due to their inability to synthesize heme. However, supporting experimental evidence for this assumption is fragmentary.

The present work was carried out with the aim of determining the actual biosynthetic capacity of haem in the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease and in the non-pathogenic *Crithidia deanei*, known to harbor intracellular symbiotes.

This study was started using the epimastigote form of *T. cruzi* (Tulahuén strain). The activity of several enzymes of the porphyrin pathway as well as precursors, porphyrins and free heme content were measured for the first time. The level of the latter was so low or even nil, that the strongly limited capacity of the parasite to form his own metabolites resulted obvious. This assumption was confirmed with the enzyme activity data. It was demonstrated that the particulate enzymes Suc.CoA-S, ALA-S, DOVA-T and Heme-S are functional and easily detectable, while ALA-D, PBG-ase (and Deaminase) and probably the other enzymes of the heme pathway confined to the cytosol are absent or completely inactive.

In view of the fact that some strains of this parasite show differences in their biological, pathological and immunological behaviour and once established that the nutritional requirement for heme compounds in the Tulahuén strain, results from the inadequate heme biosynthesis of the hemoflagellate, we decided to also analyse the enzymic activities in the Y and CL strains of *T. cruzi*. In addition, we also examined the influence on the enzymic activities of two growth media (Warren and LIT) usually employed to cultivate *T. cruzi*. The results obtained in the present study show, for the first time, that the strain of *T. cruzi*, as well as the medium in which the parasites are cultivated, have a marked influence on the activity of various enzymes involved in heme biosynthesis: Suc.CoA-S, ALA-S, DOVA-T and Heme-S. Our measurements on ALA-D, PBG-ase and Deaminase in both strains of *T. cruzi* indicate that their activity are too

low to be detected, a result which suggests their absence or total inactivation. Our observations show that the content of ALA varies markedly depending on both the strain of *T. cruzi* and the medium used for its growth; however, PBG concentration does not significantly vary according to the strain. Neither porphyrins nor free heme were detected in any of these *T. cruzi* strains studied. These findings lead us to propose that the trypanosomatids must have lost part of their heme biosynthetic capacity possibly due to mutation of those structural genes involved in the synthesis of the so called soluble enzymes.

A similar reasoning can be extended to *C. deanei*. The results obtained in *C. deanei* have revealed that symbiote-bearing flagellates show a higher enzyme functionality than symbiote free strains.

Taking into account the above considerations and the fact that *C. deanei* harboring endosymbiote does not require hemin in its culture medium, our results suggest that the presence of the bacterial endosymbiote increases a certain limited heme biosynthetic capacity in the flagellate supplying them with some enzymes and early porphyrin precursors of this pathway.

On the basis that we have provided evidence for the existence of a totally functional heme-synthetase in *T. cruzi* and with the aim of determining well-defined differences between the flagellate's and host's enzyme behaviour, we decided to study further some properties of *T. cruzi* Heme-S in the Tulahuén and Y strains.

It is interesting to point out that *T. cruzi* Heme-S shows a series of similar characteristics to the enzyme of other sources: cellular localization, lipid-protein interaction and optimum pH. It was found that almost all of the enzyme activity was confined to the particulate subcellular fraction (sedimented at 30,000xg) identified as the mitochondrial fraction. The enzyme was measured using proto-, meso- and deuteroporphyrin as substrates. Activity was dependent on protein and time of cell storage. Enzyme proto and mesoheme formation was inhibited up to 40 and 70% by Triton X-100. The optimum pH was between 7.2 and 7.5 for the different porphyrins employed as substrates. The activity of *T. cruzi* Heme-S is several times higher when mesoporphyrin is used as substrate. These data might be useful for the development of a therapeutical alternative directed towards the selective

destruction of *T. cruzi*. If it can be demonstrated *in vivo*, that *T. cruzi* cannot multiply when protoheme is replaced by mesoheme, administration of mesoporphyrin would then greatly affect replication of the flagellate.

Another apparently singular behaviour of *T. cruzi* Heme-S has been its reactivity towards different metals. We have demonstrated that Fe^{2+} will be the best substrate, although Zn^{2+} has also been incorporated with good activity. Mn^{2+} and Mg^{2+} were highly inhibitory while Co^{2+} and Cu^{2+} did not modify enzyme activity. Combination of Zn^{2+} and Fe^{2+} still showed greater activation, but the most interesting finding was that the simultaneous presence of Cu^{2+} and Fe^{2+} in the incubation mixture, made the former a strong inhibitor of the parasite Heme-S.

This differential behaviour of *T. cruzi* Heme-S is a point to be investigated further, for it opens another possibility of selectively destroying the parasite by means of the specific inactivation of its Heme-S.

RESUMO

Uma característica nutricional de todos os tripanosomátídeos exceto aqueles infectados com bactérias simbiotes é o requerimento por compostos do hemo para seu desenvolvimento, que se aceita estar diretamente relacionado com uma incapacidade para sua biosíntese.

Entretanto, são escassos os dados experimentais que o demonstram.

Se realizou, então, um estudo sobre a real capacidade biosintética do hemo por parte de dois organismos pertencentes à família Trypanosomatidae: o patogênico *Trypanosoma cruzi*, agente causal da Doença de Chagas, e o não patogênico *Crithidia deanei*, que se caracteriza por possuir simbiotes intracelulares. O trabalho se iniciou empregando a forma epimastigota da cepa Tulahuén de *T. cruzi*. Foram medidas pela primeira vez diretamente as atividades de várias das enzimas do caminho das porfirinas, além do conteúdo de precursores, porfirinas e hemo livres. Os níveis detetados destes últimos compostos foram tão baixos ou nulos, que é evidente a capacidade fortemente limitada do parasito para formar seus próprios metabolitos. Esta hipótese foi totalmente confirmada com os dados de atividades enzimáticas. Se demonstrou que as enzimas particuladas Suc.CoA-S, ALA-S, DOVA-T e Hemo-S são facilmente detetáveis e funcionais, enquanto que o ALA-D, a PBG-asa (e a Deaminasa) e provavelmente as demais enzimas do caminho do hemo localizadas no citoplasma estão ausentes ou são completamente inativas.

Uma vez estabelecido que na cepa Tulahuén de *T. cruzi* o requerimento nutricional por compostos do hemo se devia a uma inadequada biosíntese do mesmo por parte dos hemoflagelados, se considerou importante analisar outras duas cepas do parasito (Y e CL), que apresentam certas diferenças biológicas, patológicas e imunológicas.

Os dados obtidos no presente trabalho demonstraram, pela primeira vez, que a cepa de *T. cruzi* assim como o meio (LIT ou Warren) no qual se cultivam os parasitos têm uma marcada influência sobre a atividade de várias das enzimas envolvidas na biosíntese do hemo: Suc.CoA-S, ALA-S, DOVA-T e Hemo-S. As medidas de atividade de ALA-D, PBG-asa e Deaminasa sugerem novamente, agora nas cepas Y e CL, a ausência ou total inativação das mesmas.

Nossos resultados demonstram também que o conteúdo de ALA varia marcadamente de acordo com a cepa de *T. cruzi* e o meio empregado para seu crescimento; entretanto, não se observou tal variação no caso do PBG. Não se detetaram porfirinas livres nem hemo em nenhuma destas duas cepas de *T. cruzi*.

Estas descobertas nos levaram a propor que os tripanosomatídeos devem ter perdido parte de sua capacidade de biosíntese do hemo provavelmente por causa de mutações dos gens estruturais envolvidos na síntese das chamadas enzimas solúveis.

Um enfoque similar se estende a *Crithidia deanei*, em cujo caso a presença do endosimbionte aumentaria a atividade de algumas enzimas e o conteúdo de precursores com respeito ao flagelado livre do endosimbionte. Esses dados demonstram que os flagelados contendo endosimbionte exibem maior funcionalidade enzimática que os flagelados sem endosimbionte. Este evento, aliado a que *Crithidia deanei* possuidora de endosimbionte pode ser cultivado em um meio carente de hemina, sugere que a presença do endosimbionte aumenta uma limitada capacidade biosintética da cadeia do hemo dos tripanosomatídeos, contribuindo com certas enzimas dessa via.

Considerando que a Hemo-S de *T. cruzi* mostrou ser totalmente funcional e com o objetivo de estabelecer a possível existência de diferenças definidas entre o comportamento da enzima do flagelado e o hospede, se estudaram algumas propriedades da Hemo-S de *T. cruzi*, empregando-se para tal as cepas Tulahuén ou Y.

Dos resultados obtidos até o presente, podemos destacar que a Hemo-S de *T. cruzi* apresenta uma série de características similares à enzima de outras fontes, como por exemplo, sua localização celular, interação lípido-proteína e pH ótimo. Encontrou-se que praticamente toda a atividade enzimática estava localizada na fração celular particulada que sedimenta a 30.000xg, identificada como mitocondrial.

A enzima se mediu empregando proto, meso e deuteroporfirina como substratos. O Triton X-100 inibiu 40 e 70% a formação de proto e mesohemo. O pH ótimo foi encontrado entre 7,2 e 7,5 para as diferentes porfirinas usadas como substratos. A quantidade de proteína e o tempo de armazenamento influíram sobre a atividade enzimática.

Além disso se demonstrou que a Hemo-S de *T. cruzi* é várias vezes mais ativa com mesoporfirina como substrato. Estes dados podem ser úteis para o desenvolvimento de alguma alternativa terapêutica dirigida logicamente à destruição seletiva do *T. cruzi*. Se é possível demonstrar *in vivo* que o parasito não se desenvolve quando substituímos o protohemo por mesohemo, a administração de mesoporfirina poderia afetar especificamente a replicação do flagelado.

Não obstante, outro comportamento aparentemente característico da Hemo-S de *T. cruzi* que devemos destacar foi a sua reatividade frente a diferentes metais.

Nossos resultados demonstraram que o Fe^{2+} é o melhor substrato da Hemo-S de *T. cruzi*, ainda que o Zn^{2+} se tenha incorporado com boa atividade. Cu^{2+} e Co^{2+} não modificaram a atividade enzimática, em tanto que Mn^{2+} e Mg^{2+} foram inibitórios. A adição simultânea de Zn^{2+} e Fe^{2+} provocou uma estimulação da atividade, mas o mais interessante foi que a presença de Cu^{2+} , além do substrato natural Fe^{2+} na mistura de incubação, transformou ao primeiro num inibidor da Hemo-S de *T. cruzi*. Este comportamento diferencial frente ao Cu^{2+} é um ponto que se pesquisará em detalhe por quanto abre outra possibilidade de destruir seletivamente o parasito, inativando em forma específica sua Hemo-S.