

## Tesis de Posgrado

# Regulación de fosfodiesterasa y quinasas de proteínas

Ulloa de la Serna, Rita María

1988

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Ulloa de la Serna, Rita María. (1988). Regulación de fosfodiesterasa y quinasas de proteínas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2115\\_UlloadelaSerna.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2115_UlloadelaSerna.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Ulloa de la Serna, Rita María. "Regulación de fosfodiesterasa y quinasas de proteínas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2115\\_UlloadelaSerna.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2115_UlloadelaSerna.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Regulación de fosfodiesterasas y quinasas de proteínas

en *Trypanosoma cruzi*

Rita María Ulloa de la Serna

Tesis para optar al título de

Doctor en Ciencias Biológicas

Director: Dra. María Teresa Téllez-Iñón

1988

2115  
E. 2.

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética  
y Biología Molecular (INGEBI-CONICET)

**A los míos**

Los problemas son para solucionarlos.  
La libertad para comprobarla.  
Y en tanto tengamos fe en nuestros sueños,  
nada sucede por simple azar.

Richard Bach

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que de un modo u otro contribuyeron a la realización de esta Tesis:

A la Dra. María Teresa Téllez-Iñón por su guía y el apoyo permanente brindado a lo largo de estos años.

Al Dr. Héctor N. Torres por su confianza y orientación.

A la Dra. Elsa L. Segura, Directora del Instituto "Fatala-Chabén" y a su colaboradora, la Lic. Mónica Esteva, por haberme facilitado el material necesario para desarrollar los experimentos.

A la Dra. Mirtha Flawiá y al Dr. Norberto Judewicz por su estímulo y ayuda constantes.

A mi consejera de estudios, Dra. Cristina Maggese.

A mis amigas Carmen Rivas, Clarita Rubinstein, Alejandra Mandel y Valentina Carricarte por haber compartido los buenos y malos momentos en estos años de trabajo.

A Enrique Mesri que colaboró especialmente con algunos de los experimentos presentados en esta Tesis.

Al Dr. Alejandro Paladini por su experta colaboración en el procesamiento de textos.

A todos mis compañeros y amigos del INGEBI por la compañía y colaboración brindadas.

A Adriana Urman por su paciente y excelente labor dactilográfica.

A Norberto Malarini por la confección de gráficos y por su alegre compañía.

A María Julia Alvarez, Norberto Contreras y Gabriel Paissán por su esmerada asistencia técnica.

# INDICE

Pág.

**RESUMEN**.....vii

## **I - INTRODUCCION**

I.	GENERALIDADES SOBRE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	2
II.	UBICACION SISTEMATICA.....	4
III.	VARIABILIDAD INTERESPECIFICA E INTRAESPECIFICA.....	6
IV.	CICLO DE VIDA.....	10
V.	REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES.....	13
VI.	DIFERENCIACION.....	14
1.	FACTORES INVOLUCRADOS EN LA DIFERENCIACION.....	16
2.	ROL DEL AMPc.....	17
VII.	ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DEL AMPc...22	
1.A.	Adenilato ciclasa.....	
1.B.	Adenilato ciclasa en <i>Trypanosomas</i> .....	24
2.	QUINASAS DE PROTEINAS.....	25
2.A.	Quinasas de proteínas dependientes de AMPc.....	25
2.A.1.	Sitios de unión al AMPc en la subunidad regulatoria. Cooperatividad entre ambos.....	27
2.A.2.	Mutantes de R en la región de unión al AMPc.....	29
2.A.3.1.	Diferencias entre las quinasas de proteínas.....	30
2.A.3.2.	Autofosforilación de RII.....	31
2.A.3.3.	Diferencias inmunológicas.....	32
2.A.4.	Homología y evolución de las subunidades RI y RII.....	33
2.A.5.	Heterogeneidad de RII.....	38
2.A.6.	Roles de PKI y PKII.....	39
2.A.7.1.	Subunidad catalítica.....	41
2.A.7.2.	Heterogeneidad de C.....	43

2.A.7.3.	Estimulación hormonal.....	44
2.A.7.4.	Inhibidores de la subunidad catalítica.....	45
2.B.	Quinasas de proteínas dependientes de GMPc.....	45
2.C.	Quinasas de proteínas en <i>Trypanosomas</i> .....	46
3.	FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS.....	48
3.A.	Fosfodiesterasas dependientes de calmodulina.....	50
3.B.	PDE que unen GMPc.....	52
3.C.	PDE de AMPc asociada a membranas.....	55
3.D.	Otras PDE de nucleótidos 3'-5'.....	57
3.E.	PDE no específicas.....	57
4.1.	Inhibidores de PDE.....	58
4.2.	Mecanismos de inhibición.....	60
5.	SIGNIFICADO DE LAS FORMAS MULTIPLES.....	60
6.	FOSFODIESTERASAS EN TRYPANOSOMAS.....	62
<b>VIII.</b>	<b>CALMODULINA.....</b>	<b>64</b>
1.	CARACTERISTICAS DE LA CALMODULINA DE VERTEBRADOS..	65
2.	ESTRUCTURA DE LA CALMODULINA.....	67
3.	HOMOLOGIA ENTRE CALMODULINA Y OTRAS PROTEINAS.....	71
4.	MECANISMO DE ACCION DE LA CALMODULINA.....	72
5.	PROCESOS REGULADOS POR CALMODULINA.....	73
6.	CRITERIOS PARA DETERMINAR SI UNA REACCION ES REGULADA POR CALMODULINA.....	77
7.	EL GEN DE LA CALMODULINA.....	78
8.	EVOLUCION DE LA CALMODULINA.....	79
9.	CALMODULINA EN TRYPANOSOMAS.....	82
<b>IX.</b>	<b>PAPEL DEL Ca<sup>2+</sup> EN EL MOVIMIENTO DE CILIOS Y FLAGELOS.....</b>	<b>84</b>
1.	ENTRADA DEL Ca <sup>2+</sup> .....	85
2.	ACCION DEL Ca <sup>2+</sup> .....	86

## II - MATERIALES Y METODOS

<b>I.</b>	<b>ORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO.....</b>	<b>92</b>
<b>II.</b>	<b>HOMOGENEIZACION Y FRACCIONAMIENTO.....</b>	<b>92</b>
<b>III.</b>	<b>ENSAYOS ENZIMATICOS.....</b>	<b>93</b>
1.	QUINASAS DE PROTEINAS.....	93
2.	UNION DE AMP CICLICO.....	94

3.	FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS.....	95
4.	DETECCION DE CALMODULINA.....	96
5.	OTRAS DETERMINACIONES REALIZADAS.....	96
5.1.	Proteínas.....	96
5.2.	Citocromo C.....	96
5.3.	Malato deshidrogenasa.....	96
5.4.	Lactato deshidrogenasa.....	96
5.5.	Catalasa.....	97
5.6.	Radio de Stokes.....	97
<b>IV.</b>	<b>PREPARACION DEL SUSTRATO RADIOACTIVO PARA LAS QUINASAS DE PROTEINAS.....</b>	<b>97</b>
<b>V.</b>	<b>PURIFICACION DE QUINASAS DE PROTEINAS DEPENDIENTES DE AMP CICLICO DE <i>Trypanosoma cruzi</i> ...</b>	<b>98</b>
1.	CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA.....	98
2.	PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO.....	99
3.	FILTRACION EN GELES.....	99
4.	CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN HISTONA II-AS-SEPHAROSA.....	100
4.1.	Preparación de la Histona-Sepharosa.....	100
4.2.	Cromatografía en Histona-Sepharosa.....	100
5.	CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN AMPc HEXANO-AGAROSA.....	101
6.	CROMATOGRAFIA MIXTA EN SEPHADEX G25-CM-50.....	102
<b>VI.</b>	<b>PURIFICACION DE QUINASAS DE PROTEINAS DEPENDIENTES DE AMP CICLICO DE CORAZON BOVINO....</b>	<b>102</b>
<b>VII.</b>	<b>ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....</b>	<b>103</b>
1.	PREPARACION DE GELES.....	103
2.	PREPARACION DE LAS MUESTRAS Y CORRIDA ELECTROFORETICA.....	104
<b>VIII.</b>	<b>FOSFORILACION EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....</b>	
<b>IX.</b>	<b>TRANSFERENCIA A NITROCELULOSA E INMUNOPRECI- PITACION <i>IN SITU</i> CON ANTICUERPOS ESPECIFICOS.....</b>	<b>106</b>
a.	<i>DOT BLOT</i> .....	106
b.	<i>WESTERN BLOT</i> .....	106
<b>X.</b>	<b>PURIFICACION DE LA FOSFODIESTERASA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....</b>	<b>108</b>
1.	CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA.....	108
2.	COLUMNA DE AFINIDAD CALMODULINA-SEPHAROSA.....	108
2.1.	Preparación de la columna de afinidad.....	108



2.2.	Cromatografía en columna de afinidad calmodulina-Sepharosa.....	109
3.	COLUMNA DE AFINIDAD ANTICUERPO-SEPHAROSA.....	110
3.1.	Obtención del anticuerpo contra la fosfo-diesterasa de nucleótidos cíclicos de <i>Neurospora crassa</i> .....	110
3.2.	Preparación y cromatografía en columna de afinidad anticuerpo-sepharosa.....	111
XI.	<b>PURIFICACION DE FOSFODIESTERASA DE AMP CICLICO DE CEREBRO BOVINO</b> .....	111
XII.	<b>PURIFICACION DE CALMODULINA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i></b> .....	112
1.	FILTRACION EN GEL.....	112
2.	CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD CAPP-SEPHAROSA.....	113
3.	CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN COLUMNA DE PHENYL-SEPHAROSA.....	113
XIII.	<b>PURIFICACION DE CALMODULINA DE CEREBRO BOVINO</b> ....	114
XIV.	<b>PREPARACION DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMPc DEL HONGO <i>N. crassa</i></b> .....	114
XV.	<b>REACTIVOS UTILIZADOS</b> .....	115

### III - RESULTADOS Y DISCUSION

I.	<b>QUINASAS DE PROTEINAS EN <i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....	118
1.	EXTRACTOS CRUDOS.....	120
2.	CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA.....	122
3.	ACTIVACION POR AMPc.....	122
4.	ESPECIFICIDAD DE LA UNION A AMPc.....	122
5.	ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO.....	124
6.	CURVA DE Mg <sup>2+</sup> .....	128
7.	CONCENTRACION DE ATP.....	128
8.	EFEECTO DE SALES.....	130
II.	<b>PURIFICACION DE LA PKII</b> .....	130
1.	CROMATOGRAFIA EN SEPHACRYL S300.....	133
2.	CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD HISTONA-SEPHAROSA.....	137
3.	CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD "AMPc-AGAROSA".....	139
4.	CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G25-CM50.....	139

III.	<b>ENSAYOS DE RECONSTITUCION DE LA HOLOENZIMA A PARTIR DE LAS SUBUNIDADES "C" Y "R" CORRESPONDIENTES</b> .....	141
	RECONSTITUCION DE LA HOLOENZIMA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	143
2.	RECONSTITUCION DE UNA HOLOENZIMA HETEROLOGA.....	143
3.	RECONSTITUCION DE LA HOLOENZIMA DE CORAZON.....	146
IV.	<b>CARACTERIZACION DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i></b> .....	146
1.	AUTOFOSFORILACION.....	147
2.	INMUNODETECCION ( <i>DOT BLOT</i> ).....	147
3.	TRANSFERENCIA A NITROCELULOSA E INMUNOPRECIPITACION <i>in situ</i> .....	149
	<b>DISCUSION</b> .....	152
V.	<b>PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA FOSFODIESTERASA DE AMP<sub>c</sub> Y DE LA CALMODULINA DE <i>T. CRUZI</i></b> .....	159
1.	PERFIL DE ELUCION DE LA DEAE-CELULOSA.....	159
VI.	<b>CARACTERIZACION DE LA FOSFODIESTERASA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i></b> .....	161
1.	ACTIVACION POR Ca <sup>2+</sup> -CALMODULINA.....	161
2.	EFFECTO DEL Ca <sup>2+</sup> , EGTA Y DROGAS BLOQUEANTES DE CALMODULINA SOBRE LA FOSFODIESTERASA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....	164
3.	CURVA DE CONCENTRACION DE CA <sup>2+</sup> .....	165
4.	CARACTERIZACION CINETICA DE LA FOSFODIESTERASA.....	165
VII.	<b>COLUMNA DE AFINIDAD CALMODULINA-SEPHAROSA</b> .....	166
VIII.	<b>CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD "ANTICUERPO-SEPHAROSA"</b> .....	171
IX.	<b>CALMODULINA DEL PARASITO</b> .....	171
1.	PERFIL DE ELUCION DEL BIOGEL P60.....	174
2.	ACTIVACION DE LA FOSFODIESTERASA DE CEREBRO BOVINO.....	174
X.	<b>PURIFICACION DE LA CALMODULINA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD</b> .....	174
1.	CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD CAPP-SEPHAROSA.....	174

	CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD "PHENYL-SEPHAROSA".....	180
XI.	EFFECTO DE DROGAS SOBRE LA MOVILIDAD DEL PARASITO.....	180
	DISCUSION.....	182
	<u>IV - BIBLIOGRAFIA</u> .....	187
	<u>ABREVIATURAS</u> .....	206

## RESUMEN

En este trabajo de Tesis se describen y caracterizan algunas de las enzimas directamente involucradas en el metabolismo del AMPc del protozoario parásito *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. Diversos autores han postulado que el AMP cíclico regula la diferenciación del parásito. Si bien no se conoce su blanco de acción intracelular, se demostró que los niveles endógenos del AMP cíclico aumentan durante la metaciclógenesis. Los resultados presentados indican la existencia de una quinasa de proteínas dependiente de AMPc en el parásito, que probablemente sea la mediadora de muchos de los efectos del nucleótido.

Extractos citosólicos de la forma epimastigote de *T. cruzi* cromatografiados en una columna de DEAE-celulosa mostraron dos picos con actividad de quinasa de proteínas que eluyeron a 0,15 y 0,32 M NaCl, respectivamente. El segundo pico, PKII, también presentó capacidad de unir AMPc en forma específica y se activó por concentraciones nanomolares del nucleótido.

La actividad de quinasa de proteínas dependiente de AMPc (PKII) se purificó por filtración en geles, por cromatografía de afinidad en histona-Sepharosa y en AMPc-agarosa y por cromatografía en una columna mixta de Sephadex G-25-Carboximetil Sephadex C-50. La enzima pudo dissociarse parcialmente en dos componentes diferentes: catalítico y regulatorio. El componente catalítico presentó un radio de Stokes (2,2 nm) menor que el de la subunidad catalítica de corazón bovino (2,8 nm). En experimentos de reconstitución, la actividad del componente catalítico de *T. cruzi* se inhibió por la subunidad regulatoria de corazón. A su vez, el componente regulatorio fue capaz de inhibir la actividad fosfo-transferasa del componente catalítico homólogo y de la subunidad catalítica de corazón. Estas inhibiciones se revirtieron con la adición de AMPc.

La preparación de holoenzima se fosforiló en ausencia de un sustrato exógeno aceptor de fosfatos y se analizó en electroforesis en condiciones disociantes. Se observó una única banda fosforilada de 56 K. La misma preparación se transfirió a nitrocelulosa y se incubó con anticuerpos policlonales contra la subunidad regulatoria tipo II de eucariotes superiores (*Western blot*). El antisuero reconoció una única banda de 56 K.

Se puede concluir que la quinasa dependiente de AMPc del parásito es similar a una quinasa tipo II de mamíferos en base a las siguientes características: elución con alta sal de una DEAE-celulosa, tamaño de la subunidad regulatoria, capacidad de autofosforilarse de la misma y el reconocimiento por sueros policlonales específicos contra RII.

En la segunda parte de este trabajo se estudió la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (PDE) obtenida de extractos citosólicos del parásito. La enzima soluble (80%) se purificó por DEAE-celulosa y por cromatografía de afinidad en calmodulina-Sepharosa. La PDE que eluyó en un único pico de la DEAE-celulosa hidrolizó AMPc y GMPc con alta afinidad. La enzima se activó en presencia de la calmodulina homóloga, de cerebro bovino y de *N. crassa*, lográndose el 50% de estimulación máxima con 0,3 µg/ml del activador. En un gráfico de dobles recíprocas, la enzima presentó dos componentes cinéticos, uno de alta y otro de baja afinidad por el sustrato AMPc ( $K_m$  2,5 y 100 µM). La calmodulina aumentó la  $V_{máx}$  de ambos componentes sin modificar la afinidad de la enzima por el sustrato. La activación requirió concentraciones micromolares de  $Ca^{2+}$  y se bloqueó por EGTA y por drogas neurolépticas como la clorpromazina, la flufenazina y el compuesto 48/80.

Paralelamente se purificó la calmodulina del parásito por DEAE-celulosa, filtración en geles y cromatografía de afinidad en CAPP-Sepharosa o en Phenyl-Sepharosa. En electroforesis en condiciones disociantes, la calmodulina mostró una sola banda polipep-

tídica con un peso molecular aparente de 16 K. La calmodulina purificada fue capaz de activar la PDE dependiente del activador de cerebro bovino en forma similar a la homóloga.

La calmodulina, probablemente regule el movimiento flagelar porque el tratamiento *in vivo* de epimastigotes de *T. cruzi* con drogas fenotiazínicas detuvo el movimiento del parásito y modificó su forma. Este efecto, altamente citotóxico de las drogas, es potencialmente importante y podría utilizarse para una futura acción terapéutica cuyo blanco sería la calmodulina o las enzimas dependientes del activador.

Se puede concluir que en *T. cruzi* se han conservado las enzimas implicadas en el metabolismo del AMPc que poseen características similares a las de los eucariotes superiores.

## I. INTRODUCCION

### I. GENERALIDADES SOBRE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

En 1909 Carlos Chagas describió por primera vez la enfermedad que actualmente lleva su nombre (1). Este descubrimiento, tuvo la particularidad de ser posterior al hallazgo del vector y del parásito que causaban la enfermedad. En aquel entonces, Chagas se desempeñaba como médico en Lassance, Estado de Minas Gerais, Brasil, a cargo de un programa de control de malaria. Las viviendas humildes de los habitantes de Minas Gerais estaban infestadas por un triatómido hematófago, *Panstrongilus megistus*, al cual Chagas estudió como posible transmisor de enfermedades para el hombre.

En el intestino de estos insectos, observó un parásito flagelado al que denominó *Schizotrypanum cruzi*. Seguidamente, investigó la posible presencia del parásito entre los pobladores de la región y de sus animales domésticos, encontrando el *Trypanosoma cruzi* en la sangre de una niña y de un gato. Relacionó el parásito con una enfermedad hasta entonces desconocida, caracterizada entre otros síntomas, por anemia, edema palpebral y daño cardíaco. De este modo, reveló la existencia de una nueva Trypanosomiasis, y echó las bases de nuestros conocimientos actuales sobre su etiología, clínica y epidemiología.

Desafortunadamente, Chagas malinterpretó algunos de los síntomas de la enfermedad, por lo cual fue criticado duramente, prestándose muy poca atención a la enfermedad durante un cuarto de siglo.

En 1926, un grupo de médicos argentinos encabezados por Salvador Mazza, con la colaboración de Flavio Niño, organizaron una campaña de divulgación de la enfermedad de Chagas, e inicia-



## Introducción

ron la investigación de la misma, dándole a esta patología la importancia merecida, ya que afecta a más de 35 millones de personas en nuestro continente.

## II. UBICACION SISTEMATICA

El *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la Trypanomiasis americana (enfermedad de Chagas). Los parásitos de la familia Trypanosomatidae se caracterizan por un flagelo y un cinetoplasto únicos. El género *Trypanosoma* comprende parásitos digenéticos que tienen por lo menos en uno de sus estadios de desarrollo la forma trypomastigote. Según Hoare (2) este género se divide en dos secciones: Salivaria y Estercoraria. La primera comprende un grupo de trypanosomas patógenos que se multiplican en el mamífero en el estadio trypomastigote, completan el desarrollo en la estación anterior del vector y son transmitidos por inoculación; la única excepción es el *Trypanosoma equiperdum* que se transmite directamente de mamífero a mamífero.

La segunda sección agrupa especies no patógenas con la excepción de *Trypanosoma cruzi*. Los parásitos agrupados en esta sección se multiplican en el mamífero como amastigotes o epimastigotes, completan su desarrollo en la estación posterior del huésped intermediario, y son transmitidos por contaminación. La excepción es el *Trypanosoma rangeli* que completa su desarrollo en la estación anterior y es transmitido por inoculación.

La ubicación sistemática de *Trypanosoma cruzi* es la siguiente (Hoare 1972, Levine y colaboradores, 1980)(2,3).

Tipo:	Protozoa (Goldfuss, 1818)
Subtipo:	Sarcomastigophora (Honigberg y Balamuth, 1963)
Superclase:	Mastigophora (Dresing, 1866)
Clase:	Zoomastigophora (Calkins, 1909)
Orden:	Kinetoplastida (Honigberg, 1963, emend Vickerman, 1976)
Suborden:	Trypanosomatina (Kent, 1880)

## Introducción

Familia: Trypanosomatidae (Doflein, 1901)  
Género: Trypanosoma (Gruby, 1843)  
Subgénero: Schizotrypanum (Chagas, 1909)  
Especie: cruzi (Chagas, 1909)

El subgénero Schizotrypanum es conocido sólo en el hemisferio occidental, infecta más de cien especies de mamíferos pertenecientes a ocho órdenes, y a más de ochenta especies de triatómidos que pueden transmitirlo. Los huéspedes mamíferos más importantes son del orden Marsupialia, Edentata y Rodentia, siendo también susceptibles de infección los primates, Carnivora, Lagomorpha, Artiodactyla y Chiroptera.

La distribución del parásito en mamíferos e insectos (43°S a 42°N) es más amplia que en el hombre (38°S a 25°N) que se limita a Sud América al sur del Río Grande.

### III. VARIABILIDAD INTERESPECIFICA E INTRAESPECIFICA

La Trypanosomiasis americana difiere de las africanas principalmente en el modo de evadir la respuesta inmune del huésped definitivo. Mientras que *Trypanosoma cruzi* la evita con un desarrollo intracelular, el *Trypanosoma brucei* lo logra mediante el mecanismo de variabilidad antigénica. Este último consiste en la renovación cíclica de su proteína mayoritaria de cubierta, VSG, que es altamente inmunógena. El paciente chagásico tiene fiebre únicamente después de la primera infección, mientras que la enfermedad del sueño presenta ciclos de fiebre que se correlacionan con cada variación de VSG (4).

En 1979, Afchain y colaboradores (5) estudiaron los antígenos de superficie de distintas especies de Trypanosomas, observando que *Trypanosoma cruzi* comparte antígenos con *Trypanosoma dionisii* y *Trypanosoma rangeli* con una afinidad de 0.6, en cambio *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* están más distantes compartiendo un 0.4, y la divergencia con *Leishmania* es aún mayor, con sólo 0.3 de similitud. Existen antígenos específicos para *Trypanosoma cruzi*, de los cuales el componente 5, es el mayoritario; éste no pertenece a una entidad molecular bien definida, sino que corresponde a una familia de glicoproteínas formada por dos moléculas diferentes. Seis cepas de *Trypanosoma cruzi* de distintas áreas geográficas presentan el mismo componente 5 y la misma glicoproteína de superficie de 90 Kd. Sin embargo, no se excluye la posibilidad de diferencias que podrían explicar los distintos grados de virulencia (5,6).

Un factor que causa variación en el cuadro clínico de la enfermedad de Chagas es la cepa del parásito de la cual se trate. El comportamiento de distintas cepas puede ser muy variado en a-

nimales de laboratorio, en cuanto a características tales como el curso de la infección, grado de parasitemia, tropismos tisulares, alteraciones histopatológicas y mortalidad.

Formas sanguíneas y de cultivo de *Trypanosoma cruzi* pueden distinguirse por aglutinación con concanavalina A, lisis en suero inmune y fluorescencia indirecta. Brener (7) observó que antisueros de las cepas "Y" y "CL" neutralizan los trypomastigotes de la cepa Y, pero no los de la cepa CL, demostrando por primera vez, diferencias antigénicas entre dos cepas de *Trypanosoma cruzi*. En 1966 y 1969, Nussenzweig y González Cappa (8,9) respectivamente, dividieron las cepas de *Trypanosoma cruzi* en tres grupos, dependiendo de los antígenos. Ya en 1963, Chiari y Brener (10) habían analizado cepas obtenidas de pacientes o heces de diferentes áreas geográficas, encontrando diferencias morfológicas predominantes.

Se demostró que distintas cepas muestran un comportamiento diferente frente a sustancias exógenas, productos de metabolismo, y vías oxidativas. Goldberg (11) describió la incorporación de arginina y lisina marcada con  $^{14}\text{C}$  en las cepas "Y" y "MR" de *Trypanosoma cruzi*. Ambas cepas se comportaron en forma diferente y la incorporación fue mayor al tercer día que al décimo. En 1964, Mancilla y Naquira (12) informaron que el ciclo de pentosas era más activo, y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos era menos activo en las formas de cultivo de la cepa Tulahuén que en la cepa Perú.

En 1977, Miles (13) demostró que cepas de *Trypanosoma cruzi* recolectadas en distintas áreas geográficas difieren en el perfil electroforético de seis enzimas: aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa, malato deshidrogenasa, glucosafosfato isomerasa y fosfoglucomutasa. Diferenció dos tipos, correspondiendo el tipo I a animales

salvajes, y el tipo II a casos humanos y animales domésticos. En un trabajo posterior, con material aislado en la selva amazónica, encontró un tercer grupo, tipo III, que correspondió a pacientes con enfermedad de Chagas aguda (14). En 1980, extendió su estudio a 38 enzimas de las cuales seleccionó 18 que dieron bandas electroforéticas discretas manteniendo la tipificación anterior en "zimodemas" I, II y III (15). La desventaja potencial de este método la demostraron Romanha y colaboradores en 1979 (16) al probar que el perfil isoenzimático puede cambiar después de subcultivos repetidos sugiriendo que los caracteres utilizados para la tipificación no eran muy estables.

Por análisis de restricción del ADN de diversas cepas y por diferencia de densidad de flotación del ADN nuclear (ADNn) y cinetoplástico (ADNk) se detectaron variaciones entre cepas. Riou y Gutteridge (17) encontraron que estas diferencias se relacionaban con resistencia a determinadas drogas. En 1977, Mattei y colaboradores (18) usaron como criterio taxonómico la digestión del ADNk, aislado de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*, con endonucleasas restrictivas y posterior corrida electroforética y tinción con bromuro de etidio. Las enzimas Hpa I, Hpa II, Hae III y Eco RI les permitieron diferenciar fácilmente las cepas Y, FL, CL y Gilmar.

Luego, en 1980, Morel y Simpson (19) extendieron estos estudios, empleando un mayor número de endonucleasas restrictivas, e introdujeron el término "esquizodema" para designar los grupos de aislados que presenten el mismo perfil electroforético de fragmentos de ADN.

En 1981, Frasch y colaboradores (20) diferenciaron entre sí las cepas Tul O, Tul OR, Tul 2, CAI, Sonya e Y de *Trypanosoma cruzi*, utilizando estas mismas técnicas.

## Introducción

Asimismo, cepas clonadas varían en su capacidad de diferenciarse *in vitro*. Existen cepas con una capacidad espontánea de diferenciación, y otras que requieren condiciones especiales para lograrlo. Goldenberg (21) logró diferenciar la cepa Dm 28 de *Trypanosoma cruzi* por ayuno y posterior agregado de L-prolina. Ensayó este método con otras cepas que variaron en los porcentajes de diferenciación obtenidos; sin embargo, la cepa Tulahuén no pudo diferenciarse por este método.

Además, hay cepas que varían respecto a los requerimientos nutricionales. Citri y Grossowicz (22) y Boné y Parent (23) desarrollaron medios semidefinidos, usando caseína y triptosa como fuente de aminoácidos. Estos medios se ensayaron en cuatro cepas: Berenice, FL, Y y Culbertson; sólo las dos primeras crecieron en el medio de Boné y no pudieron ser transferidas al de Citri (24).

Por lo señalado anteriormente, al iniciar algún estudio sobre *Trypanosoma cruzi*, es importante tener en cuenta la enorme variabilidad de las cepas.

IV. CICLO DE VIDA

*Trypanosoma cruzi* tiene un complejo ciclo de vida que involucra un desarrollo dentro de dos huéspedes: un mamífero (huésped definitivo), y un insecto vector (huésped intermedio). Este protozoo parasita el intestino de un gran número de triatómidos siendo *Triatoma infestans* el principal vector en nuestro medio.

Existen tres ambientes en los cuales se desarrolla el parásito: dentro de la célula, libre en la corriente sanguínea del mamífero, y en el lumen del intestino del insecto vector. En cada medio se desarrolla un tipo morfológico predominante: amastigote, trypomastigote y epimastigote, respectivamente, existiendo numerosas formas de transición. Estos tres tipos morfológicos se distinguen en base a la posición del cinetoplasto con respecto al núcleo, al largo del flagelo y extensión de la membrana ondulante y al tamaño. El cinetoplasto, el cuerpo basal y la porción emergente del flagelo se encuentran como un conjunto estructural respecto al núcleo del parásito (Figura I-1).

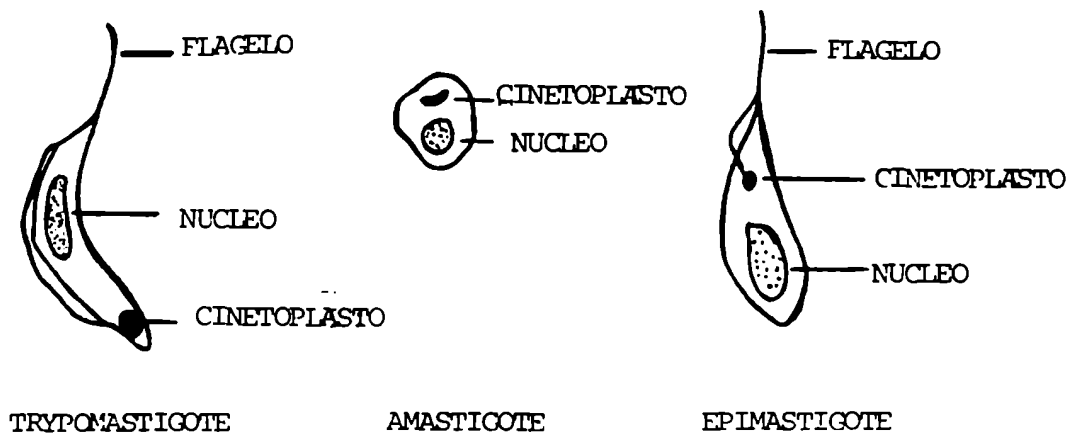


Figura I-1: Diagrama que ilustra las formas morfológicas en el ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi*. Esquema publicado en el Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, en marzo de 1976.



Cuando el estadio infectivo, trypomastigote metacíclico, penetra en un mamífero, no se multiplica en la sangre, sino que invade células de varios tejidos (músculo cardíaco e intestino) donde se diferencia a la forma amastigote, bajo la cual se multiplica por división binaria simple. El término amastigote es un error, ya que la forma intracelular del parásito tiene un pequeño flagelo libre; Brack (25) ha propuesto denominarlo Esferomastigote.

En 1976, Dvorak (26) demostró *in vitro* que el número de generaciones del parásito en cada célula, a partir del trypomastigote infectivo, es de nueve, y que el tiempo de generación del parásito es aproximadamente de 13 horas. Antes de multiplicarse, el parásito presenta un periodo de latencia de 34 horas. Luego de la novena generación, se observa que los parásitos se diferencian a trypomastigotes, ya sea por desarrollo fusiforme, pasando por una forma epimastigote intermedia (2) o por desarrollo orbicular que involucra un proceso de desenrollamiento.

Los trypomastigotes abandonan la célula huésped, por ruptura de la misma, reingresando en la corriente sanguínea desde donde infectarán nuevas células. Existen dos formas de trypomastigotes sanguíneos, una más estilizada que invade los tejidos y prosigue la infección en el mamífero, y una más gruesa que es efectiva para el insecto vector y así transmite el parásito.

El huésped intermediario que se alimenta sobre un mamífero infectado puede ingerir con la sangre al parásito circulante (trypomastigote). A medida que se acerca a la luz del intestino, el parásito se redondea, pierde el flagelo, diferenciándose a amastigote y luego a epimastigote, el que se multiplica activamente en la región del intestino medio. Finalmente, los epimastigotes se diferencian a trypomastigotes metacíclicos en la ampolla rectal del insecto, los que se eliminan con las heces para ini-

ciar el nuevo ciclo. No se demostró penetración celular en el vector, pero sí una estrecha relación entre las células epiteliales del mismo y la membrana celular de *Trypanosoma cruzi*.

La Figura I-2 esquematiza el ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.

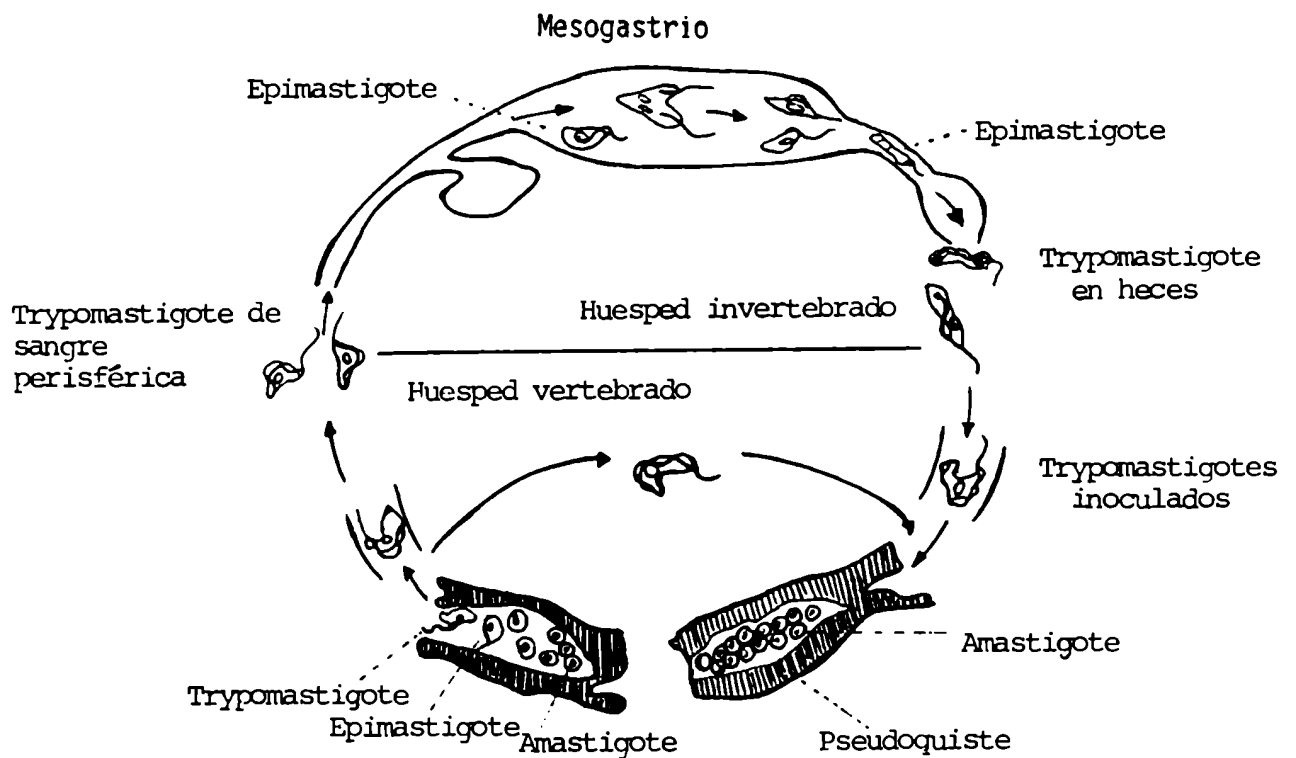


Figura I-2: Ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi*. Esquema publicado en el Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, en marzo de 1976.

## V. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

El *Trypanosoma* requiere para crecer un medio muy rico y complejo. Necesita como fuente de energía glucosa o algún otro sustrato hidrocarbonado tal como citrato, acetato, succinato o glucosamina. La presencia de todos los aminoácidos es importante, al igual que la de purinas y pirimidinas. Se requieren cantidades apreciables de cloruro de sodio y fosfato diácido de potasio. Un componente fundamental para el crecimiento es la hemina, ya que *T. cruzi* es incapaz de sintetizar el anillo de las porfirinas. Según el medio de cultivo, debe adicionarse suero fetal bovino o albúmina como fuente de factores de crecimiento. El pH óptimo es 7,4 dado por el tampón HEPES y  $\text{NaCO}_3$ , y la temperatura no debe superar los 30°C.

El cultivo de epimastigotes está bien establecido, en medios axénicos ya sean bifásicos o monofásicos, preferentemente LIT (*liver infusion tryptose*). Avila (27) describió un medio más simple conteniendo únicamente glucosa, sales inorgánicas, nucleótidos, vitaminas y catalasa de hígado bovino como fuente de aminoácidos. Esta última no puede reemplazarse por una mezcla de aminoácidos libres. Posteriormente, eliminó nucleótidos y vitaminas.

El estudio de las formas trypomastigote y amastigote se ha visto entorpecido por falta de accesibilidad a grandes cantidades de estas formas del parásito. Actualmente, se aíslan los trypomastigotes *in vitro* del sistema de cultivo de tejidos y también directamente por cromatografía en DEAE de la sangre de animales infectados.

Se ha avanzado en la obtención de amastigotes en cultivos axénicos *in vitro*. Sin embargo, permanece la duda si estas formas son idénticas a las que se encuentran intracelularmente.

## VI. DIFERENCIACION

El *Trypanosoma cruzi* presenta tres estadios definidos en su desarrollo: amastigote, estadio reproductivo intracelular, trypomastigote, estadio infectivo, es la forma libre en la circulación sanguínea y en el lumen del recto del insecto vector y epimastigote, forma multiplicativa en el insecto vector. Los tres estadios varían en cuanto al medio ambiente, morfología y comportamiento; estos cambios se reflejan en la superficie celular del parásito en la que existen diferencias cualitativas y cuantitativas.

Colli (28) observó que los tres estadios reaccionan en forma diferente frente a lectinas, pudiendo servir éstas como marcadores de los estadios, tal es el caso de PNA (aglutinina de maní) que reacciona sólo con amastigotes, WGA (aglutinina de germen de trigo), y lectinas de *Bandeiraea simplicifolia*, *Sophora Japonica* y *Helix pomatia*, que reaccionan con epimastigotes y la lectina de *Phaseolus vulgaris* con trypomastigotes sanguíneos y amastigotes. Los trypomastigotes tratados con sialidasa son aglutinables con PNA.

Existen otras diferencias marcadas: los epimastigotes son lisados en suero normal porque activan la vía alternativa del complemento (ACP); en cambio, los trypomastigotes son resistentes a la lisis en ausencia de anticuerpos. El pasaje de epimastigote a trypomastigote involucra una modificación en la superficie celular del parásito, que lo hace resistente al ACP. Cuando los trypomastigotes son tratados con tripsina o sialidasa, activan el ACP y son lisados. A las seis horas, recuperan su resistencia; sin embargo, si hay puromicina en el medio, no la recuperan (29).

Todos los estadios del proceso de diferenciación se han reproducido *in vitro*. La transformación de trypomastigotes a amastigotes y epimastigotes, se obtiene en un medio de cultivo de

rutina (30). La transformación de epimastigote a trypomastigote, metaciclogénesis, ocurre en el recto del insecto vector. *In vitro* se obtuvo en medios no definidos, semidefinidos y en cavidades subcutáneas implantadas en ratón.

En 1964, Camargo (31) observó que la metaciclogénesis se producía al final de la fase estacionaria de crecimiento cuando el cultivo ya estaba envejecido. Células epimastigotes, no diferenciadas, por división producían 2 hijas, una de las cuales estaba diferenciada y otra no. Por pasaje de los epimastigotes del medio rico (LIT, *liver infusion tryptose*) a uno más pobre (LAS, medio de lactoalbúmina y suero) aumentó la diferenciación.

Castellani y colaboradores (32) en 1967, trabajando con la cepa Y obtuvieron diferenciación de trypomastigotes sanguíneos a trypomastigotes metacíclicos. Chiari (33) logró diferenciar las cepas Y y MR a epimastigotes cultivándolos primeramente en LIT y luego en HIL (*heart infusion*) que es un medio más pobre. Este pasaje, así como la acidificación del pH del medio, estimulaban la metaciclogénesis. Obtuvo los mismos resultados con las cepas B, CL, MR, Br y ABC.

Posteriormente, Goldenberg (21) logró la diferenciación de la cepa Dm 28 sometiendo las células cultivadas en LIT a un *stress* nutricional al final de la fase logarítmica de crecimiento por pasaje a otro medio, TAU (orina artificial de triatómidos), suplementado con L-prolina. Analizó los perfiles polipeptídicos durante la diferenciación observando que los epimastigotes poseen un mayor grado de complejidad en las proteínas. Contreras y colaboradores (34) observaron que genes específicos de trypomastigotes aparecen 12 horas después de incubar los epimastigotes en TAUS. Existe síntesis proteica durante la metaciclogénesis, los productos de expresión de genes preceden la diferenciación morfo-

lógica: los antígenos de epimastigotes son reemplazados por los de trypomastigotes metacíclicos, una proteína de 80-85 kd es sintetizada activamente.

Otros autores (35) utilizaron extractos de insectos, homogenato de intestino de *Trypanosoma infestans* o hemolinfa para suplementar cultivos de epimastigotes. Luego de 6 a 8 días en medio de Grace (36) se suplementaron los cultivos con el homogenato, y la morfogénesis fue irreversible después de 4 horas de interacción con éste.

### VI.1 FACTORES INVOLUCRADOS EN LA DIFERENCIACION

En los casos conocidos hasta el momento, la diferenciación ocurre debido a factores exógenos o involucra un factor biológico activo.

Entre los factores exógenos influye: el tamaño del inóculo, cuando éste supera  $1,5-2,5 \times 10^7$  cel/ml se inhibe la diferenciación, la tensión de oxígeno, el medio de cultivo, y el tiempo del cultivo. En muchos casos, la diferenciación ocurre al final de la fase estacionaria. Varios autores depletan medios ricos para inducir la diferenciación en la creencia que la ausencia de un nutriente esencial o la acumulación de un metabolito pueden provocarla. Otro factor involucrado es la temperatura, variaciones de 4°C a 28°C o de 21°C a 28°C aceleran la diferenciación; esto es similar a lo que ocurre con *Trypanosoma conorhini* que se diferencia cuando aumenta la temperatura. Cambios en el pH del medio modifican la diferenciación; se conoce que una acidificación del pH debida a acumulación de ácidos orgánicos seguida de un desplazamiento de pH 6,5 a 6,7 estimulan la transformación.

Varios autores (35,37,38) demostraron que la diferenciación puede ocurrir independientemente del agotamiento de nutrientes porque encontraron una significativa morfogénesis durante el

crecimiento exponencial, pero observaron que se requiere la presencia de un factor biológico activo. Estos autores no encuentran diferenciación en ausencia de la hemolinfa de *Phylosamia cynthia*, u homogenato total de *Rhodnius prolixus* o hemolinfa u homogenato de *Triatoma infestans*. O'Daly (39) sugiere, en cambio, que tanto nutrientes como factores biológicos están involucrados, ya que logró diferenciar epimastigotes al final de la etapa estacionaria en presencia de seroalbúmina fetal bovina como estímulo.

Existen factores biológicos no específicos involucrados, ya que se obtuvo morfogénesis *in vitro* en cultivos suplementados con hemolinfa de *Phylosamia*, en células de *Aedes aegypti* en cultivo, o *in vivo* infectando otros artrópodos. Si el parásito posee un receptor en la membrana, capaz de reconocer un factor morfogénico activo en el intestino del insecto, no es sorprendente que el factor no sea específico, como ya se demostró para ciertas hormonas, como es el caso de la insulina (40).

En 1982, Sher y Snary (41) obtuvieron diferenciación de epimastigotes en el medio Tc 199, 18 horas después de la implantación subcutánea en ratón durante 7 horas. Aparentemente, el huésped mamífero provee una sustancia requerida para la diferenciación o induce una modificación en la membrana celular del parásito.

### VI.2. ROL DEL AMPc

Cambios en los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos, especialmente del 3'5' adenosina monofosfato cíclico, AMPc, están involucrados en la diferenciación celular, reproducción, síntesis de macromoléculas, neurotransmisión y variaciones en la permeabilidad de membranas de muchos organismos eucariotes.

La hipótesis de que el AMPc regula la proliferación celular era apoyada por muchos investigadores en la década del 70. Se sabía que las células transformadas tenían bajos los niveles de AMPc y que el agregado de agentes que elevasen su concentración intracelular detenía el crecimiento celular. Posteriormente, J. Pawelek (42) observó que los efectos del AMPc dependen de su concentración en la célula y que la dosis óptima varía de célula a célula de acuerdo a la constante de asociación ( $K_a$ ) por el AMPc de la proteína quinasa dependiente del nucleótido cíclico.

La concentración de AMPc se eleva en forma transitoria previamente a la síntesis de ADN en un gran número de células, pero la iniciación de la síntesis se detiene si los niveles del nucleótido se mantienen elevados. Esto ocurre en bacterias, levaduras y células de mamífero *in vivo* e *in vitro*. Se conoce el rol del AMPc en la modulación de la expresión génica, sin embargo, no está claro cómo la lleva a cabo. La vía de acción del AMPc podría involucrar la fosforilación de proteínas nucleares que, a su vez, regularían la transcripción de genes específicos. Se ha demostrado que en células de médula adrenal, el aumento de los niveles de AMPc disocia la quinasa de proteínas dependiente del nucleótido citosólica y las subunidades catalíticas se traslocan al núcleo y fosforilan proteínas no histónicas fuertemente asociadas a cromatina. Concomitantemente, con la fosforilación se incrementa la síntesis de RNA mensajeros (RNAm) que se traduce en un aumento de tirosina hidroxilasa (43). Este es un ejemplo del control indirecto que ejerce el AMPc en la regulación génica.

Los niveles intracelulares del AMPc resultan del equilibrio entre la adenilato ciclasa, enzima que lo sintetiza a partir de 5'ATP liberando pirofosfato y la fosfodiesterasa de AMPc que degrada el nucleótido a 5'AMP. Los receptores intracelulares del AMPc difieren en organismos procariotes y eucariotes. En *E. coli*,



el AMPc se asocia a la proteína CRP o CAP (proteína asociada a cromatina) que se une a secuencias de ADN permitiendo la transcripción de varios operones regulados por represión catabólica. En eucariotes, el receptor del AMPc es la subunidad regulatoria de la quinasa de proteínas dependiente del nucleótido, éste actúa como segundo mensajero a través del cual eventos intracelulares son controlados por estímulos externos, incluyendo algunas hormonas. La quinasa dependiente de AMPc (PK-AMPc) está presente en vertebrados, invertebrados y microorganismos. Estudios de líneas celulares resistentes al AMPc sugieren que la PK-AMPc es responsable de todos o casi todos los eventos mediados por AMPc, estimulando o inhibiendo varias vías metabólicas dando origen a la respuesta celular.

Estudios sobre el papel del nucleótido en los Trypanosomas sugieren que éste está involucrado en la diferenciación. Se detectó actividad de adenilato ciclasa en *T. brucei* (44) y *T. cruzi* (45,46), actividad de fosfodiesterasa en *T. gambiense*, *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. donovani* (47,48,49,50,51). Existen proteínas con capacidad de unir AMPc en *T. gambiense*, *T. cruzi* y en *T. brucei*, así como actividad de quinasas de proteínas estimulada por nucleósidos en *T. gambiense* (52,53,54,55,56). Se correlacionó el aumento de los niveles de AMPc con la disminución de la proliferación celular en promastigotes de *L. tropica* y con la inhibición de la diferenciación de amastigotes a promastigotes en *L. donovani* (57).

El crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* disminuye cuando se agregan drogas adrenérgicas al medio de cultivo, revirtiéndose el efecto por la presencia del antagonista adrenérgico, propanolol. Este fenómeno es mediado por AMPc dado que el agregado de inhibidores de fosfodiesterasa o de dibutiril AMPc producen el mismo efecto. Los niveles de AMPc aumentan cuando se agregan

ligandos a organismos intactos, lo que sugiere que el rol del AMPc en el control del crecimiento del parásito es mediado por receptores adrenérgicos (58).

Strickler y Patton (59a) estudiaron la diferenciación de *Trypanosoma lewisi*. Este es un parásito no patógeno de ratas, perteneciente a la sección salivaria. La transformación de *T. lewisi* involucra un pasaje de una población con alta reproducción a una población no reproductiva. Estas dos poblaciones tienen diferentes características morfológicas, bioquímicas y físicas. La transformación se induce por un anticuerpo del huésped mamífero, ablastina, que inhibe la reproducción del parásito. En presencia de ablastina, la diferenciación de *T. lewisi* es completa; sin embargo, se revierte al quitar el anticuerpo del medio. Se determinaron los niveles de AMPc durante el ciclo de vida del parásito; el AMPc intracelular aumenta dos veces su concentración durante la transición de formas reproductivas a no reproductivas. En células de mamíferos en cultivo, se ha observado que el AMPc reduce la respuesta a lectinas de las células transformadas a niveles de las no transformadas e induce una alteración morfológica en las células transformadas, similar a las no transformadas. Cuando se agrega el nucleótido exógenamente a cultivos primarios en crecimiento, se inhibe la síntesis de ADN y se detiene la célula en fase G1. Dado que durante la diferenciación de *T. lewisi* se inhibe la reproducción y se producen alteraciones morfológicas y de membrana, se ha sugerido que la función de la ablastina es estimular el aumento de los niveles intracelulares de AMPc.

La transición de formas sanguíneas delgadas a gruesas durante la infección pleomórfica de *T. brucei* involucra una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos tales como el acortamiento del flagelo y del cuerpo, un aumento del retículo

endoplásmico y de vacuolas digestivas, así como variaciones en la síntesis de enzimas respiratorias y del metabolismo de carbohidratos hacia una vía aeróbica de obtención de energía.

Los niveles intracelulares de AMPc en Ytat 1, variante pleomórfica clonada de *T. brucei* y en EATRO 110M, cepa monomórfica de *T. brucei*, presentan variaciones no azarosas durante las fluctuaciones en parasitemia en ratas normales e inmunosuprimidas. Los niveles de AMPc aumentan a medida que la infección se acerca al pico de parasitemia. Cuando en la población aparecen formas intermedias y disminuye el porcentaje de formas delgadas, caen los niveles de AMPc (59b).

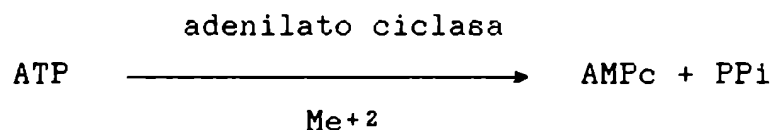
Recientemente, Rangel-Aldao y colaboradores (60), observaron que los trypomastigotes de la cepa E.P. de *T. cruzi* contenían 4 veces más AMPc que los epimastigotes. Esta última forma celular que tiene capacidad de proliferación, presentó niveles intracelulares de AMPc similares a los descritos por Strickler y Patton (59a) para la forma reproductiva de *T. lewisi*, mientras que los trypomastigotes mostraron valores similares a la forma no proliferativa de *T. lewisi*. Los autores sugieren que el AMPc es un regulador negativo de la división celular en Trypanosomas y que en concentraciones elevadas gatillaría la diferenciación celular en *T. cruzi*.

## VII. ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DEL AMPc

Las enzimas que regulan los niveles intracelulares del AMPc son: la adenilato ciclasa, la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos y la quinasa de proteínas dependiente del nucleótido. Este sistema de control ha conservado sus principales características a lo largo de la evolución, lo cual sugiere que la función del AMPc también se ha conservado.

VII.1.A. Adenilato ciclasa

La adenilato ciclasa es la enzima responsable de la síntesis del AMPc según la reacción:



Los sustratos de esta reacción pueden ser los complejos Mg-ATP o Mn-ATP, actuando los cationes divalentes  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  como activadores de la misma. En el caso de algunas ciclasas como la de *Neurospora* (61), testículo (62) y *T. cruzi* (46) la dependencia de  $\text{Mn}^{2+}$  es casi absoluta. Si bien la concentración intracelular de  $\text{Mg}^{2+}$  es casi cien veces mayor que la de  $\text{Mn}^{2+}$ , la mayor estabilidad que posee el complejo Mn-ATP podría explicar que la enzima funcione *in vivo* con ambos cationes (63).

La actividad de esta enzima se ha detectado en todas las células animales estudiadas (64) (excepto eritrocitos caninos), en sistemas eucariotes inferiores tales como protozoarios (65), hongos (61), levaduras (66) y también en bacterias (67,68). En todas las células eucariotes estudiadas, la adenilato ciclasa se en-

cuentra asociada a membrana plasmática, siendo excepción a esta regla la enzima de los túbulos seminíferos cuya localización es citoplasmática (62). En organismos inferiores y bacterias, la asociación de la enzima a la membrana es bastante débil.

En 1967, Robinson, Bütcher y Sutherland (69a) propusieron un modelo que asumía la existencia de dos subunidades con una orientación direccional específica. El receptor, en el lado externo de la membrana, interaccionaría con la hormona correspondiente, con lo cual activaría la subunidad catalítica de la enzima en la cara interna de la membrana. Actualmente se conoce que los receptores hormonales son proteínas diferentes a la adenilato ciclasa. Insel y colaboradores (69b) demostraron que dos clones de células de hepatoma de rata y de una variante de linfoma de ratón S49, ambos deficientes fenotípicamente de adenilato ciclasa, poseían receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Esto indicaba la existencia de dos proteínas diferentes, receptor y enzima, que luego pudieron ser separadas físicamente y caracterizadas molecularmente (70, 71).

La adenilato ciclasa sensible a hormonas consta al menos de tres tipos de proteínas: receptor (R), y componentes regulatorio (N) y catalítico (72). Funcionalmente, se distinguen dos tipos de componentes regulatorios:  $N_s$ , que media los procesos de estimulación y  $N_i$  que está involucrado en la inhibición de la adenilato ciclasa.  $N_s$  y  $N_i$  son heterotrímeros con subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , cuyos pesos moleculares son: 42 a 45 kd para  $\alpha_s$ ; 40 a 41 kd para  $\alpha_i$ ; 35 kd para  $\beta$  y 5 a 8 kd para  $\gamma$ .

La activación de  $N_s$  es el paso limitante de la velocidad de activación de la enzima, y es dependiente de Mg-ATP. El componente  $N_s$  interacciona con guanil nucleótidos y sus análogos no hidrolizables. El sitio de unión del GTP está localizado en la subunidad  $\alpha_s$  que, además, es portadora de una actividad GTPásica,

fundamental para la desactivación de la enzima. También contiene un sitio para la interacción con la toxina del cólera, que estimula la adenilato ciclasa como resultado de la ADP ribosilación de la subunidad  $\alpha$ s en presencia de  $\text{NAD}^+$ .

### VII.1.B. Adenilato ciclasa en *Trypanosomas*

Se ha determinado actividad de adenilato ciclasa en *T. brucei* y en *T. cruzi*. En ambos casos está asociada a membrana. La enzima de *T. brucei* no responde a glucagon o adrenalina ni se activa por nucleótidos de guanina; en cambio está regulada positivamente por  $\text{Ca}^{2+}$ ; éste efecto sólo es demostrable en células enteras (73). La activación de la adenilato ciclasa ocurre cuando los iones  $\text{Ca}^{2+}$  entran en la membrana plasmática y no por pasaje de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula, lo cual sugiere que el receptor del  $\text{Ca}^{2+}$  está dentro de la membrana plasmática, y no expuesto en sus caras internas o externas. Aparentemente, el efecto activador del  $\text{Ca}^{2+}$  no está mediado por calmodulina, ya que la presencia de 50  $\mu\text{M}$  Trifluoperazina (TFP) no tiene efecto inhibitorio (74). Se demostró que anestésicos locales, como el alcohol bencílico, que exponen el sitio de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  en el receptor del  $\text{Ca}^{2+}$ , potencian el efecto activador del  $\text{Ca}^{2+}$  (75). En *T. brucei*, la adenilato ciclasa puede estar involucrada en el cambio de la proteína mayoritaria de superficie VSG.

En *T. cruzi* la adenilato ciclasa posee una subunidad catalítica semejante a la de mamíferos. Pudo reconstituirse un sistema heterólogo con la subunidad catalítica de *T. cruzi* y membranas de hígado tratadas con N-etilmaleimida, que anula la actividad catalítica de éstas. El sistema reconstituido es sensible a glucagon, fluoruro y utiliza  $\text{Mg ATP}$  como sustrato (76).

A pesar de utilizar Mn ATP preferentemente como sustrato, la enzima de *T. cruzi* posee actividad con Mg ATP en mucho menor grado. Por ADP-ribosilación de las membranas de *T. cruzi* con toxina del cólera y adenina  $^{14}\text{C}$ -NAD $^{+}$  y posterior electroforesis en condiciones disociantes, se detectó una banda de 45 k; lo que indica que *T. cruzi* posee un sustrato polipeptídico para la actividad ADP-ribosilante de la toxina del cólera que corresponde a la subunidad  $\alpha$ s del componente N. Además, se reconstituyó la adenilato ciclasa de *T. cruzi* con la variante S49 de linfoma de ratón y se obtuvo un sistema heterólogo capaz de responder a efectores  $\beta$ -adrenérgicos (77).

### VII.2 QUINASAS DE PROTEINAS

Las quinasas de proteínas son enzimas que catalizan la transferencia del fosfato  $\gamma$  del ATP a un sustrato aceptor. Se han clasificado estas enzimas en base al modulador que regula la actividad quinásica y al grupo aminoacídico que fosforilan, ya sea serina, treonina o tirosina. En este trabajo se describirán las quinasas dependientes de nucleótidos cíclicos que fosforilan residuos serina o treonina.

#### VII.2.A. Quinasas de proteínas dependientes de AMPc

En 1957, Sutherland y Rall (78) descubrieron el AMPc y posteriormente la adenilato ciclasa (79), enzima que cataliza su síntesis a partir de 5'ATP. Diez años más tarde, Walsh y colaboradores (80) purificaron la quinasa de proteínas de músculo de conejo, que tiene una dependencia absoluta por el nucleótido y que, a su vez, activa la fosforilasa quinasa (FK) por fosforila-

ción. Encontró así, por primera vez, el eslabón entre la estimulación de la adenilato ciclasa por la epinefrina y la activación de la fosforilasa quinasa.

Posteriormente, se encontró que un gran número de procesos fisiológicos, influenciados por el AMPc, estaban regulados por la fosforilación de proteínas. Muchas de estas reacciones de fosforilación responden directamente al AMPc, y la enzima involucrada se denominó quinasa de proteínas dependiente de AMPc (PK-AMPc).

La PK-AMPc está compuesta por dos tipos de subunidades, catalítica y regulatoria, que interactúan una con otra y con el AMPc como se detalla en la siguiente reacción:



en la cual  $R_2C_2$  representa la holoenzima inactiva, R AMPc<sub>2</sub> es la subunidad regulatoria unida al AMPc, y C es la subunidad catalítica libre con actividad de quinasa. El AMPc disocia la holoenzima permitiendo que se active.

Se postula la existencia de un complejo ternario intermedio en la reacción de disociación:



Se sabe que R reacciona con C en presencia de AMPc (81). Recientemente, Connelly y colaboradores (82) aislaron, durante la reasociación de las subunidades, un complejo ternario estable formado por AMPc y por una especie trimérica  $R_2C$ . A su vez, Cobb y Corbin (83) lograron separar, mediante HPLC, un complejo ternario formado por R y C que posee actividad de fosfotransferasa dependiente de AMPc y tiene la mitad de sus sitios ocupados por el nucleótido.



La subunidad "R" existe como un dímero compuesto por dos cadenas polipeptídicas idénticas; "C" existe como monómero. El coeficiente friccional y radio axial sugieren que "C" es una proteína globular, mientras que la holoenzima y "R" son asimétricas.

Existen dos tipos de PK-AMPC solubles que se comportan de manera diferente en: cromatografía en DEAE, propiedades inmunológicas, afinidad por el AMPC, interacción entre subunidades, distribución tisular y capacidad de autofosforilación. Se las denomina PK-AMPC I y II. Ambas tienen estructura tetramérica, poseen subunidades catalíticas idénticas y difieren en su subunidad regulatoria.

### VII.2.A.1. Sitios de unión al AMPC en la subunidad regulatoria. Cooperatividad entre ambos

La holoenzima nativa se activa por la unión de dos moléculas de AMPC a cada monómero regulatorio, con la consecuente liberación de las subunidades catalíticas. Esto ocurre a través de la unión cooperativa del AMPC a dos sitios diferentes en cada cadena de R. Los dos sitios difieren en la velocidad de intercambio del nucleótido ligado y en su afinidad diferencial por análogos del AMPC. La velocidad de disociación del  $^3\text{H}$  AMPC es 0,025-0,05/min para el sitio 1 y 0,23-0,26/min para el sitio 2. El sitio 1 prefiere análogos del AMPC modificados en la posición C<sub>8</sub>, y el sitio 2 análogos modificados en la posición N<sub>6</sub>. El sitio 1 es probablemente el primero en ser ocupado (84).

La cooperatividad positiva en la unión del AMPC se refleja en una cooperatividad en la activación de la quinasa de proteínas. Dado que R existe en forma dimérica, la cooperatividad puede ser intra o intermonómeros o ambas. Por proteólisis limita-

da se pierde el dímero regulatorio, pero la monomerización no afecta la velocidad de disociación del AMPc ni la selectividad de los análogos. Clásicamente, se conocía que los efectos cooperativos eran entre subunidades, sin embargo, la interacción cooperativa entre los dos sitios no se altera por proteólisis, lo que indica una interacción intrasubunidad.

La subunidad R es análoga a la calmodulina, proteína monomérica que une 4  $\text{Ca}^{++}$  a la misma molécula. En ambos casos, los sitios de unión al AMPc o al  $\text{Ca}^{++}$  evolucionaron por duplicación de genes. Los sitios de unión al AMPc de la proteína CAP de *E. coli* (proteína activadora de genes por catabolitos) son homólogos a los de R y los residuos no conservados pueden ser responsables de las diferencias de afinidad de ambos sitios (85).

En condiciones fisiológicas, la concentración de la enzima es 0,2-0,7  $\mu\text{M}$ , la constante de disociación del AMPc es  $10^{-8}$ , y la afinidad entre R y C es 0,2 a 0,6 nM. Cuando el AMPc se une a R, la afinidad entre R y C cae diez veces y se produce la disociación. La disociación completa de C y R requiere que los cuatro sitios de unión al AMPc estén ocupados y todos los sitios en la subunidad R dimérica deben interactuar entre sí para generar la cooperatividad positiva que tiene un coeficiente de Hill de 1,8. La interacción de sólo dos sitios en forma homóloga (sitio 1 - sitio 2) o heteróloga (sitio 1 - sitio 1'), no podría ocasionar esta elevada cooperatividad.

Usando dos diastereoisómeros sp y rp adenosina 3'-5' fosforotioato, en los que la carga negativa del grupo fosfato está en posición ecuatorial (sp) o axial (rp) se detectaron cambios estructurales en la región de unión al AMPc. El rp-AMPc se une a R pero no disocia (actúa inhibiendo); el sp-AMPc se une a R y activa en forma similar al AMPc.

Se postuló que el AMPc reconoce primeramente a los oxígenos 5' y 3' y al grupo 2' hidroxilo, a los que se une por puentes hidrógeno. Esta unión podría representar el complejo ternario  $R_2.C_2.(AMPc)_4$  formado previamente a la disociación. En un segundo paso podría formarse un puente salino entre la carga negativa del oxígeno ecuatorial exocíclico con la carga positiva de un residuo aminoacídico. Posiblemente, la arginina sea el aminoácido involucrado. Este mecanismo en dos pasos podría explicar los cambios conformacionales de la subunidad regulatoria que lleva a disociar la catalítica (84).

### VII.2.A.2. Mutantes de R en la región de unión al AMPc

Por experimentos con análogos del AMPc se conoce que ambos sitios están involucrados en la activación de la quinasa. La unión a un solo sitio no es suficiente para la activación de la enzima; sin embargo, usando espectroscopía de polarización de fluorescencia, se encontró que dos moléculas de AMPc eran necesarias y suficientes para liberar ambas subunidades catalíticas. A fin de estudiar la cooperatividad entre los sitios de unión a AMPc, presentes en la subunidad regulatoria de la quinasa de proteínas dependiente del nucleótido, Steinberg y colaboradores (86) caracterizaron mutantes de la variante S49 de linfoma de ratón, con lesiones en la subunidad RI.

Estos autores observaron que la lesión en uno de los sitios del AMPc disminuía la cooperatividad entre sitios, porque inhibía la unión del nucleótido al sitio mutado. Además, en estas mutantes se alteraba la constante de disociación ( $K_d$ ) del sitio no mutado, y aumentaba la velocidad con que éste se disociaba del AMPc. Los autores sugieren que en las mutantes se mantiene la interacción entre las subunidades y que la cooperatividad observada

en la activación de la quinasa mutada se debe a los efectos cooperativos de la interacción entre el dímero de R y la subunidad C, y no a los efectos intracatenarios entre los sitios de AMPc.

En conclusión, la quinasa de proteínas dependiente de AMPc puede activarse por la interacción del AMPc con cualquiera de los sitios de unión, ya sea el 1 ó el 2. La fuerte cooperatividad entre los sitios 1 y 2 lleva a que ambos estén involucrados en el proceso de activación de la quinasa de la cepa salvaje. Esta interacción intracatenaria subraya las diferencias en sensibilidad y cooperatividad entre la enzima de la cepa salvaje y la mutada. Además de las interacciones intracatenarias, existen interacciones intercatenarias, que son las responsables de la limitada cooperatividad observada en la activación de la enzima mutada.

### VII.2.A.3.1. Diferencias entre las quinasas de proteínas dependientes de AMPc

El primer indicio de la existencia de dos tipos de quinasas dependientes de AMPc fue la elución diferencial de una cromatografía en DEAE-celulosa de dos actividades quinásicas con capacidad de unir AMPc. Se denominaron quinasas I y II de acuerdo al orden de elución en el gradiente de NaCl, 0,08-0,1 M y 0,2 M, respectivamente. Ambas quinasas son solubles, presentan la misma estructura tetramérica y el mismo mecanismo de activación en presencia de AMPc.

Prototipos de ambas quinasas han sido purificados a homogeneidad: la quinasa de músculo esquelético de conejo (tipo I) y la quinasa de músculo cardíaco bovino (tipo II). La PKI tiene un peso molecular de 165 K y la PKII de 174,4 K. Esta diferencia en el peso molecular se debe al tamaño de las subunidades regula-

torias: 47-49 K para RI y 55-56 K para RII. Las subunidades catalíticas son idénticas con un peso molecular de 38 K (87). Mapas peptídicos de RI y RII mostraron grandes diferencias en la estructura primaria de ambas subunidades. Posteriormente, Takio y colaboradores (88), y Titani y colaboradores (89) obtuvieron las secuencias aminoacídicas de ambas subunidades regulatorias y confirmaron estas diferencias.

La PKI tiene mayor afinidad por el AMPc disociándose a bajas concentraciones del nucleótido; también la histona se une a RI e induce la disociación. En cambio, PKII se disocia solamente en presencia de altos niveles de AMPc. Aparentemente, la unión del AMPc a PKI y PKII tiene una cooperatividad débilmente positiva (90).

Las dos enzimas difieren en su afinidad por el ATP. RI une ATP con alta afinidad (50  $\mu$ M); esto se debe a que la serina 95 presente en RII está reemplazada por una alanina en RI (84). Significativamente, el complejo Mg-ATP estimula la reasociación de RI con la subunidad catalítica pero no la de RII. La subunidad RII se autofosforila; la subunidad RI, en cambio, puede ser fosforilada *in vitro* en una reacción lenta catalizada por la quinasa de proteínas dependientes de GMPc (91). Ambas quinasas se activan preincubando con alta sal, en ausencia de AMPc, que desplaza el equilibrio hacia la disociación. Además, la alta sal impide la reasociación de RII (83).

### VII.2.A.3.2. Autofosforilación de RII

La subunidad RII se autofosforila en una reacción intramolecular y dicho sitio de autofosforilación presenta grandes semejanzas con otros sustratos fosforilados por la quinasa. PKII incorpora 1 mol de fosfato del ATP en cada uno de los residuos

serina 95 del dímero de R. El  $K_m$  para el ATP para esta reacción es de  $0,7 \mu M$ , bastante menor que la concentración fisiológica de ATP, por lo cual la proteína RII predomina en la forma fosforilada. La fosforilación reduce la movilidad electroforética de la proteína, siendo 54 K el peso molecular de la enzima defosforilada, y 56 K el de la fosforilada. Existen otros sitios en RII que pueden fosforilarse *in vitro* e *in vivo* por la caseína quinasa II o por la glucógeno sintetasa quinasa 5 (serinas 74 y 76), además, la glucógeno sintetasa quinasa 3 fosforila las serinas 44 y 47. Hasta el momento, no está claro si estas fosforilaciones intervienen en la regulación de la enzima.

La PKII fosforilada o defosforilada une 2 moles de AMPc por monómero regulatorio y se disocia hasta el mismo nivel, cualquiera sea la concentración de AMPc. Sin embargo, la RII defosforilada se reasocia 5 a 8 veces más rápido que la RII fosforilada. La concentración de AMPc debe caer hasta diez veces para lograr la misma reasociación que la RII no fosforilada. La enzima fosforilada potencia el efecto disociante del AMPc. La reasociación involucra la formación de un trímero cuyo peso molecular es de 137 K. La RII fosforilada puede defosforilarse por acción de fosfatasa que actúan sobre la subunidad libre, pero no sobre la holoenzima (93). Blumenthal y colaboradores (93) han descrito una fosfatasa de proteínas dependiente de calmodulina que *in vitro* defosforila la subunidad RII.

### VII.2.A.3.3. Diferencias inmunológicas

Antisueros obtenidos contra la subunidad RII de corazón reaccionan con RII y con la holoenzima  $RII_2C_2$  pero no con RI o  $RI_2C_2$  y viceversa, demostrando que los determinantes antigénicos varían de una subunidad regulatoria a otra. Con los antisueros se

ha detectado la presencia de ambas quinasas en proporciones variables en diferentes tejidos. Existe una localización inmunocitoquímica específica de RI y RII que varía de especie a especie (94). Además, se observaron niveles alterados de RI y RII en células que modifican su potencial proliferativo, como en el caso de la transformación y diferenciación (95). Existe una expresión diferencial de RI y RII durante el desarrollo y en distintas fases de la progresión del ciclo celular.

### VII.2.A.4. Homología y evolución de las subunidades RI y RII

Ambas subunidades regulatorias, RI y RII, presentan tres dominios funcionales y una región susceptible al ataque proteolítico. Esta región, rica en prolina, a la cual se denominó "región bisagra", separa un dominio aminoterminal pequeño de un dominio carboxiterminal mayoritario.

El sitio de autofosforilación de RII y el sitio de RI que se fosforila *in vitro* por la quinasa de proteínas dependiente de GMP cíclico se localiza en la región bisagra (91). Cercano al sitio de autofosforilación de RII se encuentran dos regiones muy ácidas, que comprenden los aminoácidos 73 a 83 y 104 a 111. Se cree que pueden estar involucradas en la interacción con la subunidad catalítica que es una proteína muy básica. Existen evidencias de que los aminoácidos 91 y 92 (asp-arg) son imprescindibles para la interacción de RII con la subunidad catalítica. Al estar presente, C protege a R de la degradación por proteasas (88).

Por proteólisis limitada de RI y RII, se obtiene un fragmento aminoterminal de 134 aminoácidos, bloqueado en el extremo por un acetilo. En este fragmento se encuentra el dominio de dimerización de R, que se ha sugerido es el responsable de la

unión no-covalente de la holoenzima a organelas celulares, pudiendo servir para compartimentalizar la enzima en la célula (85). El fragmento carboxiterminal restante, contiene dos secuencias con alta homología interna, en las que se encuentran los sitios de unión a AMPc.

Takio y colaboradores (88) obtuvieron la secuencia aminoacídica de la subunidad RII obtenida de corazón bovino. La secuencia comprende 400 aminoácidos, lo que corresponde a un peso molecular de 45,084 Kd que es 10 Kd menor que el inferido por electroforesis en geles desnaturalizantes. Esta diferencia puede deberse a la asimetría de la subunidad RII. Existen dos zonas con alta homología interna entre los aminoácidos 135 a 256 y 257 a 400, que probablemente se han originado por la duplicación en tandem de un gen ancestral. Las secuencias más homólogas, que comprenden los residuos 202 a 215 y 332 a 345, son los sitios de unión a AMPc. Existe otro par de secuencias homólogas entre los residuos 60 a 87 y 90 a 117, que incluyen el sitio de autofosforilación y las regiones acídicas. Estas secuencias pueden haber surgido por duplicación génica o ser el resultado de una convergencia evolutiva para optimizar la interacción electrostática con la subunidad catalítica.

En 1984, Titani y colaboradores (89) secuenciaron la subunidad RI. Dicha proteína está compuesta por 379 residuos que corresponden a un peso molecular de 42,8 Kd. Al igual que en RII, la diferencia con el peso molecular inferido por geles puede deberse a la asimetría de la proteína. RI también tiene bloqueado el extremo aminoterminal y posee dos secuencias con alta homología en el dominio carboxiterminal, que comprenden los aminoácidos 135 a 252 y 253 a 379. Las secuencias de mayor homología, que involucran los aminoácidos 201 a 208 y 325 a 332, son los sitios de unión a AMPc. El grupo fosfato del AMPc se une con las argininas



210 y 334, y la ribosa forma puentes de hidrógeno con la alanina 212, la arginina 336 y con las cadenas laterales de los glutámicos 201 y 325.

El paralelismo entre las funciones regulatorias y los sitios de unión a AMPc de las subunidades RI y RII también se observa en las secuencias aminoacídicas y en la organización en dominios de ambas proteínas. Sin embargo, RI y RII son productos de distintos genes y las diferencias en las secuencias son suficientes para originar las diferencias físicas y químicas que las caracterizan.

Se han alineado las secuencias de RI y RII con la quinasa dependiente de GMP cíclico (96). Existe poca homología en la región aminoterminal; las marcadas diferencias en el extremo 5' sugieren que esta región se ha derivado de distintos rearrreglos génicos o ha sufrido modificaciones posteriores. Dado que el fragmento aminoterminal incluye la región de dimerización, es posible que las diferencias se hayan acumulado para asegurar las interacciones R-R entre subunidades homólogas y evitar los híbridos RI-RII (97).

La región de mayor homología es el fragmento carboxiterminal, donde se encuentran los sitios de unión a AMPc. Estos dominios son claramente homólogos en RI y RII, en la quinasa dependiente de GMPc y en menor grado en la proteína CAP de *E. coli*. Se puede proponer que RI, RII y la quinasa de GMPc contienen dos dominios de unión a nucleótidos, cada uno de ellos con una estructura terciaria similar a la de la proteína CAP.

Mc Kay y Steitz (98a) determinaron la estructura cristalina de la proteína CAP de *E. coli*. Es una proteína dependiente de AMPc que actúa a nivel de la transcripción. CAP se une al ADN en secuencias específicas en presencia de AMPc y regula la transcripción de los operones lactosa, galactosa y arabinosa C. En ausencia de AMPc sólo une ADN inespecíficamente.

Los cristales de CAP contienen una molécula de AMPc por subunidad de la proteína dimérica. El sitio de unión del AMPc se localiza en un bolsillo profundo situado en el dominio aminoterminal de CAP. Este bolsillo se forma entre un enrollamiento tipo  $\beta$  formado por ocho cadenas  $\beta$  y dos  $\alpha$ -hélices largas.

Cada molécula de AMPc está sepultada dentro de la proteína. El grupo fosfato del AMPc forma un puente con el residuo arginina 82 de la cadena  $\beta$ 7 y el anillo de adenina interacciona con los residuos treonina y serina de la  $\alpha$ -hélice C. Este elemento estructural también se conserva en RI.

Existe una clara homología entre ciertas secuencias de CAP y dos secuencias repetidas de RII. El perfil hidropático indica un enrollamiento similar en RII y CAP. Muchos aminoácidos en contacto con el AMPc están conservados, las argininas 213 y 343 de RII son homólogas y probablemente cumplan la misma función que la arginina 82 de CAP. La mayor homología ocurre entre las cadenas  $\beta$ 2 y  $\beta$ 7 que comprenden los aminoácidos 30 a 89 de CAP. Esta región comparte un 45% de homología con la primera región homóloga de RII y un 46,7% con la segunda (98b).

Esta homología entre CAP y RII sugiere que el dominio del AMPc es una estructura conservada en ambas proteínas. El precursor ancestral común de la proteína con capacidad de unir AMPc ha evolucionado en un receptor o transductor de los niveles de AMPc en bacterias y mamíferos. En ambos casos, han desarrollado distintas respuestas, mediadas por AMPc, ante la disminución de los niveles de glucosa. En procariotes, el dominio de unión del AMPc está adosado a un dominio de unión al ADN; este último comparte homologías estructurales y de secuencia con represores de bacterias y virus. En mamíferos, el dominio del AMPc es parte de una subunidad que regula la actividad de la primera enzima de la vía glucolítica.

Otros autores (99) han secuenciado la subunidad reguladora de *D. discoideum* y la compararon con las correspondientes secuencias de RI y RII de eucariotes superiores. Dada la temprana divergencia de *D. discoideum* del tronco de los eucariotes, esta comparación puede adelantar alguna evidencia sobre la evolución de dicha subunidad. La subunidad R de *D. discoideum* carece de los primeros 70 aminoácidos del extremo aminoterminal que corresponden al dominio de dimerización, lo cual indicaría que la R de *Dictyostelium* es un monómero.

La región bisagra presente en RI y RII, con la cual interactúa la subunidad catalítica, se ha conservado en *Dictyostelium*; por ello, se pudo reconstituir una holoenzima heteróloga con subunidades provenientes de *D. discoideum* y de mamíferos. La región de mayor homología es el extremo carboxiterminal, donde se localizan los sitios de unión a AMPc. Los autores propusieron que la presencia de dos dominios de unión a AMPc en *Dictyostelium* indicaría que la duplicación a partir de un putativo "gen ancestral" fue anterior a la adquisición de un dominio dimérico. Además, postulan que el gen ancestral tenía poca afinidad por el AMPc, dado que el sitio presente en la proteína CAP une el nucleótido en el rango micromolar.

En el modelo propuesto, el gen ancestral adquirió un sitio de interacción con la subunidad catalítica, y luego, uno de los sitios de unión a AMPc aumentó su afinidad por el nucleótido al rango nanomolar. Posteriormente, el segundo sitio mejoró su afinidad, lo que permitió a la actual quinasa de mamíferos una flexibilidad regulatoria adicional, a través de la cooperatividad entre sitios.

### VII.2.A.5. Heterogeneidad de RII

El prototipo de RII es la subunidad regulatoria de la quinasa de corazón bovino. Sin embargo, se detectó un segundo tipo de RII en cerebro, que se denominó RII meural. Ambos tipos de RII se autofosforilan pero presentan diferencias antigénicas en ensayos de competencia por radioinmuno y diferencias en algunos aminoácidos. Esta nueva isoforma de RII tiene un peso molecular de 51-52, está presente en cerebro, ovario, parótida y tejido adrenal, pero no se detectó en corazón o hígado. En ovario, la RII<sub>s1</sub>, se induce por estradiol, hormona folículo estimulante y por AMPc, aumentando hasta diez veces su concentración en folículos pre-ovulatorios.

Existen tres variantes isoeléctricas de la proteína RII<sub>s1</sub> presentes en extracto de células granulosas de ovario (RII<sub>s1</sub>, RII<sub>s1.5</sub> y RII<sub>s2</sub>), y en cerebro que son estructural e inmunológicamente semejantes. Además, se encuentra una subunidad, denominada RII<sub>s4</sub>, estructuralmente distinta a RII<sub>s1</sub>, que es similar a la RII de corazón. Probablemente las distintas variantes isoeléctricas de RII<sub>s1</sub> se deban a fosforilaciones post-traduccionales catalizadas por una quinasa de proteínas independiente de AMPc (100).

En ratas existen tres genes diferentes que codifican para RI, RII<sub>s4</sub> y RII<sub>s2</sub>. Aparentemente, las dos RII son productos de dos genes diferentes más que un procesamiento diferencial de un solo gen. Jahnsen y colaboradores (97) han secuenciado la subunidad RII<sub>s1</sub>. En ella se han conservado los dominios funcionales presentes en la RII de corazón, incluyendo el dominio de dimerización, el sitio antigénico, el sitio de autofosforilación, y los sitios de unión a AMPc.

En la región bisagra se ha sustituido una treonina por una arginina, lo cual no impidió la interacción de RII<sub>51</sub> con la subunidad C en ensayos de reconstitución. Las mayores diferencias entre RII<sub>51</sub> y RII se encuentran en el fragmento aminoterminal. No existe homología entre los aminoácidos 45 a 87; ello puede ser importante para la localización intracelular de la enzima. Además, los residuos serina fosforilados en RII de corazón por las glucógeno sintetasa quinasas 3 y 5 (serina 44, 47 y 74) y por la quinasa de caseína (serina 74 y 76) están sustituidos por otros aminoácidos en RII<sub>51</sub>. Por su parte, RII<sub>51</sub> posee varios residuos treonina específicos.

La alta concentración pre-ovulatoria de RII<sub>51</sub> sugiere que dicha enzima cumple un papel clave en la regulación mediada por AMPc de la diferenciación de las células de la granulosa.

### VII.2.A.6. Roles de PKI y PKII

La existencia de dos isoenzimas sugiere una función divergente que debe pertenecer a procesos básicos del metabolismo celular, ya que están presentes tanto en células proliferativas como no proliferativas, y en células diferenciadas y no diferenciadas.

Se observó que RI presenta una alta tasa de renovación celular, como resultado de una elevada síntesis y degradación, que es seis veces mayor que la de RII. Ambos tipos de R están sujetos a proteólisis limitada que ocurre en una región definida, identificada como región "bisagra" que sólo está expuesta en la subunidad regulatoria libre. Existen evidencias de que la degradación se regula por la frecuencia de activación. Para mantener los niveles de RI debe inducirse una síntesis compensatoria en

respuesta a cada ciclo de activación-deactivación. El alto recambio de RI sugiere que PKI responde más eficientemente que PKII a aumentos moderados de AMPc (101a).

Varias líneas celulares se estimularon con hormonas y luego se analizaron las quinasas de proteínas por cromatografía de intercambio. Los resultados indican que PKI se activa selectivamente a bajas concentraciones de AMPc y modula la respuesta celular a través de la fosforilación de enzimas claves. PKII, en cambio, se activa con altas concentraciones de AMPc, permitiendo la inducción de enzimas claves por activación de genes específicos. Se enfrenta así la modulación enzimática (PKI) versus la modulación génica (PKII). Se ha demostrado asociación específica de PKII con el aparato de Golgi y centrosomas (101b).

Aparentemente, existen roles funcionales selectivos para las subunidades regulatorias, además de inhibir la subunidad catalítica. Khatra y colaboradores (102) observaron que la subunidad regulatoria RII fosforilada, podría inhibir una actividad de fosfatasa en presencia de concentraciones elevadas de AMPc, amplificando así el efecto catalítico de la quinasa.

Se ha propuesto que los efectos del AMPc en la transcripción de genes involucran cambios en la fosforilación de proteínas del ADN catalizados por la subunidad catalítica de la PK-AMPc, y que esta fosforilación se correlaciona con un aumento en la actividad transcripcional (103,104,105). A su vez, en células cromafines de médula adrenal, se observó la traslocación de subunidades catalíticas al núcleo luego de la disociación de la quinasa. Estas actúan modulando la expresión del código genético para la producción de tirosina hidroxilasa (106,107). También se propone que existe un efecto mediado por R a nivel de genes, dado que aumenta la proporción de RI y RII en el núcleo, en respuesta a altos niveles de AMPc, durante la transcripción (108). Dada la

homología entre RII y la proteína CAP de *E. coli* (99) y la presencia de una secuencia en el 5' del gen de la PEP-carboxiquinasa que responde a AMPc (109), se sugirió una acción directa de RII a nivel del ADN. Constantinou y colaboradores (110) han propuesto que la RII fosforilada de hígado de rata interacciona con el ADN con actividad desenrollante similar a la Topoisomerasa I.

### VII.2.A.7.1. Subunidad catalítica

La subunidad catalítica, C, es una proteína básica, monomérica de 38 K que está presente en cantidades equimoleculares a la subunidad regulatoria, R, con la cual se asocia en la holoenzima inactiva. Al unir AMPc la subunidad R sufre una modificación conformacional que disminuye la afinidad de R por C y provoca la disociación.

Se marcó la subunidad catalítica con el análogo del ATP, p-fluorosulfonil benzoiladenosina (FSBA) que modificó la lisina 72. A su vez, la marcación con 3-nitro-2-piridensulfenil (NpYs), análogo de un sustrato peptídico cuya secuencia es Leu-Arg-Arg-Cis-(Npys)-Leu-Gli-, modificó la cisteína 199. Ambos aminoácidos están involucrados en la unión al ATP y al sustrato fosforilable en el sitio activo (111).

Se trató el grupo tiol de la cisteína 199 con agentes modificadores. En la subunidad catalítica libre, el grupo tiol está parcialmente protegido por el ATP, pero no por el AMPc, lo cual sugiere que este grupo está proximal al fosfato  $\gamma$  del ATP. La subunidad R también protege al grupo tiol, cuando R y ATP están presentes, el grupo está completamente protegido (84).

La subunidad C interacciona con la región aminoterminal de R. La defosforilación de RII está inhibida en presencia de C, probablemente porque ésta se une a R cerca del sitio de autofos-

forilación, impidiéndole el acceso a la fosfatasa. Existen en RII regiones muy ácidas cerca del sitio de autofosforilación, que se cree son las responsables de la interacción con C, ya que ésta posee una región muy básica en la vecindad del sitio de unión a Mg-ATP. La capacidad de histonas y protamina de disociar la holoenzima puede deberse a la competencia entre los sustratos básicos y la subunidad C por la proteína reguladora (88).

La región "bisagra" de R directamente obstruye el sitio activo de C. En la PKI este segmento provee residuos adicionales que interaccionan con la ribosa fosfato del ATP unido al dominio catalítico, con lo cual aumenta la interacción entre ambas subunidades.

La subunidad C libre cataliza la transferencia del fosfato  $\gamma$  del ATP al grupo hidroxilo del aminoácido serina de diversos sustratos fosforilables y de la subunidad RII de la quinasa dependiente de AMPc. El sitio de autofosforilación de RII comparte semejanzas con el sitio de fosforilación de otros sustratos proteicos, así como con inhibidores de la subunidad catalítica. En todos se conservan dos residuos básicos (arg-arg) situados en posición aminoterminal respecto del aminoácido serina. La interacción de sustratos o inhibidores con el sitio activo de C comprende tres etapas: (1) interacción iónica del sitio activo con el subsitio básico arg-arg; (2) el sustrato adopta una conformación *at random* que clausura el sitio activo; y (3) el grupo hidroxilo de la serina interacciona con el sitio activo, lo que induce un cambio conformacional de la enzima previamente a la transferencia del fosfato (112).



VII.2.A.7.2. Heterogeneidad de C

A diferencia de R, existe un solo tipo de subunidad catalítica que es la misma para ambas quinasas dependientes de AMPc. Se pueden diferenciar tres formas de C por técnicas isoeléctricas. La subunidad C se fosforila en la treonina 197 y en la serina 338, y se miristila en el aminoterminal, por lo que no es raro que existan diferentes formas isoeléctricas. Sin embargo, las tres formas tienen el mismo contenido de fosfatos y de bloqueantes del aminoterminal. Además, en geles no desnaturizantes existen tres formas de C complejadas con el inhibidor de PK, uno de estos complejos requiere ATP.

Por isoelectroenfocado de preparaciones de subunidades catalíticas de músculo y páncreas purificadas a homogeneidad, se obtuvieron dos bandas a pH 8,7 y 9,1. La banda a pH 9,1 representa la subunidad catalítica clásica, por lo que se la denominó "subunidad catalítica silenciosa". Sin embargo, esta subunidad silenciosa podría recuperar su actividad al preincubarse con una proteína moduladora que copurifica con el inhibidor de Walsh (113).

Se obtuvieron clones de cADN de ratón con las secuencias de dos subunidades catalíticas Ca y Cβ. Ca es idéntica en un 98% a la subunidad catalítica de corazón bovino, y Cβ en un 91%. La mayoría de las diferencias son sustituciones conservativas. La región de menor homología entre los clones Ca y Cβ corresponde al aminoterminal con un 73% de homología en 70 aminoácidos. Los aminoácidos implicados en la unión del ATP, lisina 73 y cisteína 199, están conservados en ambas. La carga neta a pH 7 es +3 para Ca y +4 para Cβ. Los 192 nucleótidos 5' del codón iniciador contienen un 84% de C-G en Ca y un 71% en Cβ.

Ambas subunidades Ca y C $\beta$  están presentes en diferentes tejidos de ratón y en líneas celulares. La relación de Ca:C $\beta$  varía en distintos tejidos, pero no existe una correlación de Ca:C $\beta$  con RI:RII. El alto grado de homología en la secuencia de aminoácidos (a pesar de mayores diferencias en la secuencia nucleotídica) sugiere que luego de un evento de duplicación génica temprana, las subunidades Ca y C $\beta$  adquirieron roles diferentes y esenciales como parte del sistema de las quinasas de proteínas dependientes de AMPc. Puede ser que las diferencias en la secuencia de aminoácidos se refleje en diferencias en especificidad de sustratos.

Dado que la interacción de R con C es en el mismo sitio de unión de los sustratos fosforilables Ca y C $\beta$ , pueden diferir en su interacción con R. Ca interacciona con RI y RII, mientras que C $\beta$  interacciona con una isoforma de R aún no caracterizada (111).

### VII.2.A.7.3. Estimulación hormonal

La estimulación hormonal induce la producción de AMPc con la concomitante activación de la quinasa de proteínas dependiente del nucleótido. Sin embargo, si la estimulación hormonal se prolonga (24 hs) la actividad de la quinasa cae en un 40% debido a la proteólisis de la subunidad catalítica libre.

Esta proteólisis actúa como un mecanismo de seguridad en condiciones de una estimulación sostenida, ya que exceso de C libre es inhibitorio para el crecimiento celular. En la línea mutante LLC-PK de células epiteliales de porcino, la concentración de C es el 5% de la línea parental. El crecimiento de esta línea no se inhibe por AMPc (114a).

Recientemente durante el crecimiento de la glándula parótida, inducido por isoproterenol, se describió la pérdida selectiva de la subunidad catalítica sin cambios en las subunidades regulatorias, demostrando una regulación independiente de dicha subunidad (114b). Este mecanismo de control de la subunidad catalítica estaría involucrado en los eventos que llevan finalmente a la proliferación celular.

#### VII.2.A.7.4. Inhibidores de la subunidad catalítica

El inhibidor de Walsh es una proteína ácida, termoes- table, que interactúa con el sitio catalítico de C en forma MgATP dependiente. Tiene una gran afinidad por la subunidad catalítica (0,04 a 0,5 nM) y actúa en forma competitiva con los sustratos de C.

Se han descrito dos inhibidores (I e I') que son con- fórmeros moleculares con atributos fisicoquímicos similares.

La serina aceptora de fosfatos presente en los sustratos de C es reemplazada por una alanina en los inhibidores que tam- bién conservan el subsitio básico arg-arg. Probablemente, la si- tuación óptima para la unión de los inhibidores con la subunidad catalítica se deba a la presencia de los residuos arginina (112).

#### VII.2.B. Quinasas de proteínas dependientes de GMPC

En 1970 se caracterizó una quinasa activada por GMPC que se purificó a homogeneidad de diversas fuentes, pero no se conoce aún su función fisiológica. Tiene un peso molecular aparente de 155 K (115) y está compuesta por dos subunidades monoméricas i- dénticas de 76,3 K (116) que están unidas por puentes disulfuro.

Se cree que las dos subunidades se ordenan en forma antiparalela, de tal modo que el dominio regulatorio de una subunidad inhibe el dominio catalítico de la otra (117).

Los 670 aminoácidos de cada subunidad pueden separarse en seis segmentos. El segmento aminoterminal contiene un dominio de dimerización, una región "bisagra" y un sitio de autofosforilación. Los segmentos 2 y 3 presentan gran homología con los dominios de unión al AMPc de la proteína CAP de *E. coli* y de la subunidad regulatoria de las quinasas dependientes de AMPc. Los segmentos 4, 5 y 6 representan el dominio catalítico de la enzima; los segmentos 4 y 5 tienen homología con todos los miembros de la familia de las quinasas, pero el 6 es homólogo a la subunidad catalítica de la quinasa dependiente de AMPc (116).

Esta enzima es una quimera compuesta de dominios catalíticos y regulatorios derivados de dos familias de quinasas de proteínas. *In vivo* fosforila un estrecho rango de sustratos diferentes a los fosforilados por la quinasa de AMPc. La unión de GMPc activa la enzima, pero no la disocia.

### VII.2.C. Quinasas de proteínas en *Trypanosomas*

Hasta el momento no se ha demostrado la existencia de una quinasa de proteínas dependiente de AMPc en *Trypanosomas*. Sin embargo, se detectaron actividades de fosfotransferasas independientes del nucleótido y proteínas con capacidad de unir AMPc.

En *T. gambiense* se encontraron tres quinasas de proteínas que fosforilan fosvitina, histona o protamina, que se denominaron PKI, PKII y PKIII, respectivamente (53). Los derivados de adenina tienen un efecto inhibitorio sobre ellas, ya que compiten con el ATP. La PKI está asociada a membrana y se inhibe con concentraciones micromolares de suramina. Se sugirió que el efecto

triptanocida de la suramina resulta de la inhibición de la fosforilación de enzimas claves (118). La PKII se duplica en presencia de concentraciones micromolares de nucleósidos (52), además se observó una ectoquinasa que fosforila proteínas de la superficie celular que se postula es la PKII secretada al medio. Ninguna quinasa tiene capacidad de unir AMPc y su actividad catalítica no se inhibe por el agregado de subunidades regulatorias RI o RII de eucariotes superiores. Sin embargo, no se determinó el efecto del AMPc sobre sustratos fosforilables endógenos del parásito.

Además en *T. gambiense*, se han detectado dos proteínas que unen específicamente AMPc en el rango micromolar (0,4 a 0,6  $\mu\text{M}$ ), denominadas I y II. Los nucleósidos y nucleótidos de adenina inhiben la unión de AMPc a II pero no a I. Estos receptores no se correlacionaron con actividad de fosfotransferasa. El tratamiento de ambas proteínas con tripsina duplicó la capacidad de unir AMPc de la proteína I, probablemente porque desenmascaró sitios específicos y en cambio, inhibió parcialmente la proteína II (54).

En *T. brucei* (50) se detectaron dos quinastas de proteínas que fosforilan fosvitina e histonas respectivamente. La primera es sensible a suramina y esta asociada a membranas, la otra actividad es mayoritaria en el soluble y se activa hasta 4 veces con 100  $\mu\text{M}$  guanosina. También en *T. brucei* (56), se encontraron dos proteínas solubles receptoras de AMPc, a y b, que eluyen a 0,05 M y 0,20 M NaCl de una cromatografía en DEAE-Sephacel. Se calculó un peso molecular aparente de 180 y 62 para a, y 130 y 65 para b, pudiendo ser dímeros y monómeros de una misma molécula. Los autores propusieron que el pico b está relacionado con la proteína II de *T. gambiense* (54) porque ambas proteínas son solubles, tienen un peso molecular aparente de 150 Kd y los análogos de adenina compiten con el AMPc por el sitio de unión. El pico a no guarda semejanzas con la proteína I de *T. gambiense*.

En epimastigotes de la cepa E.P. de *Trypanosoma cruzi*, Rangel Al-dao (55) encontró una proteína de 62 K con capacidad de unir específicamente AMPc, no asociada a actividad fosfotransferasa, que eluye a 0,21 M NaCl de una cromatografía en DEAE-celulosa. Además observó, en el mismo perfil de elución, dos actividades de quinasas de proteínas independientes del nucleótido. En trabajos posteriores, caracterizó la proteína de 62 K que es distinta de la subunidad RII de eucariotes superiores (119).

### VII.3. FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS

La regulación de los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos es función de la velocidad de su síntesis y de su degradación. La fosfodiesterasa (PDE) es la enzima que cataliza la hidrólisis del AMP cíclico o GMP cíclico a 5'AMP o 5'GMP (79, 120). La reacción es esencialmente irreversible y exotérmica, y se acompaña por una pérdida de entalpía. Esta reacción puede considerarse un *switch* termodinámico que asegura la transferencia de una señal de alta energía. La PDE ataca únicamente la unión 3' de las purinas cíclicas originando el 5'mononucleótido. Aparentemente, la hidrólisis de ambos nucleótidos ocurre por un mecanismo de desplazamiento que involucra una sustitución nucleofílica en el fosfato.

La PDE requiere un catión divalente, preferentemente  $Mg^{2+}$  y la adición de EDTA en exceso suprime toda actividad catalítica. Los iones  $Ca^{2+}$  no reemplazan al  $Mg^{2+}$  y de acuerdo a su concentración y a la preparación enzimática tienen un efecto estimulador o inhibitorio. Los grupos sulfhidrilos son importantes para mantener la integridad de los sitios catalíticos y regulatorios en la enzima. Los grupos sulfhidrilos, la interacción hidro-

## Introducción

fílica, la proteólisis limitada y el método de extracción afectan marcadamente la distribución, rendimiento y propiedades de la enzima.

Dado que la fosfodiesterasa es la única enzima que degrada nucleótidos cíclicos, su actividad celular es crítica para regular la duración e intensidad de la acción de estos nucleótidos. El potencial de la PDE como activo participante en la regulación biológica se enfatizó por el descubrimiento de un número de formas enzimáticas con distintas propiedades cinéticas. Numerosas evidencias sugieren que más que una enzima, la fosfodiesterasa es un sistema enzimático compuesto por múltiples formas moleculares (121,122,123,124,125,126,127).

Diversos autores (126,128,129) han descripto varias formas de la enzima que son interconvertibles entre sí. El equilibrio de estas formas está sujeto a modificaciones de acuerdo a la concentración de la enzima y a la concentración del AMPc. El desfasaje hacia una forma predominante afecta la actividad enzimática. En condiciones de elevada concentración de PDE predomina la forma agregada; a baja concentración, la forma disociada es favorecida. Dado que la forma disociada es la más activa, existe un mecanismo compensatorio que, a altas concentraciones de AMPc, induce la forma disociada.

Este sistema enzimático puede diferenciarse en base al: tamaño, forma, carga, localización subcelular, especificidad de sustratos, efectores endógenos, sensibilidad al calor, a cationes y a fármacos, ontogenia y diferencias antigénicas. A pesar de los muchos trabajos realizados, no se comprende aún las interrelaciones entre las diferentes formas y su regulación *in vivo*.

Beavo y colaboradores (130) han clasificado estas múltiples formas en tres categorías generales: 1) PDE-sensibles a calmodulina; 2) PDE que unen GMP cíclicos; y 3) PDE con alta afinidad por AMPc asociada a membrana y posiblemente regulada por

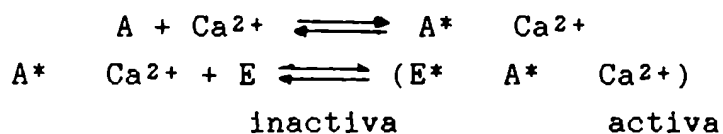
insulina. Además, se han descripto otras dos formas: PDE de GMPc activada por la luz presente en retina, y PDE extracelular presente en *Dictyostelium discoideum*, que son exclusivas de estos tipos celulares.

La actividad de las PDE puede estar afectada por: cambios inmediatos que aumentan o inhiben la actividad existente, agentes químicos que modifican la actividad de la enzima o cambios lentos que inducen la síntesis de nuevas moléculas (131).

### VII.3.A. Fosfodiesterasas dependientes de calmodulina

Durante la purificación de la PDE se observó la pérdida de la actividad enzimática, probablemente por disociación de un activador. Trabajando con cerebro bovino, Cheung (132) y, posteriormente Kakiuchi y Yamasaki (133) en cerebro de rata y Wang y Teo (134) en corazón bovino, demostraron la existencia de una proteína soluble, acídica, termoestable, que en la forma activa une  $Ca^{2+}$  formando un complejo  $Ca^{2+}$ -activador que estimula por lo menos diez veces la actividad basal de la PDE. Posteriormente, se describieron otras enzimas reguladas por este activador.

El mecanismo de activación propuesto es el siguiente:



en el que el complejo  $A^* \quad Ca^{2+}$  induce un cambio conformacional en la enzima que disminuye la estabilidad térmica de ésta. Aparentemente, la enzima une 2 moles del complejo  $A^* \quad Ca^{2+}$  (135).



## Introducción

El activador está presente en todos los tejidos de vertebrados, en varios invertebrados y en eucariotes inferiores. Constituye el 1 al 2% de la proteína soluble de cerebro, estando en exceso respecto de la PDE por lo cual el factor limitante de la activación lo constituye el  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular.

Dado que la proteína activadora une  $\text{Ca}^{2+}$  y regula múltiples y diversos procesos celulares, Cheung (136) propuso denominarla calmodulina.

Aparentemente, existen por lo menos tres formas de PDE dependientes de calmodulina que difieren en peso molecular y en especificidad de sustrato:

### 1 y 2) PDE de corazón y cerebro

Las enzimas solubles de cerebro y corazón han sido purificadas a homogeneidad (135,137,138,139), anticuerpos contra la enzima de corazón inmunoprecipitan la enzima de cerebro. Ambas enzimas difieren en peso molecular, siendo mayor la de cerebro de 61 K respecto de la de corazón que es de 59 K. Diversas evidencias sugieren que estas enzimas existen como dímeros en solución con un peso aparente de 120 K.

Ambas enzimas son activadas en forma reversible por calmodulina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . La máxima activación se logra con la unión de 2 moles de calmodulina por cada dímero de enzima. En condiciones de proteólisis limitada con quimiotripsina o cisteína-L, la enzima se independiza del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina y permanece irreversiblemente activada (140).

La enzima cataliza la hidrólisis de AMPc y GMPc con un  $K_m$  de 10  $\mu\text{M}$  para el GMPc y 200  $\mu\text{M}$  para el AMPc. La  $V_{m\acute{a}x}$  es alta en ambos casos, y la activación por  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina aumenta la  $V_{m\acute{a}x}$  de la PDE sin modificar el  $K_m$ . Se observó que la hidrólisis del AMPc es inhibida en forma competitiva por el GMPc, y vi-

ceversa, lo que sugiere que un mismo sitio catalítico está involucrado en la hidrólisis de ambos sustratos (130). En un gráfico de Lineweaver-Burke, la enzima se comporta linealmente.

Se demostró *in vitro* que la enzima de cerebro es un buen sustrato de la quinasa dependiente de AMPc, la enzima se fosforila a la misma velocidad que las histonas e incorpora 2 moles de fosfato por mol de enzima. La fosforilación no modifica la actividad enzimática y no se ha demostrado que ocurra en la célula intacta (139).

La activación de la enzima se inhibe por agentes quelantes de  $Ca^{2+}$  (EGTA), y por drogas psicotrópicas derivadas de la fenotiazina (TFP, clorpromazina, flufenazina). Estas drogas tienen gran afinidad por la calmodulina con la cual interaccionan bloqueando la activación. Estos agentes no afectan la actividad de la enzima proteolizada (131).

### 3) PDE de bajo Km dependiente de calmodulina

Es una PDE con alta afinidad por el AMPc que ha sido descrita en membranas de hígado y en músculo cardíaco de pollo. No reacciona con anticuerpos monoclonales contra la enzima de corazón o cerebro. No ha sido purificada y no se conoce si la activación por la calmodulina es directa o mediada por un proceso calmodulina-dependiente (142,143).

### VII.3.B. PDE que unen GMPc

Existen tres isoenzimas que unen GMPc con alta afinidad y que difieren en propiedades cinéticas, regulatorias y físicas. Su distribución es variada, algunas de ellas son específicas para un cierto número de tejidos. Todas contienen un sitio de unión al GMPc que es diferente al sitio catalítico. Se las clasificó en:

### 1) PDE estimable por GMPc

Se ha purificado a homogeneidad la PDE de glándula adrenal y de corazón. Esta enzima representa el 80% de la actividad de PDE en estos órganos. En condiciones de electroforesis disociantes, se observa un solo péptido de 105 K y en ausencia de SDS hay una banda de 240 K. En gradientes de sacarosa se determinó un coeficiente friccional de 1,6 y un  $S_{20,w} = 8,8$  (130).

La enzima pura cataliza la hidrólisis de AMPc y GMPc, tiene mayor afinidad por el GMPc pero la  $V_{máx}$  es idéntica para ambos sustratos. En condiciones de concentración subsaturante de ambos nucleótidos, el GMPc estimula la hidrólisis del AMPc, actuando como un activador alostérico de la enzima. En concentraciones micromolares de sustrato (AMPc) y del efector (GMPc), la hidrólisis del AMPc se estimula 50 a 80 veces y en concentraciones fisiológicas de ambos la estimulación es de 5 veces.

Existen dos tipos de sitios en la enzima: los sitios para el sustrato o catalíticos, que unen AMPc o GMPc con cooperatividad positiva (coeficiente de Hill=1,25 para GMPc y 1,9 para el AMPc) y un sitio específico para el GMPc o alostérico. Cuando se ocupa el sitio del GMPc, disminuye la cooperatividad entre los sitios de sustratos y se hidroliza AMPc más rápidamente. A altas concentraciones, el GMPc actúa como un inhibidor competitivo de la hidrólisis del AMPc.

Se obtuvieron anticuerpos anti "PDE-estimable por GMPc", que no dieron reacción cruzada con otras fosfodiesterasas. Esta enzima, a diferencia de las otras, se inactiva por proteólisis con quimotripsina. En presencia de GMPc, la proteólisis se acelera. Aparentemente, la interacción con el nucleótido modifica la conformación de la enzima; concomitantemente, hay un aumento en la actividad y una mayor susceptibilidad al ataque proteolítico.

co en el dominio catalítico. El GMPc acelera la proteólisis de la PDE en ausencia de  $Mg^{2+}$  y no se hidroliza en estas condiciones. El  $Mg^{2+}$  se requiere para la hidrólisis del nucleótido pero no está involucrado en las interacciones enzima-efector alostérico (144).

### 2) PDE de plaquetas y pulmón

En plaquetas, la PDE "que une GMPc" es el receptor mayoritario del nucleótido en la célula. No se conoce mucho de esta forma enzimática, salvo que el sitio para el GMPc difiere del sitio catalítico. Aparentemente, existe una interacción alostérica entre la región catalítica y la región de alta afinidad por el GMPc. En particular, varios inhibidores competitivos de la enzima, aumentan la afinidad por el GMPc. Se cree que la enzima es específica para la hidrólisis de GMPc, ya que prácticamente no se detectó hidrólisis de AMPc (145).

En pulmón, los receptores intracelulares del GMPc son la quinasa de proteínas dependiente de GMPc y la PDE "que une GMPc"; ambas unen cantidades equivalentes del nucleótido, en presencia de EDTA y MIX. Aparentemente, es idéntica a la enzima de plaquetas, está presente en grandes cantidades y tiene una muy baja  $V_{máx}$  y muy alta afinidad ( $4 \mu M$  para GMPc)(146).

### 3) PDE de GMPc estimulable por luz

Esta enzima está presente en los bastones de la retina. La actividad de esta PDE está controlada por la rodopsina. La rodopsina activada por la luz estimula la actividad de la PDE, a través de un mecanismo análogo a la activación hormonal de la adenilato ciclase. El GTP y la transducina (proteína que une GTP) son requisitos para la activación de la PDE.

La transducina es una GTPasa activable por luz, compuesta por dos polipéptidos de 39K y 36K, y por una subunidad menor de 10K. Aparentemente, la rodopsina activada induce la formación del complejo transducina-GTP, paso que requiere la presencia de la subunidad 10K. La opsina-quinasa cataliza la fosforilación de la rodopsina inhibiendo la activación de la misma.

Se ha purificado a homogeneidad la PDE de retina de anfibios y bovinos. La enzima purificada de rana migra como un doblete de 108-110K, mientras que en bovinos el doblete es de 84-88 K. Además, existe una tercera subunidad de 20K que inhibe la actividad de la PDE y le confiere sensibilidad al GTP en la reacción de activación. La subunidad de 20K es sensible a tripsina y su proteólisis es responsable de la activación de la enzima.

La PDE de retina une GMPC con alta afinidad en un sitio distinto del catalítico, que es similar al de la enzima de corazón y pulmón. La enzima hidroliza únicamente GMPC y es muy poco eficiente en la hidrólisis del AMPc (147).

### VII.3.C. PDE de AMPc asociada a membranas

También se la denomina PDE "de bajo Km". Tiene marcada preferencia por el AMPc ( $K_m = 10^{-7}$ - $10^{-8}M$ ), aunque puede hidrolizar GMPC menos eficientemente ( $K_m = 200 \mu M$ ). Está distribuida en todos los tejidos de mamíferos y se localiza en membranas o asociada a la fracción particulada. El tratamiento con tritón o choque osmótico libera parcialmente la actividad enzimática y por sonicación se solubiliza el 90% (121). No es sensible a proteínas activadoras, pero responde a algunas hormonas y se estimula frente a niveles elevados de sustrato.

En gráficos de Lineweaver-Burke, presenta curvas anómalas que pueden deberse a: múltiples enzimas con distinta afinidad por el sustrato; una enzima con múltiples sitios con coopera-

tividad negativa o una enzima que se agrega en diferentes formas con distinta afinidad por el sustrato.

La actividad de la PDE "de bajo Km" se regula por la concentración del sustrato en forma cooperativa negativa (coeficiente de Hill = 0,2-0,5). La unión del AMPc al primer sitio induce un cambio conformacional en la enzima, que disminuye la afinidad por el nucleótido en el segundo sitio. Se ha sugerido que este mecanismo permite que exista una elevación transiente de los niveles de AMPc, suficiente para activar la quinasa dependiente del nucleótido. Una enzima con cooperatividad positiva o con cinética Michaeliana, hidrolizaría el nucleótido a una velocidad tal que esta elevación no ocurriría; en cambio, una enzima con cooperatividad negativa podría amortiguar la hidrólisis del AMPc (148).

Existen por lo menos dos subclases de la "PDE de bajo Km", que se diferencian en base a sus propiedades fisiológicas, químicas y a su sensibilidad a inhibidores específicos. Una subclase es sensible a la inhibición por rolipram y Ro 20-1724; la otra, es sensible a GMPc, cilostamida y otros derivados de OPC.

Esta última subclase está presente en corazón, tejido adiposo, plaquetas y en adipocitos 3T3-L1, hepatocitos de rata y retículo sarcoplasmático de corazón de perro. La incubación de adipocitos o hepatocitos con insulina (que disminuye los niveles de AMPc) o con isoproterenol (que aumentan los niveles de AMPc) activan la PDE, sensible a GMPc asociada a membrana, elevando la  $V_{m\acute{a}x}$  de la enzima (149). Una misma forma enzimática está involucrada en ambas situaciones. La acción de la insulina es indirecta a través de un componente intermediario (150). El aumento de PDE asociado al aumento de los niveles de AMPc ocurre por un mecanismo rápido que no involucra síntesis proteica y por una vía más lenta que es dependiente de la síntesis *de novo*. Aparentemente, la función de esta enzima está relacionada con la regulación de la lipólisis y con la acción antilipolítica de la insulina.

En membranas de hígado existe una PDE de bajo  $K_m$  activable por insulina que se fosforila. La fosforilación es catalizada por una quinasa dependiente de AMPc y aumenta la  $V_{máx}$  de la enzima. En la línea S49 de linfoma de ratón, que tiene mutada la quinasa, no hay aumento de PDE debido a insulina. Apparentemente, existe un acoplamiento entre la actividad de la enzima y la fosforilación (130).

### VII.3.D. Otras PDE de nucleótidos 3'-5'

En la línea S49 de linfoma de ratón existe una actividad mayoritaria de PDE de GMPc con alta afinidad por el nucleótido ( $K_m = 40$  nM); también hidroliza cAMP ( $K_m = 100$  nM). Por marcación con [ $^{32}P$ ]-GMPc y fotólisis se detectó un polipéptido de 106 K. En células normales o en células S49 tratadas con MIX no hay marcación. Probablemente, esta PDE es el resultado de un producto génico alterado o de la expresión de un gen que normalmente no se transcribe. Fenotípicamente, estas células son resistentes a agentes que elevan la concentración intracelular de AMPc (130).

### VII.3.E. PDE no específicas

Existe una PDE de intestino que hidroliza AMPc y también RNA, ATP, ADP, NAD y 4-nitrofenil fosfonato. En un paso intermedio de la reacción de hidrólisis, el 5'AMP está unido covalentemente a la enzima (151).

En hígado existe una PDE que hidroliza nucleótidos cíclicos 3'-5' y 2'-3'. También hidroliza CMPc con eficiencia (152).

### VII.4.1. Inhibidores de PDE

Las distintas formas enzimáticas de PDE difieren en cuanto a: la especificidad de sustratos, los moduladores (ya sean  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina o GMPc) y la sensibilidad a fármacos. A continuación se detallan las drogas que afectan la actividad de estas enzimas:

a) Metilxantinas: Desde 1962, se conoce la capacidad de estas drogas de inhibir la fosfodiesterasa (120). Cafeína, teofilina, teobronina y aminofilina son usadas corrientemente, y se ha comprobado que, fisiológicamente, inhiben la PDE. Estas drogas también afectan el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ , la depleción de ATP, la síntesis de proteínas, el consumo de oxígeno, el ritmo cardíaco y las secreciones endócrinas.

Ensayos *in vitro* con teofilina a concentraciones milimolares de AMPc indican que este compuesto es un inhibidor competitivo de la enzima de alto  $K_m$  y posteriormente se observó que también inhibe la PDE de bajo  $K_m$ .

Las xantinas mimetizan la molécula de AMPc y compiten con ésta por el sitio activo. Se correlacionó la capacidad inhibitoria de la droga con sustituciones no polares en las posiciones 1 y 3 del anillo de las xantinas y con cadenas laterales en la posición 8, pero no con modificaciones en la posición 7-N (148).

b) Puromicina: Este antibiótico, que contiene una purina, es un efectivo inhibidor competitivo de la PDE de AMPc de diafragma de rata. A altas concentraciones de AMPc actúa competitivamente, pero por debajo del  $K_m$  de la enzima de alta afinidad es un sustrato no competitivo. Esto sugirió que la PDE de bajo  $K_m$  podría tener un sitio regulatorio (148).



c) Benzil-2-imidazolinones: Ro 7-2956 y Ro 20-1724 son compuestos con actividad lipolítica e hipotensora, pero no existe correlación directa entre su potencia farmacológica y la inhibición de la PDE. Por la naturaleza de estos inhibidores, se sugiere que existe una región hidrofóbica en el sitio activo de la PDE (148, 149).

d) Papaverina: Es un alcaloide opiáceo que actúa como relajante muscular. Es un potente inhibidor de la PDE de músculo. Inhibe competitivamente la PDE de alto y bajo Km. El Ki es  $10^{-5}$ , pero debe estar presente en altas concentraciones para suprimir la actividad enzimática completamente.

La inhibición es competitiva a concentraciones de papaverina menores que  $80 \mu\text{M}$  y no competitiva a mayores concentraciones (131,148).

e) Derivados de la fenotiazina: Trifluoperazina (TFP), flufenazina, teoridazina, son drogas antidepresivas y antipsicóticas. Afectan la activación de la PDE por  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina pero no modifican la actividad basal de la enzima. Las fenotiazinas son quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , sin embargo, el agregado de  $\text{Ca}^{2+}$  no revierte la inhibición aunque la adición de calmodulina sí la revierte.

Estas drogas interaccionan con la calmodulina y no con la PDE. La unión calmodulina-fenotiazina es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , saturable y reversible. Existe una correlación directa entre la potencia antipsicótica de la droga, la especificidad por la calmodulina y la capacidad de inhibir la activación de la PDE (131, 153).

VII.4.2. Mecanismos de inhibición

Existen cuatro mecanismos de acción de los fármacos:

a) Inhibidores competitivos: son aquéllos que bloquean el acceso del sustrato al sitio activo (metilxantinas, análogos del AMPc, bajas concentraciones de papaverina).

b) Inhibidores no competitivos: son antagonistas que, a altas concentraciones, inhiben la actividad enzimática (papaverina).

c) Inhibidores alostéricos: actúan en el sitio alostérico disminuyendo la afinidad de la enzima por su sustrato.

d) Inhibidores de la activación de la enzima: actúan interfiriendo con la activación de la enzima (fenotiazinas y quelantes de  $Ca^{2+}$ ).

VII.5. SIGNIFICADO DE LAS FORMAS MÚLTIPLES

Cuando en 1971 Thompson y Appleman (121) describieron las múltiples formas moleculares de la PDE presentes en cerebro y posteriormente se detectaron en otros tejidos y líneas celulares, este sistema enzimático cobró nueva importancia. Weishaar (153) desarrolló un modelo que postula el papel de las múltiples formas moleculares de PDE en la regulación de los niveles intracelulares de AMPc y GMPc. Propuso vías alternativas para la degradación de los nucleótidos cíclicos y postula la interrelación de estas vías. Este modelo se esquematiza en la figura I.3.

Aunque no se conoce el rol de las diferentes formas de enzima en la regulación del metabolismo de los nucleótidos cíclicos, estudios recientes demostraron que estas enzimas cumplen

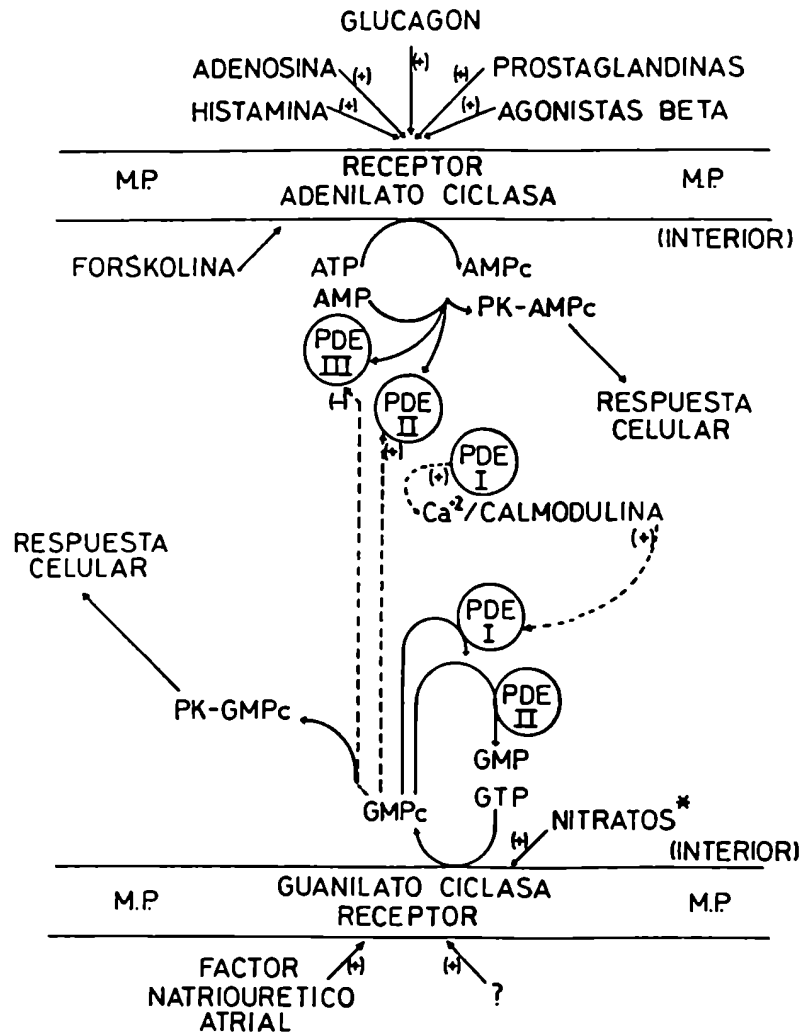


Figura I-3: Modelo de fosfodiesterasas múltiples. Weishaar (153) postula un modelo que considera la función de las múltiples formas moleculares de PDE en la regulación de los niveles intracelulares de AMPc y GMPc. Propone vías alternativas para la degradación de los nucleótidos cíclicos y una potencial interacción de las vías entre sí.

\* Los nitratos estimulan la forma soluble de la guanilato ciclasa, lo cual provoca un aumento del nivel de GMPc.

roles específicos modulando procesos metabólicos como la lipólisis, la contractilidad del miocardio y la liberación de mediadores.

Intuitivamente se creería que cada forma tiene un rol fisiológico particular y que está regulada individualmente *in vivo*, como en el caso de la PDE de la retina. Sin embargo, no se ha demostrado una regulación específica *in vivo* para la mayoría de las isozimas (130).

Las distintas formas de PDE se examinaron durante el desarrollo ontogenético de embriones de pollo (130). La forma predominante fue la enzima estimulable por  $Ca^{2+}$  que en el adulto prácticamente no existe. En cambio, en cerebro, corazón, riñón y pulmón existen las mismas PDE durante el desarrollo fetal temprano que en el adulto. Tardíamente en la gestación, una de las formas presente en hígado y pulmón se hace dependiente de  $Ca^{2+}$ .

No se descarta que, además de mantener el nivel de los nucleótidos cíclicos, las fosfodiesterasas puedan cumplir otras funciones. En 1971, Rudolph (154) y colaboradores demostraron que la hidrólisis del AMPc libera energía que podría acoplarse a otros procesos. En 1980, Goldberg (155) determinó el flujo de sustrato a través de la fosfodiesterasa obteniendo un tiempo de vida media para el AMPc de 0,3 segundos. Este flujo tan elevado y el acoplamiento de la energía de hidrólisis a otros procesos, pueden ser relevantes para la transducción de señales que modifiquen la permeabilidad de membrana.

### VII.6. FOSEODIESTERASAS EN *TRYPANOSOMAS*

Se ha descrito actividad de fosfodiesterasa en *T. gambiense* (47), *T. brucei* (50), *T. cruzi* (48,49) y en *Leishmania donovani* (51). En *T. gambiense* (47) la PDE está presente en forma

## Introducción

monomérica y tetramérica, ambas difieren en su  $K_m$  por el sustrato y el agregado de AMPc induce la forma monomérica. En otros Trypanosomas se encontró una sola forma enzimática de PDE. La enzima de *T. brucei* (50) está presente en el soluble y también unida a membrana; en cambio, en *T. cruzi* el 90% de la actividad enzimática está en forma soluble.

Hasta el momento, las fosfodiesterasas descritas son específicas para el AMPc y no hidrolizan GMPc. Se observó que la teofilina y cafeína son malos inhibidores de la enzima de *Trypanosoma cruzi*.

Gonçalvez y colaboradores (48) encontraron en *T. cruzi* una PDE que hidroliza únicamente AMPc con un  $K_m$  de 40  $\mu$ M cuya actividad no se modifica por  $Ca^{2+}$ . Además, hallaron un activador termoestable que estimula la PDE de cerebro bovino pero que no activa la PDE endógena. Este activador tiene un peso molecular más alto que el esperado para calmodulina.

## VIII. CALMODULINA

Los nucleótidos cíclicos y el  $\text{Ca}^{2+}$  son segundos mensajeros de la acción hormonal (primer mensajero) que regulan una variedad de procesos celulares en respuesta a estímulos externos. En numerosas ocasiones existe una interacción cooperativa entre el AMPc y el  $\text{Ca}^{2+}$ ; tal es el caso de la contracción muscular, el metabolismo del glucógeno, la división celular y la secreción endócrina.

La respuesta a la acción hormonal se mantiene durante minutos a horas, inclusive días; la acción del AMPc dura segundos a minutos; la del  $\text{Ca}^{2+}$  está en el orden de los milisegundos. Los tres mensajeros se complementan no sólo en la distancia que recorre la señal, sino en la intensidad y duración de la respuesta celular (136).

Los efectos del AMPc son mediados por la quinasa de proteínas dependiente del nucleótido, enzima con múltiples actividades regulatorias, ya descrita en este capítulo.

La calmodulina es otra proteína regulatoria que media la mayoría de los efectos del  $\text{Ca}^{2+}$ . Regula directa o indirectamente el metabolismo de nucleótidos cíclicos, el metabolismo del glucógeno, el flujo del  $\text{Ca}^{2+}$ , la contracción muscular, procesos de endo y exocitosis, la iniciación de la síntesis de ADN, el ensamblado y desensamblado de microtúbulos, la división, adhesividad y motilidad celular (156).

En 1970 fue descubierta por Cheung (132) como una proteína activadora de la PDE de nucleótidos cíclicos de cerebro bovino. Casi paralelamente, Kakiuchi y Yamasaki (133) descubrieron el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en el proceso de activación de la enzima. Posteriormente, Teo y Wang (134) describieron la relación entre el  $\text{Ca}^{2+}$  y la calmodulina y observaron que el verdadero activador era el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina. Pronto se demostró que además de la PDE, otras enzimas se activaban por este complejo (156).

La calmodulina está ampliamente distribuida y no es específica de tejidos o especies. Está presente en todos los tejidos de vertebrados, siendo mayor su concentración en testículo y cerebro. En invertebrados, se la encontró en los phyla Porifera, Echinoderma, Cnidaria, Nematelminthes, Mollusca, Annelida y Arthropoda. También se la halló en Protozoa, en plantas superiores y en semillas, en algas, musgos y en hongos.

### VIII.1. CARACTERÍSTICAS DE LA CALMODULINA DE VERTEBRADOS

Es una proteína pequeña, globular, ácida y termoes- table de 16,8 K. Es multivalente, posee 4 sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  (2 de alta afinidad,  $K_m=3 \mu\text{M}$ , y 2 de baja afinidad,  $K_m=18 \mu\text{M}$ ), y un sitio de unión a proteínas. En la célula está presente en el soluble y en la fracción particulada en proporciones variables. En presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , el 42% de la calmodulina está asociada a membranas.

Es un monómero de 148 aminoácidos, cuya secuencia se ha conservado casi perfectamente a lo largo de la evolución. Tiene una alanina acetilada en el N-terminal y una lisina en el C-terminal. Por hidrólisis ácida se determinó el contenido amino- ácido de la molécula, el 30% de los residuos son ácido aspártico (24) o glutámico (30), a los que debe su bajo punto isoeléctrico ( $pI=4,3$ ).

Además, contiene una relación treonina:serina (12:4) elevada, una única histidina, y un aminoácido raro,  $\epsilon$ -trimetil-- lisina en posición 115. Carece de triptofano, cisteína o hidroxipro- lina, lo que le permite asumir una estructura terciaria flexi- ble para interactuar con otras proteínas. La ausencia de tripto- fano junto a una elevada relación fenilalanina-tirosina (8:2), le confiere un espectro característico al U.V., con cinco picos a 253, 259, 265, 269, y 277 nm y un hombro a 282 nm. La relación 280:260 nm es igual a 1 (136,157,158).

## Introducción

Por dicroísmo circular, se determinó el contenido de  $\alpha$ -hélices de la calmodulina. En ausencia y en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , el  $\theta_{222m}$  es de  $-12.000$  y  $-15.000m$  respectivamente, lo cual corresponde a un 39% y 57% de  $\alpha$  hélices. Al unirse, el  $\text{Ca}^{2+}$  induce un cambio conformacional en la molécula aumentando la helicidad de la misma, lo que le permite interactuar con otras proteínas (159).

Además, el  $\text{Ca}^{2+}$  modifica la fluorescencia de las tirosinas, el espectro de U.V., la reactividad de ciertos aminoácidos, disminuye el radio de Stokes, aumenta el coeficiente de sedimentación y aumenta la resistencia a la proteólisis. La calmodulina se transforma de una estructura poco ordenada en una compacta, ordenada y estable. Existen por lo menos dos transiciones conformacionales, la unión de 2  $\text{Ca}^{2+}$  induce el 80% del cambio; la segunda transición ocurre cuando 3 de los 4 sitios, o todos, están ocupados. La calmodulina puede existir en distintas formas, de acuerdo al número de  $\text{Ca}^{2+}$  unidos. Existen 16 estados conformacionales posibles, y cada uno de ellos puede ser reconocido por una proteína determinada o por un grupo de proteínas. De este modo, la molécula podría traducir una diferencia cuantitativa en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una diferencia cualitativa en la respuesta celular (158).

El tratamiento con agentes químicos que afecten histidinas, tirosinas o argininas no altera la actividad biológica de la calmodulina; sin embargo, la modificación de lisinas, metioninas o grupos carboxilos, le impide que active otras proteínas.

La carboximetilación de los residuos metionina 71, 72, 76 y 109 impide la interacción de la PDE con la calmodulina sin alterar la capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$  ni la estructura secundaria de la molécula. Agentes químicos que modifiquen la carga positiva de la lisina 75 evitan la activación de la PDE y la interacción



de la calmodulina con drogas fenotiazínicas (157,160). Alteraciones de los grupos carboxilos disminuyen la helicidad de la molécula por lo cual ésta carece de la conformación adecuada para complejarse con la apoenzima correspondiente (161).

Por proteólisis limitada, en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , la calmodulina se cliva entre los aminoácidos lisina 77 y aspártico 78. En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se obtienen cuatro fragmentos: I (1-160), II (107-148), III (1-90), y IV (90-148). Los péptidos tripticos no conservan la actividad biológica, sino que se requiere la integridad de la molécula (162,163).

### VIII.2. ESTRUCTURA DE LA CALMODULINA

La calmodulina es una proteína con alta homología interna, que posee 4 sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$ . La mayor homología existe entre los dominios 1 y 3 con 18 aminoácidos idénticos y 6 conservados y entre los dominios 2 y 4 con 14 aminoácidos idénticos y 11 conservados, lo que sugiere que la molécula actual surgió por dos duplicaciones sucesivas derivadas de un gen primordial que codificaba para el dominio del  $\text{Ca}^{2+}$ . Se aisló calmodulina de testículo de rata y se estudió su estructura cristalina. La molécula tiene un largo de 65 Å, está formada por dos lóbulos de 25x20x20 Å conectados por 7  $\alpha$ -hélices. Cada lóbulo contiene dos sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$ , y ambas mitades de la molécula son muy semejantes (161).

Las 7  $\alpha$ -hélices, I a VII abarcan los siguientes aminoácidos: I: 7 a 19; II: 29 a 39; III: 46 a 55; IV: 65 a 92; V: 102 a 112; VI: 119 a 128; y VII: 138 a 148. Los cuatro dominios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  tienen una conformación "hélice-loop-hélice", denominada "mano E-F" por Kretsinger (164), en la que 6 a 8 átomos de  $\text{O}_2$  forman una cavidad capaz de albergar un catión con el radio del  $\text{Ca}^{2+}$  (0,099 nm). Esta característica permite que la

proteína una  $\text{Ca}^{2+}$  reversible y selectivamente en presencia de concentraciones milimolares de  $\text{Mg}^{2+}$  (radio=0.065nm). Cada *loop* está flanqueado por dos  $\alpha$ -hélices perpendiculares entre sí. En la figura I.4. se esquematiza la estructura de la mano E-F.

Los segmentos que unen  $\text{Ca}^{2+}$  involucran los aminoácidos 20 a 31; 56 a 67; 93 a 104; y 129 a 140. Todos ellos se componen de 12 aminoácidos; los primeros 9 forman el *loop* y los 3 últimos el inicio de la segunda hélice del dominio "hélice-*loop*-hélice". El  $\text{Ca}^{2+}$  se une cerca del N-terminal del dominio, y la segunda hélice orienta los últimos aminoácidos del segmento que une el  $\text{Ca}^{2+}$ , para que puedan participar en la coordinación del  $\text{Ca}^{2+}$ . En la figura I.5 se esquematiza la estructura primaria de la calmodulina.

La molécula está estabilizada por múltiples interacciones entre las hélices; existen puentes de hidrógeno entre los *loops* adyacentes en cada mitad de la molécula. Los residuos 25 a 29 son antiparalelos a los residuos 61 a 65, y están unidos por puentes de hidrógeno entre la glicina 25 y el aspártico 64 y entre la isoleucina 27 y la treonina 62. En la segunda mitad de la molécula, los residuos 99 a 101 y 135 a 137 son antiparalelos y están estabilizados por uniones hidrógeno entre la isoleucina 100 y la valina 136. Los dominios del  $\text{Ca}^{2+}$  están unidos por segmentos ligantes compuestos por 6 residuos.

A cada mitad de la molécula se unen 2  $\text{Ca}^{2+}$  que están separados por 11,3 Å y están coordinados a oxígenos de la cadena troncal y de las laterales. Se ha sugerido que los sitios 3 y 4 son los de alta afinidad. La calmodulina contiene dos tirosinas, 99 y 138, que están en los dominios 3 y 4, respectivamente. La tirosina 99 es accesible y está en el *loop*, e interactúa únicamente con aminoácidos del dominio 3. La tirosina 138 está en un bolsillo hidrofóbico en contacto con la fenilalanina 89 de la hélice IV, y la fenilalanina 141 de la hélice VII, interactuando con los dominios 3 y 4 (161).

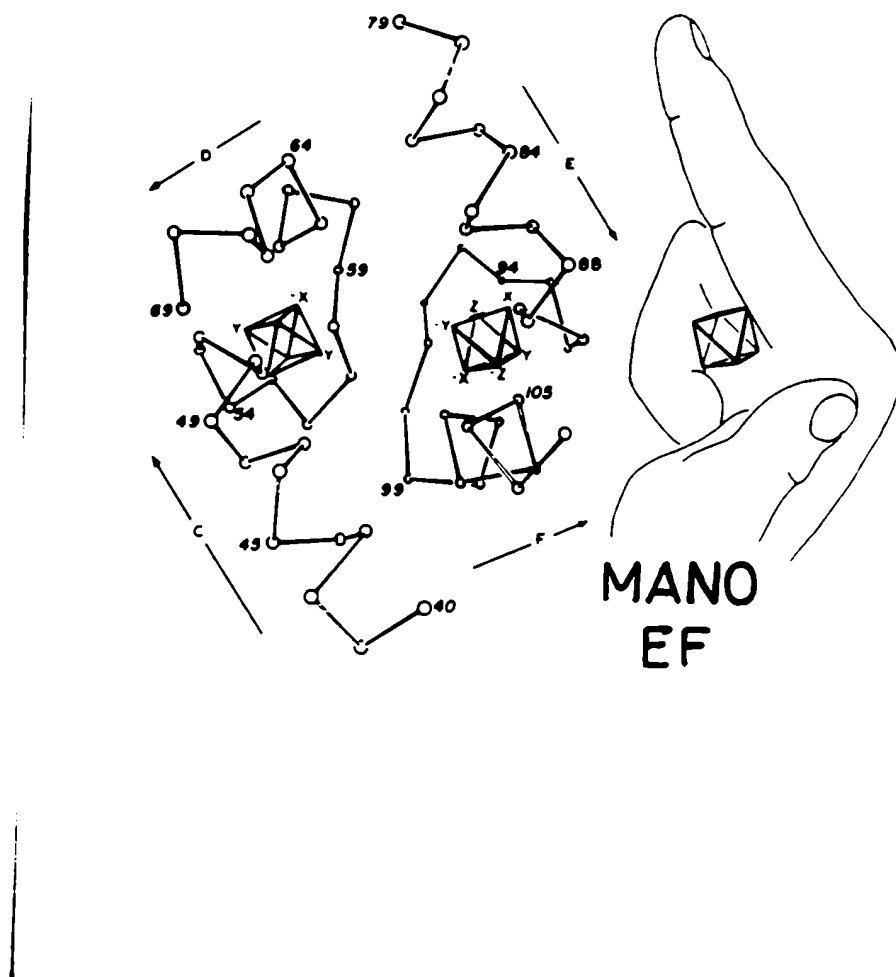


Figura I-4: Estructura del sitio de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  en la parvalbúmina. En este esquema, el  $\text{Ca}^{2+}$  está indicado por un octaedro que se contacta con 6 átomos de oxígeno (uno en cada vértice), denominados  $x, y, z, -x, -y, -z$ . La estructura "hélice-loop-hélice" está representada por una mano, en la cual el dedo índice es una de las  $\alpha$ -hélices que está en el plano de la figura; los dedos restantes son el loop que contiene al sitio del  $\text{Ca}^{2+}$ , y el pulgar es la segunda  $\alpha$ -hélice que está perpendicular al plano de la figura. Este esquema es copia del publicado por Kretsinger (164).



Se observó que la tirosina 99 no es esencial para unir  $\text{Ca}^{2+}$ , porque está reemplazada por una fenilalanina en espina-ca y una leucina en *Tetrahymena*. La trimetil-lisina presente entre las hélices V y VI es una modificación post-traducciona, cuya función es desconocida y no está presente en la calmodulina de invertebrados (165,166).

La hélice IV que es la más larga y conecta los dominios 2 y 3, parece ser la columna vertebral de la molécula, puede tener un rol en la unión cooperativa del  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando la calmodulina está unida al  $\text{Ca}^{2+}$ , esta hélice está expuesta; en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , está oculta. Los residuos de esta hélice cumplen un papel importante en la interacción de la calmodulina con proteínas receptoras o con drogas fenotiazínicas (161).

### VIII.3. HOMOLOGIA ENTRE CALMODULINA Y OTRAS PROTEINAS

La calmodulina es el miembro más antiguo de una familia de proteínas pequeñas, acídicas, con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$  (167). Está presente en todos los eucariotes y es polifuncional. Las otras proteínas son exclusivas de vertebrados, están presentes en algunos tejidos, y su función es específica y limitada (168).

Las otras proteínas que componen esta familia son: troponina C, parvalbúmina, proteína que une  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de vitamina D; proteína que une  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de vitamina K; acuorina, espasmina, calsequestrina y proteína del S100 (136).

La troponina C interviene en la contracción muscular. El  $\text{Ca}^{2+}$  regula la contracción mediante un mecanismo alostérico, en el que la señal se transmite secuencialmente del  $\text{Ca}^{2+}$  a la troponina, de ésta a la tropomiosina, luego a la actina y, finalmente, a la miosina. La calmodulina puede reemplazar a la troponina C pero es menos eficiente (169).

A diferencia de la calmodulina, posee una histidina en lugar de la trimetil-lisina; tiene dos sitios específicos para  $\text{Ca}^{2+}$  y dos que también unen  $\text{Mg}^{2+}$  y es mayor por 1 kb. Se alinearon ambas secuencias, el 50% de los aminoácidos son idénticos y muchas de las sustituciones son conservativas, lo que representa una homología del 77%. La calmodulina tiene 7 aminoácidos menos en el N-terminal, uno menos en el C-terminal, y un *gap* de 3 aminoácidos ubicado en las posiciones 88 a 90 de la troponina C. También posee una hélice central pero en el dominio C-terminal tiene 2  $\text{Ca}^{2+}$  unidos, y ninguno en el N-terminal (168,170).

La parvalbúmina se encuentra en concentraciones milimolares en músculo esquelético de vertebrados inferiores y de mamíferos. Tiene un peso molecular de 12 K, y presenta 6  $\alpha$ -hélices (A a F) unidas por *loops*. Únicamente los dominios C-D y E-F unen  $\text{Ca}^{2+}$ . La unidad básica de la evolución del dominio del  $\text{Ca}^{2+}$  es la estructura del fragmento E-F. Durante la evolución, la parvalbúmina perdió el dominio I (157).

La proteína dependiente de vitamina D tiene una función en la traslocación del  $\text{Ca}^{2+}$  en el intestino y la proteína dependiente de vitamina K se requiere para la conversión post-traducciona de la protrombina a la forma plasmática que une  $\text{Ca}^{2+}$  en los microsomas de hígado (136).

Todas las proteínas de esta familia tienen muy conservada la región de unión al  $\text{Ca}^{2+}$ , unidad compuesta por dos hélices que forman un corazón hidrofóbico y un *loop* que une el  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### VIII.4. MECANISMO DE ACCION DE LA CALMODULINA

La calmodulina regula una gran variedad de procesos celulares, ya sea directamente, por asociación a la enzima en cuestión, o indirectamente activando una quinasa dependiente que

desencadena una cascada metabólica. En todos los casos se requiere  $\text{Ca}^{2+}$  para formar el complejo activo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina.

La concentración intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  está en el orden de  $10^{-8}$  M y a raíz de un estímulo externo puede elevarse a  $10^{-6}$  M en forma transiente. Este aumento es suficiente para formar el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina y gatillar la respuesta celular. Este complejo activo se une a la enzima, en un dominio determinado que posiblemente sea común en todas y modifica la conformación de ésta de tal modo que el sitio activo esté más accesible. La activación por calmodulina es estequiométrica y reversible (168).

### VIII.5. PROCESOS REGULADOS POR CALMODULINA

#### a) Metabolismo de nucleótidos cíclicos

En glándula adrenal y en cerebro, la calmodulina activa la adenilato ciclasa y la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos; de este modo, regula tanto la síntesis como la degradación del AMPc.

A bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , cuando únicamente están ocupados los sitios de alta afinidad, la calmodulina activa la adenilato ciclasa; a altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , estando todos los sitios ocupados, inhibe la adenilato ciclasa y activa la PDE.

En condiciones fisiológicas, la PDE tiene mayor afinidad por el GMPc que por el AMPc. En un primer momento, hidroliza GMPc, con lo que la relación AMPc:GMPc aumenta. Cuando el primero alcanza una concentración elevada, induce su propia degradación al estimular la PDE. Por un mecanismo concertado, la calmodulina permite una elevación transiente del AMPc (136, 157, 168, 171).

### b) Flujo de $\text{Ca}^{2+}$

La calmodulina media los efectos del  $\text{Ca}^{2+}$  y también regula su propia actividad al controlar los niveles del  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular. Esto se logra activando las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en membrana plasmática de eritrocitos y en el retículo sarcoplasmático que eliminan el  $\text{Ca}^{2+}$  en exceso.

La calmodulina se asocia a la ATPasa de ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) en un complejo 1:1, aumenta diez veces la velocidad máxima de la enzima y disminuye el  $K_m$  a la mitad. La ATPasa activada regula el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el exterior.

En microsomas cardíacos, el retículo sarcoplasmático secuestra  $\text{Ca}^{2+}$  con una bomba que está relacionada con la ATPasa de ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ). Esta enzima se activa por la fosforilación, dependiente de AMPc y de  $\text{Ca}^{2+}$ , de una proteína de membrana de 22 K denominada fosfolamban. Posiblemente, esta fosforilación está catalizada por una quinasa dependiente de calmodulina, semejante a la fosforilasa quinasa. En ambos casos, el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico disminuye (136,157,168,171).

### c) Metabolismo del glucógeno

En músculo esquelético, el 40% de la calmodulina es parte integral de la fosforilasa quinasa, enzima que cataliza la degradación del glucógeno.

La fosforilasa quinasa está compuesta por 16 subunidades con una estructura ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ );  $\delta$  es idéntica a calmodulina. La enzima es completamente dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  para su actividad, pero también puede regularse por calmodulina exógena. La enzima fosforila la fosforilasa b, activándola y la glucógeno sintetasa inhibiéndola; de este modo, existe una regulación metabólica coordinada que activa la glucógenolisis e inhibe la síntesis del glucógeno.



Lo mismo ocurre en hígado, pero regulada por la quinasa de proteínas dependiente de AMPc (157,168,171,172,173).

### d) Contracción en células de músculo liso

La quinasa de la cadena liviana de la miosina (MLCK) está formada por dos subunidades, un polipéptido de 125 K que es la apoenzima, y una subunidad regulatoria pequeña idéntica a calmodulina. Esta enzima se activa en presencia de  $Ca^{2+}$  y fosforila un residuo de la cadena liviana de la miosina con lo que activa la ATPasa de la actomiosina y produce la contracción a expensas de la hidrólisis del ATP (174).

### e) Procesos de endo y exocitosis

Cuando aumenta la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  en el tejido secretor, se produce la liberación de productos de secreción almacenados en vesículas subcelulares por fusión de la membrana de las vesículas con la membrana plasmática. En glándula adrenal, Creutz y colaboradores (175) aislaron una proteína de 47 K que produce la agregación de gránulos de adrenalina en presencia de  $Ca^{2+}$ .

Posteriormente, en sinaptosomas, se describió (176) la fosforilación  $Ca^{2+}$ -dependiente de proteínas específicas. La quinasa de proteínas dependiente de calmodulina tipo 1 fosforila dos proteínas neuronales, sinapsina I y la proteína III, que están presentes en vesículas pre y postsinápticas. El efecto del  $Ca^{2+}$  es mediado a través de la fosforilación de proteínas específicas de membrana que están involucradas en funciones pre-sinápticas, tales como la liberación de neurotransmisores (177). La difenilhidantoína, droga que inhibe la secreción de norepinefrina, también inhibe la fosforilación  $Ca^{2+}$  dependiente.

En otras membranas obtenidas de bazo, pulmón, músculo esquelético y cardíaco, glándula adrenal y conducto deferente, se demostró fosforilación de proteínas endógenas, dependiente de calmodulina. Dado que cada tejido tiene un perfil electroforético determinado de proteínas fosforiladas, se sugiere que las actividades tejido específico de la calmodulina pueden estar definidas por la distribución de las proteínas endógenas que son sustrato de la quinasa dependiente de calmodulina (157,171).

### f) Ensamblado y desensamblado de microtúbulos

Los microtúbulos se relacionan con procesos celulares asociados a la motilidad; están involucrados en la movilidad de cromosomas, la extensión de dendritas y el transporte axónico. Muchas de estas funciones dependen de la capacidad de estas organelas de ensamblarse y desensamblarse. La localización conjunta de la tubulina y calmodulina durante la mitosis, junto con evidencias previas sobre el efecto inhibitor del  $Ca^{2+}$  en la polimerización de microtúbulos sugieren que la calmodulina regula su ensamblado y desensamblado (178).

Estudios con células transformadas en crecimiento exponencial, han demostrado que la calmodulina duplica su concentración durante la fase  $G_1$  tardía. La concentración de la calmodulina está acoplada a la transición  $G_1$ -S del ciclo celular. El tratamiento de células CHO-14 con drogas anticalmodulina, W13 y W7, inhibe la progresión del ciclo. En  $G_1$ , la célula puede entrar en fase S y dividirse o puede entrar en un período quiescente. Se requiere una concentración crítica de calmodulina para que la célula entre en fase S (179,180).

Estudios recientes (158,171) han asociado el complejo de microtúbulos con la iniciación de la síntesis de ADN. Drogas despolimerizantes son capaces de estimular células quiescentes,

en modo similar a los factores de crecimiento, para que éstas inicien la síntesis de ADN. La calmodulina regula la despolimerización de microtúbulos a dos niveles: directamente, asociándose a la tubulina en una relación 2 a 1 e, indirectamente, porque aumenta la concentración de dímeros de tubulina y éstos inhiben su propia síntesis. La calmodulina cumple un rol dual: al disminuir la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  favorece el ensamblado de microtúbulos; al aumentar su propia concentración favorece la despolimerización.

### VIII.6. CRITERIOS PARA DETERMINAR SI UNA REACCION ES REGULADA POR CALMODULINA

Estos criterios son los señalados por Cheung para caracterizar enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (136).

1. El tejido o la célula debe contener una concentración suficiente de calmodulina.
2. La depleción de calmodulina debe modificar la actividad enzimática. El sistema depletado debe responder al agregado de calmodulina exógena.
3. Quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  (EGTA) deben revertir la activación de una enzima dependiente de calmodulina.
4. En presencia de drogas derivadas de la fenotiazina, la calmodulina se vuelve biológicamente inactiva. Estas drogas inhiben la activación de la enzima, pero no la actividad basal de la misma.

5. La acción de la calmodulina debe revertirse total o parcialmente por su anticuerpo. En la práctica no es un criterio satisfactorio, dado que la afinidad calmodulina-PDE es del orden de  $10^{-9}$  a  $10^{-8}$  y la afinidad ab-ag es  $10^{-6}$  con lo cual no puede revertir la asociación enzima-activador.

### VIII.7. EL GEN DE LA CALMODULINA

El gen de la calmodulina de pollo está compuesto por 8 exones y 7 intrones. Cinco de los siete intrones están en la región codificante. Uno de los intrones separa el ADN que codifica para los aminoácidos 82 y 83, con lo cual interrumpe la hélice IV y divide a la proteína en dos mitades homólogas (181). También las hélices I y VII están interrumpidas; la primera, entre los aminoácidos 10 y 11, que no están involucrados en la unión al  $\text{Ca}^{2+}$ , y la segunda, entre los aminoácidos 139 y 140, interrumpiendo el cuarto sitio de unión al  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los otros intrones separan los *loops* 2 y 3, con lo cual tres de los cuatro sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  están divididos por intrones. Esto refuta la teoría que los intrones separan los dominios funcionales de las proteínas. Actualmente se cree que los intrones separan regiones de la proteína que están en la superficie de la molécula (182).

Existen dos genes no alélicos de calmodulina, que se expresan, en pollo (183) y en *Xenopus* (184). Al contrario, hay un solo gen en *S. cerevisiae* (185), en *D. discoideum* (186), y en *D. melanogaster* (187). En cambio, en *Trypanosoma brucei* y *gambiense* existen tres copias del gen repetidas en tandem. Entre las tres copias del gen de *Trypanosoma* existe una secuencia conservada de 57 pb localizada en el extremo 5' de cada uno (188).

VIII.8. EVOLUCION DE LA CALMODULINA

En el curso de la evolución, la selección natural optimizó y preservó las funciones de las moléculas. Las proteínas han acumulado mutaciones puntuales y, en algunos casos, han sufrido modificaciones aún más drásticas, como ser la duplicación génica. Una molécula que se ha duplicado, se distingue por su elevada homología interna; tal es el caso de la calmodulina. Esta molécula puede subdividirse en cuatro dominios similares, lo que implica que la estructura primaria de la calmodulina debió elongarse dos veces por duplicación intragénica. En la figura I.6 se esquematiza la evolución del gen de la calmodulina.

La calmodulina está muy conservada a lo largo de toda la escala evolutiva (189). En 1980, se determinó la secuencia primaria de la calmodulina de cerebro bovino (190) y posteriormente, la del molusco *Patinopecten* (191); de la anémona de mar *Metridium senile* (192) y de *Tetrahymena* (193). Entre especies tan distantes como la vaca y la anémona, sólo existen tres nucleótidos diferentes, y con *Tetrahymena*, 17 variaciones.

Se construyeron plásmidos de expresión que contienen el gen de la calmodulina de pollo (194). Por mutagénesis dirigida, se alteró el gen, obteniéndose proteínas con algunas sustituciones específicas, que se denominaron CaML3, CaML16 y CaML19, que contienen 3, 16 y 19 sustituciones, respectivamente. Se los comparó con la calmodulina normal de vertebrados respecto de su capacidad de activar otras enzimas.

Estas proteínas carecen de la alanina N-acetilada y de la trimetilisina 115; sin embargo, la ausencia de estas modificaciones post-traduccionales no modifica la actividad biológica de las proteínas sintéticas. Se cree que la trimetil-lisina puede estabilizar la calmodulina *in vivo*, protegiéndola de la degradación dependiente de ubiquitina (195).

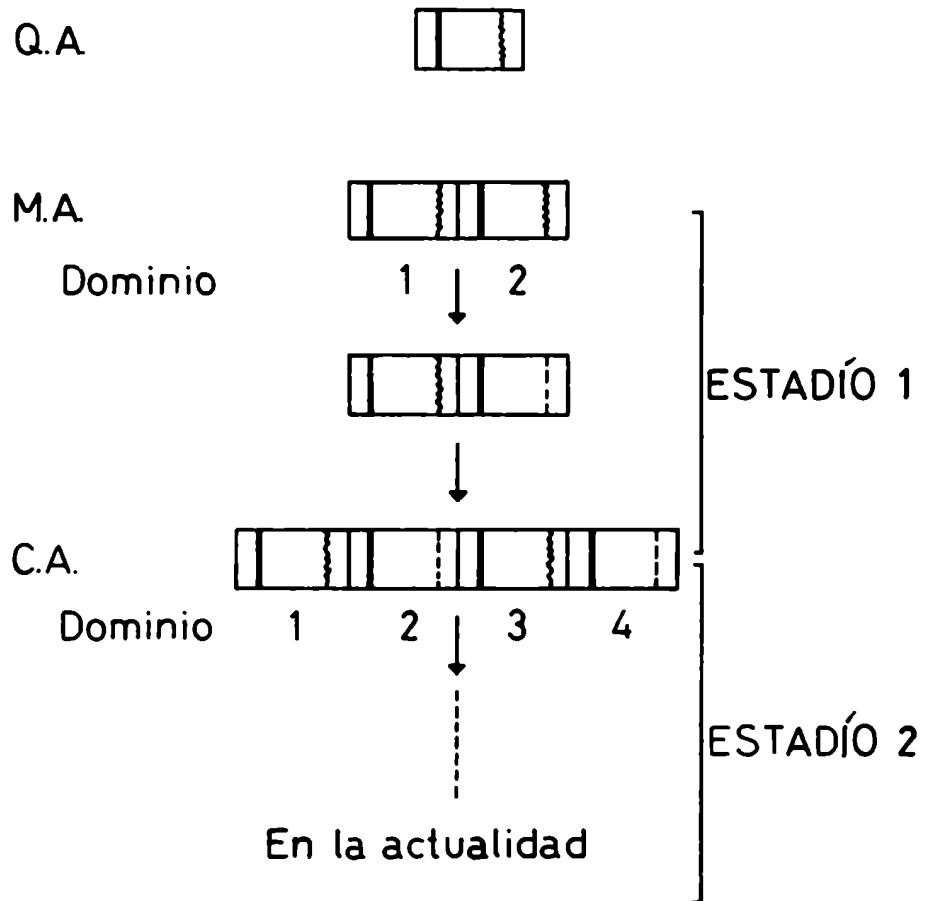


Figura I-6: Modelo evolutivo de la calmodulina. La homología interna de la secuencia aminoacídica de la calmodulina se explica por dos eventos de duplicación génica sucesivos. Este modelo (189) asume la existencia de una calmodulina ancestral con un único dominio (QA) que, durante el estadio 1 sufre una duplicación intragénica que origina un segundo dominio, obteniéndose una calmodulina ancestral con dos dominios (MA). Mutaciones posteriores del dominio 1, y un segundo evento de duplicación, al final del estadio 1, originaron una calmodulina ancestral (CA) con 4 dominios. Durante el estadio 2, la CA experimentó algunos cambios evolutivos que dieron lugar a la actual proteína.

A pesar de las numerosas sustituciones, CaML16 y CaML19 retienen gran parte de su actividad biológica. Esto sugiere que la estructura primaria de la calmodulina se ha conservado, no debido a la necesidad de una secuencia estricta para la activación de una proteína determinada, sino por la suma de requerimientos dictados por el amplio espectro de proteínas calmodulina dependientes.

Organismos muy distantes evolutivamente como *Tetrahymena* (193) y *Dictyostelium* (165), probablemente tengan un menor número de proteínas dependientes de calmodulina, por lo que han tolerado un cierto grado de divergencia de la calmodulina de vertebrados. La viabilidad de CaML16 y CaML19 implicaría que pueden ocurrir mutaciones no necesariamente letales, pero que modifican la capacidad de la calmodulina de interactuar con proteínas dependientes de la misma (194).

La calmodulina purificada de *S. cerevisiae* (185) tiene un 80% de homología con otras calmodulinas y se comporta como una calmodulina típica. Sólo los sitios 1 y 3 de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  son idénticos a la secuencia clásica, en el sitio 2, la glicina en posición 6 es reemplazada por histidina y el sitio 4 perdió el segundo aminoácido del *loop* que une  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, conservan la estructura "hélice-*loop*-hélice". La región aminoterminal, entre los residuos 8 y 23, es la más conservada en las distintas calmodulinas. Probablemente esta región es muy importante para la función biológica de la proteína.

Schaefer y colaboradores (196) purificaron la calmodulina de *Paramecium*, que se caracteriza por poseer una dimetil-lisina en posición 13; una glutamina en posición 79 en lugar de treonina o serina; ácido aspártico en posición 119 en vez de ácido glutámico, y una valina en posición 146 reemplazando la treonina, metionina o isoleucina característica. Todas estas diferencias ocurren en las estructuras  $\alpha$ -hélices que flanquean los *loops*.

Estudiando mutantes de *Paramecium* con defectos en el sistema motriz relacionados con el flujo de potasio dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , estos autores (196) observaron que los defectos se podían corregir con microinyecciones de calmodulina purificada del citoplasma de Paramecios normales. Sin embargo, calmodulinas de otras fuentes eran incapaces de corregir este defecto. Curiosamente, la calmodulina de los mutantes podía activar la PDE de cerebro bovino, lo que implica que la diferencia con la normal era mínima.

Probablemente la calmodulina de Paramecio participe en el control de la corriente de potasio; alteraciones en su estructura le impiden cumplir este rol sin anular completamente sus otras actividades biológicas.

### VIII.9. CALMODULINA EN TRYPANOSOMAS

La calmodulina está presente en Trypanosomas africanos y americanos. La calmodulina de Trypanosomas africanos tiene un 89% de homología con la calmodulina de cerebro bovino y comparando las secuencias, presenta 17 y 22 sustituciones aminoácídicas respecto de las calmodulinas de cerebro y de *Tetrahymena*, respectivamente (197).

Está compuesta por 148 aminoácidos, pero tiene mayor movilidad electroforética (16 K) en geles disociantes que la calmodulina de cerebro bovino. Probablemente tenga una conformación más compacta. Sin embargo, en condiciones no disociantes migra igual que la calmodulina de cerebro. Puede concluirse que, si bien es más compacta, la carga superficial de la molécula es menor, siendo levemente más básica. Por proteólisis limitada genera distintos fragmentos. A pesar de estas diferencias en la estructura primaria, es capaz de activar la PDE de cerebro bovino y la ATPasa  $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$  de eritrocitos humanos.



## Introducción

Anticuerpos anti-calmodulina de *Trypanosoma* no reconocen la calmodulina de cerebro ni la de *Tetrahymena*. Probablemente los epitopes identificados reflejan las diferencias en la estructura primaria.

Se ha demostrado que las formas sanguíneas de *Trypanosomas* africanos tienen mayor concentración de calmodulina que las formas presentes en el insecto vector (198). Puede ser que los genes de la calmodulina se expresen diferencialmente en los distintos estadios del ciclo de vida del parásito. Ruben y colaboradores (199) trabajando con anticuerpos anti-calmodulina, inmunolocalizaron la calmodulina en la base del flagelo de formas sanguíneas y procíclicas de *T.b. congolense* y *T.b. rhodesiense*. Esto sugiere que la calmodulina puede estar implicada en el movimiento del flagelo.

En *Trypanosoma cruzi* se describió un factor termoes- table, activador de la PDE de cerebro que aparentemente no concordaba con las características de la calmodulina (48).

IX. PAPEL DEL  $\text{Ca}^{2+}$  EN EL MOVIMIENTO DE CILIOS Y FLAGELOS

Las células de vida libre, espermatozoides y protozoos ciliados y flagelados, se movilizan por el batido sincrónico y uniforme de millares de cilios o por la ondulación de uno o más flagelos. Al microscopio electrónico se observó que cilios y flagelos tienen un mismo diseño: un conjunto de fibras, axonema, rodeado por una membrana que es continuación de la membrana plasmática. Las fibras que componen el axonema son microtúbulos que se ordenan en un grupo perisférico de nueve pares alrededor de dos microtúbulos centrales. Esta estructura se denomina 9+2.

Diversas evidencias sugieren que el movimiento de cilios y flagelos es uno de los fenómenos biológicos regulados por  $\text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  tiene un rol en la fototaxis y en el control de la ondulación del flagelo en *Chlamydomonas* (200); en los protozoos ciliados, *Paramecium* (201) y *Tetrahymena* (202), el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular invierte la dirección de nado al reorientar el batido de los cilios. Satir (203) indujo el detenimiento de los cilios laterales de branquias de almejas de agua dulce, al perfundir con niveles milimolares de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia del ionóforo A23187 y Tsuchiya (204), en *Mytilus*, detuvo el movimiento ciliar elevando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $10^{-7}$  M a  $10^{-8}$  M. La onda de propagación flagelar se revierte a elevadas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en *Chritidia* (205) y en el espermatozoide de erizo de mar, el  $\text{Ca}^{2+}$  regula el batido asimétrico e intermitente del flagelo (206).

Existen dos etapas en el proceso dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ : i) la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a cilios o flagelos via canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en la membrana ciliar o flagelar y ii) el  $\text{Ca}^{2+}$ , una vez dentro, modula el aparato motriz (207).

### IX.1. ENTRADA DEL $\text{Ca}^{2+}$

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  están localizados en la membrana ciliar o flagelar; no se sabe si están distribuidos uniformemente o en forma localizada. En *Paramecium* (208) se obtuvieron dos poblaciones de vesículas provenientes de membrana ciliar, una con y la otra sin canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que sugiere una distribución específica y restringida.

Los iones atraviesan las membranas de todas las células. De acuerdo al estado de activación, los canales iónicos de membrana transportan  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Cl}^-$  dentro o fuera de la célula. Durante años se habló de dos tipos de canales: a) los controlados por potenciales eléctricos a través de membrana, que son bloqueados por antagonistas del  $\text{Ca}^{2+}$  (verapamil, diltiazem); b) los activados por la unión de un ligando a un receptor.

Recientemente se descubrieron nuevos niveles de complejidad en la estructura de los canales y se encontró que los segundos mensajeros,  $\text{Ca}^{2+}$  y AMPc también regulan la función de los mismos (209). Las proteínas que forman el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  contienen  $\alpha$ -hélices, presentan la región cargada hacia el centro del poro y la región externa en contacto con los lípidos cargados de la membrana circundante. Caterall (209) trabajando con células músculo esquelético, denominó a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , canales L debido al alto nivel de despolarización de membrana que requieren para abrirse y a lo mucho que demora la activación.

Numerosas evidencias indican que los lípidos, además de mantener una barrera hidrofóbica, regulan lo que ocurre internamente. Tal es el caso de los metabolitos de fosfoinosítidos,  $\text{IP}_3$ , que aumentan el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular liberándolo del retículo endoplasmático (R.E.) y éste gatilla diversas actividades enzimáticas. Un gran número de receptores al ser activados, producen sus efectos vía movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  que ocurre en dos etapas:

i) liberación inicial transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de receptáculos intracelulares (R.E., mitocondria); ii) una entrada más prolongada del  $\text{Ca}^{2+}$  desde el espacio extracelular. Putney (210) ha propuesto un modelo en el cual el  $\text{IP}_3$  libera  $\text{Ca}^{2+}$  del R.E. vaciando este depósito; esto induce una entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Para que esto sea factible, las membranas del R.E. y la membrana plasmática deben estar en contacto. Este esquema se observa en la figura I.7.

### IX.2. ACCION DEL $\text{Ca}^{2+}$

Los mecanismos moleculares de la transducción sensorial, la excitación de membrana y la movilidad celular son previos a la diferenciación celular y a la comunicación sináptica. Es por ello, que el estudio de los protozoos sirve como modelo experimental para eucariotes superiores, salvaguardando la complejidad de los organismos unicelulares respecto de una célula de un organismo multicelular. Los estudios más completos sobre el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en el movimiento de cilios y flagelos, se han realizado en el *Paramecium* (211). Frente a estímulos externos ya sean calor, químicos, mecánicos o luminosos, se modifican los receptores sensoriales del protozoo que generan una variación de potencial de membrana de acuerdo a la fuerza del estímulo. Este potencial de acción genera un incremento en la concentración interna de  $\text{Ca}^{2+}$  (al abrir los canales correspondientes) que se traduce en una reversión del batido de los cilios.

No se conocen los blancos de acción del  $\text{Ca}^{2+}$ . Se considera que la calmodulina es el blanco intracelular del catión ya que está ampliamente distribuida, es el sensor universal de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  y está involucrada en numerosos procesos celulares dependientes del mismo. El nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  libre necesario

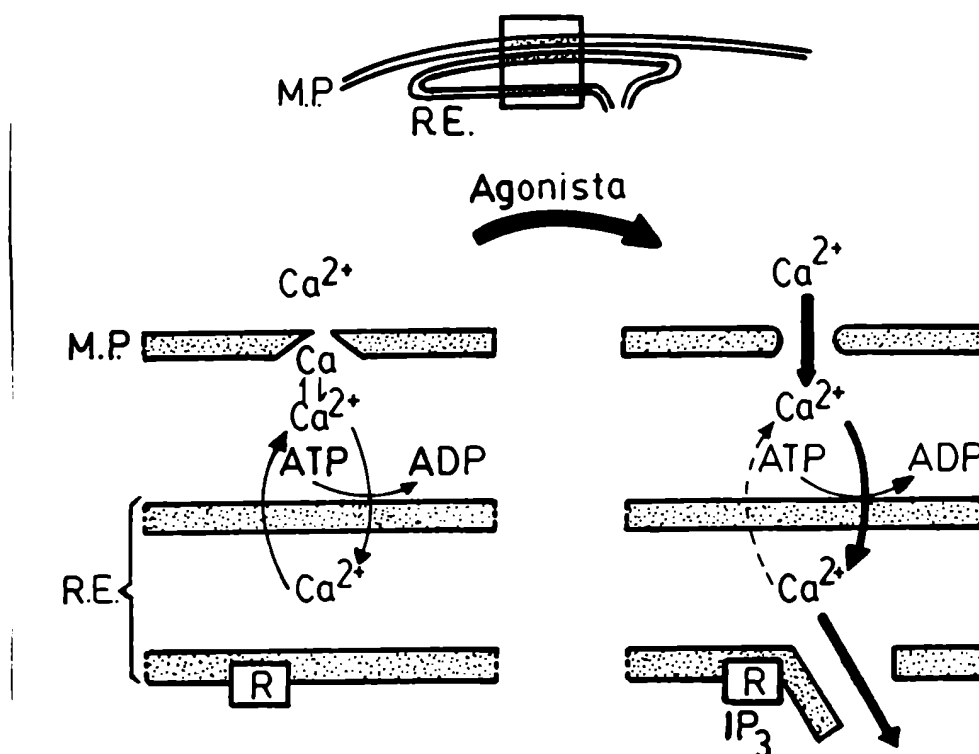


Figura I-7: Mecanismo de entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula. Putney (210) propuso un mecanismo en el cual la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo endoplasmático (RE) induciría la entrada del catión desde el medio extracelular a la célula. Es condición necesaria para que este mecanismo ocurra, que las membranas del RE y la membrana plasmática (MP) estén cercanas.

En condiciones de reposo (izquierda de la figura), en el RE existe un balance entre la entrada y la salida del catión, que mantiene la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el rango nanomolar (100-200 nM). En estas condiciones, el  $\text{Ca}^{2+}$  se une a sitios que restringen la entrada del catión.

Luego de la adición de un agonista (derecha de la figura), el  $\text{IP}_3$  se une a su receptor (R) y el  $\text{Ca}^{2+}$  se libera al citosol. Al disminuir la  $[\text{Ca}^{2+}]$ , éste se disocia de los sitios restrictivos y se activan los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Durante el lapso que el  $\text{IP}_3$  está presente, existe una fuerza neta que moviliza el catión desde el espacio extracelular al citosol y mantiene baja la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el RE.

para inducir modificaciones en el movimiento de cilios y flagelos coincide con el nivel necesario para activar la calmodulina (207).

Recientemente se aisló calmodulina de los cilios de *Tetrahymena* (207) y *Paramecium* (212); en la fracción flagelar de *Chlamydomonas* (213), en los flagelos de Trypanosomas africanos (199) y en los cilios del molusco *Aequipecten irradians* (214). En *Tetrahymena* (207), la calmodulina está distribuida a lo largo del eje longitudinal de los pares de microtúbulos a intervalos de 90 nm. En *T. b. rhodesiense* (199) se localiza la calmodulina en la región de contacto entre el flagelo y el cuerpo celular; en *Chlamydomonas* (213) está presente en el axonema.

Hirschberg y Hutchinson (215) realizaron un estudio sobre el efecto de la clorpromazina, droga anticalmodulina, en la movilidad de *Chlamydomonas*. Demostraron que a una concentración de 6  $\mu\text{M}$ , la droga revierte la fototaxis del alga y a 50  $\mu\text{M}$  inhibe completamente el movimiento.

Reed y Satir (217) revirtieron el detenimiento de los cilios laterales de las branquias de almejas, causado por los elevados niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , con 25  $\mu\text{M}$  de Trifluoperazina. Si estas drogas ejercen su efecto inhibitorio sobre la calmodulina, se puede considerar que ésta está involucrada en la regulación del movimiento ciliar y flagelar.

Stommel y colaboradores (214) han postulado tres posibles modos de acción de la calmodulina: a) que esté implicada en la dirección del deslizamiento de los microtúbulos. Sin embargo, la calmodulina se extrae muy fácilmente, lo que indica que sólo estaría involucrada si la regulación se realiza a través de interacciones muy débiles; b) que forme parte de un sistema  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana similar al presente en eritrocitos. En los cilios se ha descrito una ATPasa que al interactuar con el

## Introducción

complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina podría bombear  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el exterior del cilio; c) la calmodulina actúa secuestrando  $\text{Ca}^{2+}$  y de este modo disminuye la concentración interna del catión.

Satir (217) propuso un modelo de "doble *switch*" en el cual el  $\text{Ca}^{2+}$  y el AMPc actúan en dos puntos diferentes para determinar cuál de los nueve pares de microtúbulos externos se desliza activamente en un instante dado, durante el ciclo de un solo golpe de cilios o flagelos. Debe existir un gradiente en tiempo (del orden de milisegundos) y en espacio (en el cilio) de ambos mensajeros. La concentración interna de  $\text{Ca}^{2+}$  se mantiene por la diferencia en la entrada, salida y secuestro de depósitos intracelulares del catión. El AMPc es un balance de las actividades de la adenilato ciclasa y de la PDE, ya que no se ha detectado liberación de AMPc al medio.

OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS

- 1) Estudiar el papel de los segundos mensajeros,  $\text{Ca}^{2+}$  y AMPc en el metabolismo del parásito *T. cruzi*.
- 2) Purificar y caracterizar las enzimas involucradas en el metabolismo del AMPc:
  - a) la fosfodiesterasa, enzima encargada de su degradación
  - b) la quinasa de proteínas dependiente de AMPc, receptor intracelular del nucleótido cíclico y mediador de sus efectos vía fosforilación de proteínas específicas.
- 3) Estudiar la regulación de estas enzimas en el parásito y determinar semejanzas y diferencias con las enzimas correspondientes de eucariotes superiores.



## II. MATERIALES Y METODOS

## I. ORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se trabajó con el estadio epimastigote del parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. La cepa utilizada fue la Tul2, que deriva de la cepa Tulahuén, mantenida por inoculación en ratas hasta 1979 y en cultivo hasta el presente. Esta cepa conserva su infectividad.

Las células fueron cultivadas a 30°C en un medio bifásico completo sin agitación, en Erlenmeyers de 250 ml conteniendo 50 ml de medio con agar y 5 ml de medio líquido (218). Posteriormente se modificaron las condiciones de cultivo, cultivándose las células en un medio líquido monofásico modificado por Engel (Comunicación personal de la Dra. M. Esteva)

Los parásitos fueron cosechados en la fase logarítmica de crecimiento (7 días) por centrifugación a 1000 x g durante 15 minutos a 4°C y se lavaron tres veces con una solución que contenía sacarosa 0,25 M y KCl 5 mM (SKS).

## II. HOMOGENEIZACION Y FRACCIONAMIENTO

Los parásitos, en una relación de 100 mg de células (peso húmedo) por 1 ml de SKS, se sometieron a ruptura en un desintegrador Sorvall-Ribi, por presión y descompresión a 350 kg/cm<sup>2</sup> (5000 psi) en atmósfera de nitrógeno. La ruptura se comprobó al microscopio óptico.

El homogenato se centrifugó a 1000 x g (S<sub>1</sub>) durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se centrifugó a 105000 x g durante 1 hora (S<sub>100</sub>) previa adición de los siguientes inhibidores de proteasas: 0,1 mM PMSF y Trasylol (25 U/ml). Alternativamente, se realizó una centrifugación diferencial obteniéndose los siguien-

## Materiales y Métodos

tes sedimentos: a) de 5000 x g durante 15 minutos; b) de 11000 x g durante 15 minutos; c) de 30000 x g durante 30 minutos; d) de 105000 x g durante 60 minutos, y una fracción citosólica que es equivalente al S100.

A cada una de estas fracciones se les midió actividad de quinasa de proteínas.

### III. ENSAYOS ENZIMATICOS

#### III.1. QUINASAS DE PROTEINAS

Los ensayos se realizaron esencialmente de acuerdo al método de Roskosky (219), con modificaciones.

Cuando se utilizó histonas o protamina, la mezcla de incubación contuvo: 20 mM MOPS pH 6,9, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF, 0,2 mM MIX, 25-100 μM  $\gamma$ <sup>32</sup>P-ATP (con una actividad específica de 500 cpm/pmol) y 3 mg/ml de histona II-AS o 1 mg/ml de los restantes sustratos fosforilables, en presencia o no de 1 μM AMP cíclico y la preparación enzimática. El volumen de reacción fue de 0,1 ml.

Cuando se usó kemptido, heptapéptido sintético que imita el sitio de fosforilación de la piruvato quinasa, la concentración final del sustrato fosforilable fue de 25 μM. El volumen de reacción se redujo a 0,05 ml.

Cuando se usó fosvitina o caseína como sustrato, la mezcla contuvo 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 mg/ml de fosvitina o caseína, siendo idéntica en el resto de los componentes detallados anteriormente.

En todos los casos la reacción se llevó a cabo a 30°C durante 10 minutos o en los períodos indicados oportunamente.

## Materiales y Métodos

Tanto con kemptido como con los otros sustratos básicos, al finalizar la incubación se tomaron alicuotas de 30  $\mu$ l o 50  $\mu$ l, respectivamente, y se vertieron sobre papel de fosfocelulosa P81 (2 x 2 cm), que fueron inmediatamente sumergidos en ácido fosfórico 75 mM (500 ml/50 ensayos), a 4°C. Después de agitar (50 rpm) durante 15 minutos se vertió el ácido fosfórico y se agregó nuevamente la misma cantidad después de dejar escurrir los papeles. Este procedimiento se repitió 4 veces.

Los papeles se secaron sobre un cartón y se contó la radioactividad en una mezcla centelleante de tolueno-Omnifluor.

En el caso de fosvitina o caseína, la reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, enfriado a 4°C. A cada tubo se agregó 0,020 ml de solución de albúmina bovina (100 mg/ml) como portador y se centrifugó 4 minutos a 4000 rpm en una centrífuga clínica.

Se descartó el sobrenadante y el precipitado se redisolvió en 0,2 ml de NaOH 1 M. Se reprecipitó la proteína con 2 ml de solución TCA 10% y ácido fosfotúngstico 0,2% y se repitió la centrifugación. El precipitado redisoluelto en 0,1 ml de NaOH 1M se trasvasó a un vial con 3 ml de mezcla BRAY para centelleo.

### III.2. UNION DE AMP CICLICO

La medición se realizó de acuerdo al método empleado por Døskeland y Ueland (220). La mezcla de incubación contuvo 50 mM fosfato de sodio pH 6,8, 1 mg/ml de seroalbúmina bovina, 0,03  $\mu$ M [ $^3$ H]-AMPc (actividad específica 43  $\mu$ Ci/nmol) y la preparación enzimática. El volumen total fue de 0,1 ml. Las incubaciones se llevaron a cabo a 4 °C durante 2-12 horas.

Las reacciones se detuvieron por el agregado de 1 ml de sulfato de amonio al 80%, filtrándose a través de un filtro Millipore (HAWP 02500 tipo HA, 0,45  $\mu$ m). Se lavó dos veces con 2 ml

de sulfato de amonio al 60%, se secó y se contó la radioactividad en una mezcla de centelleo que contenía 0,4% (P/V) de omnifluor y 30% (V/V) de Tritón X-100 en tolueno.

Para determinar la especificidad de la unión del AMP cíclico se realizó un ensayo de competencia con AMP cíclico frío, análogos del nucleótido, GMP cíclico, 5' AMP, ATP y adenosina, en las concentraciones indicadas en los respectivos experimentos.

### III.3. FOSEODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS

La actividad de fosfodiesterasa (PDE) se midió según el método descrito por Thompson y Appleman (121), con la modificación introducida por Londesborough (221). La mezcla de reacción contuvo 40 mM Tris-HCl pH 8; 5 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 μM [<sup>3</sup>H]-AMPc o [<sup>3</sup>H]-GMP cíclico (actividad específica 500 cpm/pmol). El volumen final de reacción fue de 0,1 ml. Las incubaciones se llevaron a cabo a 30°C durante 5 a 30 minutos.

La reacción se detuvo por calentamiento 1 minuto a 100°C. Se incubó nuevamente añadiendo 0,04 ml de veneno de serpiente (King Cobra) 2 mg/ml en 10 mM Tris-HCl pH 8. Esta segunda reacción se detuvo por el agregado de 0,05 ml de una solución de 50 mM EDTA y 5 mM de adenosina o guanosina según la PDE a determinar.

A continuación se agregó 1 ml de una suspensión que contenía 33% de resina de intercambio iónico AG1-X4 (200 a 400 mesh) y 30% de etanol en agua en el caso de la AMPc-PDE o 0,5 ml de una suspensión que contenía volúmenes iguales de AG3-X4 (200 - 400 mesh) en agua para la GMPc-PDE. Después de sedimentar, se tomaron alícuotas del sobrenadante y se contó la radioactividad en una mezcla que contenía 0,4% (P/V) de omnifluor y 30% (V/V) de Tritón X100 en tolueno.

III.4. DETECCION DE CALMODULINA

El ensayo de calmodulina se realizó midiendo la activación producida sobre la fosfodiesterasa de AMP cíclico de cerebro bovino.

La mezcla de incubación contuvo 40 mM Tris-HCl pH 8; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 25 μM CaCl<sub>2</sub>, albúmina bovina (0,5 mg/ml); 200 μM [<sup>3</sup>H]-AMPc (actividad específica 100 cpm/mmol) y preparación de fosfodiesterasa de cerebro (2 mg proteína/ml). El volumen final de reacción fue de 0,1 ml y la incubación se realizó a 30°C durante 10 minutos.

El procedimiento posterior fue idéntico al detallado en el apartado IV.3 de Materiales y Métodos.

III.5. OTRAS DETERMINACIONES REALIZADAS

III.5.1. Proteínas: se realizó por el método de Lowry *et al* (222). Como patrón se usó seroalbúmina bovina.

III.5.2. Citocromo C: se midió su absorción en 410 nm (banda de Soret).

III.5.3. Malato deshidrogenasa: la actividad fue determinada por el consumo de NADH en presencia de oxalacetato midiendo la disminución de su absorbancia a 340 nm (223).

III.5.4. Lactato deshidrogenasa: se determinó la actividad por el consumo de NADH en presencia de piruvato, midiendo la disminución de su absorbancia a 340 nm (223).

III.5.5. Catalasa: se midió la actividad enzimática por la disminución de la oxidación de yoduro a yodo, acoplada a la reducción del  $H_2O_2$  (224).

III.5.6. Radio de Stokes ( $a$ ): este valor fué obtenido a partir del perfil de las filtraciones en Sephacryl S300. Se estimó de un gráfico de  $a$  vs  $V_e/V_o$  (volumen de elución normalizado respecto del volumen de elución), obtenido con las proteínas marcadoras de parámetros moleculares conocidos.

#### IV. PREPARACION DEL SUSTRATO RADIOACTIVO PARA LAS QUINASAS DE PROTEINAS

El  $\gamma$ - $^{32}P$ -ATP fue obtenido por una reacción de intercambio del fosfato  $\gamma$  del ATP frío por el fosfato marcado (225). La mezcla de incubación contuvo: 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM ditiotreitól (DTT) 0,4 mM ácido 3-fosfoglicérico, 0,05 mM  $NAD^+$  y 0,01 mM ATP frío, más 5 mCi de  $^{32}P$  inorgánico. Se le agregó una mezcla enzimática conteniendo gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de levadura (10  $\mu g$ ) y fosfoglicerato quinasa de músculo de conejo (20  $\mu g$ ). El volumen final fue de 0,1 ml. Se incubó a 30°C durante 2 horas.

Una vez finalizada la reacción, se diluyó una alícuota de mezcla 1:100 y 1:1000. Ambas diluciones se analizaron por cromatografía ascendente en capa delgada sobre polietilenimino-celulosa (PEI-celulosa) impregnada en reactivo fluorescente, utilizando 1,5 M LiCl como solvente.

La posición del nucleótido patrón (ATP) se detectó por absorción de la fluorescencia al U.V. La cuantificación del rendimiento se hizo por conteo de la tira de PEI celulosa, en una mezcla centelleante de tolueno-omnifluor. El rendimiento osciló entre el 70% y el 85% de incorporación de  $^{32}\text{P}$  a  $^{32}\text{P}$ -ATP.

Cuando el rendimiento fue inferior al 70%, la mezcla se purificó mediante una columna de DEAE-Sephadex A25 (0,5 x 5 cm) equilibrada con agua destilada. La columna se eluyó con un gradiente de 40 ml de 0,1 M de carbonato de Trietilamina (preparado por burbujeo de  $\text{CO}_2$  sobre la trietilamina en agua).

Se obtuvieron dos picos de radioactividad, el primero correspondiente al  $^{32}\text{P}$  que no reaccionó, y el segundo al  $^{32}\text{P}$ -ATP.

### V. PURIFICACION DE QUINASAS DE PROTEINAS DEPENDIENTES DE AMP CICLICO DE *Trypanosoma cruzi*

#### V.1. CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA

Se sembraron 100 ml (2 mg/ml proteína) del S100 en una columna de DEAE-celulosa (2,8 x 13 cm) equilibrada con 25 mM Tris-HCl pH 7.4 conteniendo 0,1 mM EDTA y 0,1 mM PMSF (Tampón A).

Luego de aplicar la muestra, la columna se lavó con 200 ml del tampón A y se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0,7 M NaCl. El volumen total del tampón eluyente fue de 400 ml recogiendo fracciones de 8 ml cada una con un flujo de elución de 1,5 ml/min.

A las fracciones de la columna, incluido el percolado y el lavado, se determinó actividad de quinasas de proteínas.



V.2. PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO

Las fracciones con actividad de quinasa dependiente de AMP cíclico, que eluyeron de la DEAE a 0,32 M NaCl, fueron concentradas por precipitación con sulfato de amonio al 70% de saturación. La solución saturada, previamente neutralizada, se agregó lentamente con agitación magnética durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 18000 x g durante 20 minutos. El precipitado así obtenido, fue resuspendido en un décimo de su volumen inicial en 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 15 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM EDTA, 5% glicerol y 1 mM PMSF (tampón B). El concentrado fue dializado contra el tampón B durante 12 horas a 4°C.

Se la denominó "fracción sulfato de amonio" (S.A.).

V.3 FILTRACION EN GELES

Se sembró 1 ml del precipitado de sulfato de amonio (3,5 mg/ml) en una columna de Sephacryl S300 (0,8 x 46 cm) que se equilibró con tampón A con 0,1 M NaCl. Se recolectaron fracciones de 1 ml a un flujo de 0,2 ml/min. Las fracciones con actividad de quinasa y de unión de AMP cíclico se reunieron y dializaron contra tampón B.

Se intentó separar la holoenzima en sus componentes regulatorios y catalíticos. Para ello, se dializó 1 ml del precipitado de S.A. contra 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1 M NaCl, 4 mM 2-mercaptoetanol, 2 mM AMP cíclico (tampón C), durante 2 horas a 4°C. Luego, se sembró el dializado en el Sephacryl S300 equilibrado con el tampón C pero con 0,1 mM AMPc y se eluyó con el mismo tampón. Previamente a ensayar la capacidad de unión al AMP cíclico, las fracciones eluidas fueron dializadas extensivamente contra tampón A (48 hrs).

## Materiales y Métodos

Alternativamente se preincubó 1 ml del precipitado de S.A. con 0,5 M NaCl y 1 mg/ml de histona II-AS durante 10 min a 0°C. Se sembró luego en el Sephacryl equilibrado con tampón A con 0,5 M NaCl. Se recolectaron fracciones de 1 ml a un flujo de 0,2 ml/min.

Las fracciones con actividad de subunidad catalítica o regulatoria fueron reunidas y se concentraron por diálisis contra 2M sacarosa en 20 mM Tris-HCl pH 7,4 y se guardaron a -20°C.

### V.4. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN HISTONA II-AS-SEPHAROSA

#### V.4.1. Preparación de la Histona-Sepharosa

Se acopló 1 g de Sepharosa 4B, previamente activada con bromuro de cianógeno, con 5 mg de histona II-AS purificada por Sigma, de acuerdo al protocolo descrito por Pharmacia (226).

La resina activada fue previamente lavada con 200 ml de 10 mM HCl y luego con 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,3 más 2,5 ml de 0,5 M NaCl en un volumen final de 30 ml, se acopló con la histona II-AS durante 24 horas con agitación magnética suave a 4°C. El sobrenadante se recogió por filtración y la resina se lavó exhaustivamente con agua destilada. El rendimiento fue del 75%.

#### V.4.2. Cromatografía en Histona-Sepharosa

Se armó una columna de 0,5 x 5 cm equilibrada con tampón A en la cual se sembraron 3 ml de la muestra obtenida del Sephacryl S300 en condiciones no disociantes (0,5 mg proteína/ml). Se lavó con 10 ml de tampón A y se eluyó con 10 ml del tampón A con 0,5 M NaCl. Se recolectaron fracciones de 0,5 ml a un flujo de 0,1 ml/min.

Las fracciones con actividad de quinasa y con capacidad de unir AMP cíclico fueron reunidas y dializadas contra tampón A durante 4 horas. Se las denominó "holoenzima".

### V.5. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD EN AMPc HEXANO-AGAROSA

Con el fin de obtener subunidades regulatorias libres, la fracción precipitada con S.A. se purificó por cromatografía en 8-(6-aminohexyl-amino)-AMPc-agarosa (Pharmacia Fine Chemicals), siguiendo el procedimiento descrito por Dills y colaboradores con alguna modificación (227).

En una columna de 0,5 x 4 cm equilibrada con 10 mM MOPS pH 6,9, 15 mM 2-mercaptoetanol, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF, 10% glicerol y 25 mM NaCl (tampón D), se sembró 6 ml del precipitado de S.A. (4,2 mg proteína/ml) previamente dializado contra tampón D. La columna se lavó con 20 ml de tampón D con 750 mM NaCl y, posteriormente, con 6 ml de tampón D hasta obtener absorbancia a 280 nm igual a cero. Se eluyó con 5 ml de tampón D conteniendo 0,1 mM AMP cíclico y luego con 3 ml de tampón D conteniendo 30 mM AMP cíclico. Se recolectaron fracciones de 1 ml a un flujo de 0,1 ml/min. La elución se realizó a 30°C.

Alternativamente, se eluyó en frío con 6 ml de tampón D conteniendo 10 mM AMP cíclico. Cada 3 horas se agregó 1 ml de tampón de elución dejando escurrir la columna; se recolectaron fracciones de 0,5 ml.

Se determinó actividad de fosfotransferasa a las fracciones de la columna, previa diálisis contra tampón D durante 3 horas. La actividad catalítica se detectó en las fracciones del lavado con tampón D con 750 mM NaCl.

Las fracciones eluidas con AMP cíclico constituyeron el componente regulatorio y fueron dializadas extensivamente, con sucesivos cambios de Tampón D.

V.6. CROMATOGRAFIA MIXTA EN SEPHADEX G25-CM-50

Otro método para separar los componentes catalíticos y regulatorios de la quinasa dependiente de AMP cíclico fue el uso de una cromatografía mixta (228). La columna se empaquetó primeramente con 2 ml de Sephadex G25 (superfine) sobre el cual se depositó 1 ml de CM-Sephadex C50.

La columna se equilibró con 50 mM fosfato de sodio pH 6,5, 0,1 mM EDTA, 15 mM 2-mercaptoetanol y 0,1 mM AMP cíclico (tampón E). Se sembró 1 ml de muestra precipitada con S.A. (4,2 mg proteína/ml) que se ajustó previamente a 0,1 mM de AMP cíclico.

Se lavó con tampón E hasta obtener absorbancia a 280 nm igual a cero. Se eluyó con 300 mM fosfato de sodio pH 6,5, 0,1 mM EDTA y 15 mM 2-mercaptoetanol sin AMP cíclico.

Las fracciones del percolado y lavado se dializaron extensivamente con sucesivos cambios de tampón E sin AMP cíclico. La subunidad regulatoria se excluyó con el lavado, mientras que la subunidad catalítica quedó retenida y se eluyó al incrementar la fuerza iónica.

VI. **PURIFICACION DE QUINASAS DE PROTEINAS DEPENDIENTES DE AMP CICLICO DE CORAZON BOVINO**

El procedimiento usado para la purificación de la holoenzima y de las subunidades catalíticas y regulatorias tipo II fue el descrito por Beavo y colaboradores (229) y por Rannels y colaboradores (230).

## Materiales y Métodos

Partiendo de 800 g de corazón bovino trozado, se siguieron los siguientes pasos de purificación: homogeneización, centrifugación y cromatografía en DEAE-celulosa. Los picos con actividad de quinasa dependiente de AMP cíclico se concentraron por precipitación con sulfato de amonio al 70% y se sembraron, previa diálisis, en una columna de 8-(6-aminohexylamino)-AMPc-agarosa que se eluyó con tampón D conteniendo 10 mM AMP cíclico. Las actividades específicas de las subunidades así obtenidas fueron 76,5 nmoles  $^{32}\text{P}$  incorporado/min/mg y 1 nmol AMPc unido/mg para las subunidades catalíticas y regulatorias, respectivamente.

Alternativamente se siguió otro esquema de purificación en el que las muestras precipitadas se sembraron en una columna de Sephacryl S300 y, a continuación, en una columna mixta de Sephadex G25-CM-Sephadex C-50. Estos pasos ya fueron descritos en los apartados V.3, y V.6 de este capítulo.

## VII. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

### VII.1. PREPARACION DE GELES

Se hicieron geles disociantes planos que se polimerizaron en una celda marca BioRad, modelo 220. Las dimensiones de los geles fueron: 8 cm de alto x 1,5 mm de espesor para el gel separador y 2 cm de alto x 1,5 mm de espesor para el gel concentrador.

Composición del gel separador: 10% acrilamida (P/V); 0,27% bisacrilamida (P/V); 0,1% SDS (P/V); 0,39 M Tris-HCl pH 8,8; 0,025% TEMED (V/V); y persulfato de amonio (PSA) 0,01 mg/ml.

Composición del gel concentrador: 5% acrilamida (P/V); 0,13% bisacrilamida (P/V); 0,1% SDS (P/V); 0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 0,05% TEMED (V/V); y 0,1% de PSA (P/V).

También se hicieron minigeles que se corrieron en una cuba especialmente diseñada para este propósito. La composición de los geles separador y concentrador fué idéntica a la señalada anteriormente, variando únicamente las dimensiones de los mismos. Estas fueron: 5 cm de alto x 1 mm de espesor para el gel separador y 1 cm de alto x 1 mm de espesor para el gel concentrador.

### VII.2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS Y CORRIDA ELECTROFORETICA

Antes de ser sometidas a electroforesis, las muestras se dializaron durante 12 horas contra tampón A a 4°C y se concentraron por diálisis contra una solución de 2 M sacarosa en 20 mM Tris-HCl pH 7,4.

Alícuotas de las muestras concentradas (20 a 60  $\mu$ l) tratadas con 30 o 50  $\mu$ l de una mezcla desnaturalizante de la siguiente composición: 2% SDS (P/V), 5% 2-mercaptoetanol (V/V), 20% glicerol (V/V), 60 mM Tris-HCl pH 6,8 y 0,002% de azul de bromofenol (P/V) fueron calentadas durante 2 minutos a 100°C. El volumen de muestra aplicada fue de 50 a 100  $\mu$ l en los geles grandes y 20 a 40  $\mu$ l en los minigeles, oscilando entre 10 y 100  $\mu$ g de proteínas.

El tampón de corrida fue 50 mM Tris-glicina pH 8 conteniendo 0,1% SDS (P/V). La electroforesis se realizó a intensidad de corriente constante de 30 mA durante 4 horas, para los geles grandes y a 15 mA durante 3 horas para los minigeles, manteniendo la temperatura en 15°C.

Las proteínas usadas para la calibración de los pesos moleculares fueron: fosforilasa b (músculo de conejo), albúmina (suero bovino), ovoalbúmina (clara de huevo), anhidrasa carbónica (eritrocito bovino), e inhibidor de tripsina (soja).

Los geles fueron fijados y teñidos al mismo tiempo, durante 2 horas a 37°C en una solución acuosa que contenía metanol 45% (V/V), ácido acético 10% (V/V) y azul de Coomasie R250 0,2% (P/V). El desteñido se hizo con la misma solución pero sin colorante.

### VIII. FOSFORILACION EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Los geles se prepararon de igual modo al indicado en el apartado VII.1 de este capítulo.

Las muestras, previamente a ser sometidas a la electroforesis, se incubaron a 30°C durante 1 a 5 minutos en presencia de 20 mM MOPS pH 6,9; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM NaF; 0,2 mM MIX; 1 a 10 µM  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (actividad específica 1000 cpm/pmol), con o sin 0,1 y 1 mM dibutiril AMP cíclico (análogo no hidrolizable del AMPc), según se indicará.

Una vez terminada la incubación, se adicionó 30 µl de mezcla desnaturalizante y las muestras se calentaron 2 minutos a 100°C. El volumen de muestra aplicada osciló entre los 50 y 75 µl. La corrida se efectuó en las mismas condiciones indicadas anteriormente.

Los geles, fijados y desteñidos previamente, fueron secados sobre papel Whatman 3MM al vacío, con ayuda de calor en un secador de geles. Los geles secos se expusieron a películas autorradiográficas de rayos X (Agfa Gevaert CURIX) durante 6 a 48 horas a -70°C en presencia de una pantalla amplificadora. Luego se procedió al revelado de la película.

IX. TRANSFERENCIA A NITROCELULOSA E INMUNOPRECIPITACION *IN SITU* CON ANTICUERPOS ESPECIFICOS

IX.a. *DOT BLOT*

Sobre nitrocelulosa se sembraron alicuotas (2mm de diámetro) de diversos pasos de purificación de la quinasa de proteínas dependientes de AMP cíclico de *Trypanosoma cruzi*. Como control positivo, se usaron quinasas dependientes de AMP cíclico tipo I y tipo II, purificadas del hongo *Neurospora crassa* (231) y de corazón bovino respectivamente. Todas las muestras se diluyeron a la misma concentración de proteínas.

Previo bloqueo de los sitios inespecíficos con TBS con leche como se describe en el apartado IX.b., los papeles de nitrocelulosa se incubaron durante 18 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo específico. El revelado se efectuó en forma idéntica a la señalada en el apartado IX.b.

IX.b. *WESTERN BLOT*

Las quinasas de proteínas de *Trypanosoma cruzi* provenientes de una cromatografía en DEAE-celulosa (PKII) y precipitadas con S.A. al 70%, fueron sometidas a electroforesis en condiciones disociantes, como se especifica en el apartado VII.2 de Materiales y Métodos.

Las proteínas fueron luego transferidas a papel de nitrocelulosa. Se usaron hojas de papel nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$ , marca Millipore, que se cortaron del mismo tamaño del gel, se humedecieron y colocaron a ambos lados de éste. Sobre éstas se colocaron 2 hojas de papel Whatman 3MM. Este emparedado se dispuso entre dos paños absorbentes tipo "Scotch Brite", siendo todo so-



## Materiales y Métodos

portado con dos placas de acrílico con múltiples agujeros. El tampón de transferencia fue 50 mM fosfato pH 6,5. Se dejó transferir durante 18 horas a temperatura ambiente (232,233).

Las hojas de nitrocelulosa ya transferidas se cortaron en tiras, de acuerdo al tamaño del carril del gel. Estas tiras se incubaron con agitación durante 45 minutos a temperatura ambiente en TBS: 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 2% glicina (P/V); 3% leche en polvo (P/V); 0,1 mM PMSF; y 0,01% de azida (P/V), para saturar los sitios inespecíficos.

Luego, cada tira se incubó con el anticuerpo específico correspondiente diluido 1:250 en el mismo TBS con leche, en presencia de Tween 2, durante 18 horas a 30°C. Los anticuerpos usados fueron contra las subunidades regulatorias tipo I y II de las quinasas de proteínas dependientes de AMP cíclico de eucariotes superiores, que fueron donados por el Dr. Brian Hemmings de Basilea, Suiza. La concentración inicial de anticuerpo fue de 0,5 mg/ml para el tipo I y 1 mg/ml para el tipo II. Ambos fueron purificados por columnas de afinidad, siendo el tipo I una fracción enriquecida en IgG.

Paralelamente, como control, se incubó una tira con suero preinmune de conejo diluido 1:300 en leche.

Luego de la incubación con el anticuerpo se lavó cinco veces con TBS y se reveló mediante un segundo anticuerpo cabra-anticonejo biotinilado con posterior formación de un complejo macromolecular AVIDINA-BIOTINA, de acuerdo a las instrucciones del VECTASTAIN ABC KIT de Vector Laboratories.

Otra de las tiras de nitrocelulosa se reveló para proteínas, usando una solución al 0,5% (P/V) de Amido-Schwartz en metanol:ácido acético:agua (1,5:1:4,5).

X. PURIFICACION DE LA FOSFODIESTERASA DE *Trypanosoma cruzi*

X.1. CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA

En una columna de DEAE-celulosa (1,7 x 11,5 cm) equilibrada con 25 mM Tris-HCl, pH 7,4 conteniendo 0,5 mM PMSF (tampón F), se sembraron 32 ml del S<sub>100</sub> (2,34 mg/ml de proteína). La columna se lavó con 50 ml de tampón F y se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0,7 M NaCl. El volumen total del eluyente fue de 200 ml y se recogieron fracciones de 5 ml cada una, con un flujo de elución de 0,5 ml/min.

A las fracciones de la columna, incluyendo el percolado y el lavado, se determinó actividad de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos y de calmodulina. Dichas actividades se procesaron por diversos caminos.

X.2. COLUMNA DE AFINIDAD CALMODULINA-SEPHAROSA

X.2.1. Preparación de la columna de afinidad

Se acopló calmodulina de cerebro bovino a Sepharosa 4B, previamente activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia), de acuerdo al protocolo descrito en el apartado VI.3.1 de este capítulo.

Se tomó 1 g de resina activada que se acopló con 2,1 mg de calmodulina purificada de cerebro bovino. Se ajustó el medio a 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 0,2 mM CaCl<sub>2</sub> y el pH se mantuvo en 8.

Esta suspensión se incubó a 4°C durante 24 horas, con agitación magnética suave. El sobrenadante se recogió por filtración y la resina se lavó exhaustivamente con agua destilada; con ella se armó una columna de 0,75 x 7,3 cm. El rendimiento fué del 87%.

X.2.2. Cromatografía en columna de afinidad calmodulina-Sepharosa

Las fracciones de la DEAE correspondientes al pico de actividad de fosfodiesterasa se reunieron y se dializaron durante 4 horas contra tampón A. Posteriormente, la enzima se purificó por cromatografía de afinidad en una columna de calmodulina-sepharosa.

La cromatografía se realizó de acuerdo al método descrito por Klee y Krinks con modificaciones (234).

La columna se equilibró con 40 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM NaCl, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> y 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Tampón G). Se sembraron 5 ml de la enzima dializada (1 mg/ml de proteína) que se ajustó previamente a 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> y 1 mM MgCl<sub>2</sub>. La siembra fue muy lenta, para permitir la mayor interacción entre la enzima y el ligando.

La columna se lavó con 8 ml del tampón G. En estas condiciones, el 30% de la actividad de fosfodiesterasa fue retenida por la columna. Cuando las fracciones del percolado y lavado fueron recromatografiadas en otra columna de calmodulina-sepharosa, se obtuvo el mismo perfil de elución.

La elución se llevó a cabo por la adición de 8 ml de tampón G con 2 mM EGTA (sin CaCl<sub>2</sub>) y con 8 ml de tampón G con 2 mM EGTA y 0,3 M NaCl. Se recolectaron fracciones de 1 ml cada una con un flujo de 0,2 ml/min. Previamente al ensayo de fosfodiesterasa, las fracciones del eluido se ajustaron a 50 µM CaCl<sub>2</sub>.

Las fracciones con actividad de fosfodiesterasa se reunieron y se las denominó "fracción CaM-Sepharosa".

X.3. COLUMNA DE AFINIDAD ANTICUERPO-SEPHAROSA

X.3.1. Obtención del anticuerpo contra la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de *Neurospora crassa*

Ratones hembras Balb/c de cincuenta días de edad se inmunizaron con fosfodiesterasa de *Neurospora crassa* purificada de acuerdo a lo descrito por Téllez-Iñón *et al* (235). Fueron inyectados en forma subcutánea con 50 µg de una preparación enzimática proveniente de una segunda DEAE-celulosa, emulsionada con adyuvante de Freund completo (1:1).

A los siete días se hizo otra inyección, sin adyuvante. Tres días más tarde, los animales fueron sacrificados.

Los anticuerpos monoclonales se prepararon de acuerdo al protocolo de Köhler y Milstein (236) por fusión de los linfocitos del bazo con células no secretoras de inmunoglobulinas (P3X G3-Ag 8.6 5.3) de mieloma de ratón. Las células híbridas se clonaron por dilución límite.

La selección de los anticuerpos se efectuó por la capacidad de inhibir la enzima (epitope contra el sitio activo) y por inmunoperoxidasa. Los clones seleccionados se subclonaron nuevamente por dilución límite. Los medios de los clones secretantes así obtenidos fueron utilizados para la purificación de las inmunoglobulinas monoclonales respectivas, que fueron caracterizadas en términos de su estructura y de su capacidad inhibitoria.

Se obtuvieron tres clones: 32 (IgG), 17 (IgM) y 37 (IgG). A partir del clon 17, cuyo título de inhibición fue mayor que los otros, se obtuvo medio suficiente para preparar inmunoglobulina IgM purificada por DEAE-celulosa que se acopló a sepharosa 4B activada (Pharmacia).

### X.3.2. Preparación y cromatografía en columna de afinidad anti-cuerpo-sepharosa

Se pesaron 0,5 g de sepharosa activada con bromuro de cianógeno que se acopló con 1 ml de anticuerpo seleccionado IgM del clon 17 (1,05 mg/ml proteína) de acuerdo al método descrito en el apartado V.4 de Materiales y Métodos.

Se armó una columna de 0,6 x 5 cm con la resina acoplada que se equilibró con 25 mM Tris-HCl pH 7,4. Se sembraron 5 ml de la fosfodiesterasa de *Trypanosoma cruzi* obtenida de la DEAE-celulosa, previa diálisis contra el tampón A. Se dejó en contacto durante 15 horas para favorecer la interacción antígeno-anticuerpo.

La columna se lavó con el mismo tampón de equilibrio hasta obtener absorbancia a 280 nm igual a cero y se eluyó con agua bidestilada (237). Las fracciones recogidas fueron de 0,5 ml con un flujo de 0,1 ml/min.

## XI. PURIFICACION DE FOSFODIESTERASA DE AMP CICLICO DE CEREBRO BOVINO

Se homogeneizaron 650 g de corteza de cerebro bovino fresco en 1 l de 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoetanol y 0,5 mM PMSF (tampón H) con un Ultraturrax, desintegrador de tejidos modelo T 18-10 IKA. Se centrifugó a 20000 x g durante 30 minutos a 4°C, descartándose el precipitado.

El sobrenadante, S<sub>20</sub>, se sembró en una columna de DEAE-celulosa (2,5 x 40 cm) equilibrada con tampón H. Una vez pasada la muestra, la columna se lavó con 400 ml del tampón de equilibrio. Se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0,7 M NaCl. El volumen del gradiente fue de 600 ml y se recolectaron fracciones de 10 ml cada una a un flujo de 1,5 ml/min.

## Materiales y Métodos

Las fracciones con actividad de fosfodiesterasa de AMP cíclico, determinadas a 200  $\mu$ M de sustrato, que eluyeron a 0,1 M NaCl se reunieron y dializaron contra tampón H durante 15 horas. Las fracciones dializadas se recromatografiaron en una segunda DEAE-celulosa (1,5 x 20 cm) idéntica a la anterior, que se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0,6 M NaCl. El volumen del gradiente fue de 400 ml y se recogieron fracciones de 8 ml a un flujo de 1,5 ml/min.

Las fracciones correspondientes al pico de actividad de fosfodiesterasa se reunieron, se concentraron por ultrafiltración en Amicón P10 y se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  en glicerol 10%.

### XII. PURIFICACION DE CALMODULINA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Las fracciones de la columna de DEAE-celulosa del S100 de *Trypanosoma cruzi* con actividad de calmodulina (ensayada sobre la fosfodiesterasa de cerebro bovino) que eluyeron entre 0,35 y 0,4 M NaCl, se reunieron y se calentaron a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. El extracto calentado se centrifugó a 10000 x g durante 10 minutos, descartándose el precipitado. El sobrenadante fue dializado contra tampón A en bolsas de diálisis con un poro de 8000 Å (3787-F25 Arthur R. Thomas) y se liofilizó. El material sólido fue resuspendido en 1,5 ml de 25 mM Tris-HCl pH 7,4 conteniendo 0,1 M de NaCl (tampón I).

#### XII.1. FILTRACION EN GEL

El resuspendido se filtró a través de una columna de 1,5 x 60 cm que se empaquetó con resina Biogel P60 (intervalo de fraccionamiento para proteínas globulares entre 3000 y 60000), equilibrada con tampón I.

Se eluyó con el mismo tampón recogiendo fracciones de 1 ml cada una a un flujo de 0,2 ml/min.

Las fracciones con actividad de calmodulina se reunieron, dializaron y liofilizaron. El material sólido se resuspendió en agua bidestilada.

### XII.2 CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD CAPP-SEPHAROSA

La cromatografía de afinidad se efectuó en 2-cloro-10 (3-aminopropil) fenotiazina-sepharosa 4B, (CAPP)-Sepharaosa 4B. El método de preparación de la resina fue de acuerdo a Jamieson y Vanaman (238) y es similar al detallado previamente en el apartado V.1 de este capítulo.

El liofilizado correspondiente al Biogel P60 se resuspendió en 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM CaCl<sub>2</sub> y 0.2 M NaCl (Tampón J), y se aplicó a una columna de CAPP-Sepharaosa 4B equilibrada con tampón J. La columna (1,2 x 20 cm) protegida de la luz con papel de aluminio, se lavó con tampón J hasta obtener absorbancia a 280 nm igual a cero. Se eluyó con el tampón J conteniendo 10 mM EGTA pero sin CaCl<sub>2</sub>. Se recogieron fracciones de 2 ml con un flujo de 0,3 ml/min.

Las fracciones ajustadas a 10 mM CaCl<sub>2</sub>, con actividad de calmodulina se reunieron, dializaron y liofilizaron.

### XII.3. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN COLUMNA DE PHENYL-SEPHAROSA

Un método alternativo utilizado para purificar calmodulina fue la cromatografía de afinidad en columna de Phenyl-Sepharaosa (239).

En este caso, las fracciones obtenidas del Biogel P60, sin liofilizarse y previa diálisis contra tampón A, se ajustaron a 5 mM CaCl<sub>2</sub>, y se sembraron en una columna de Phenyl-Sepharaosa

## Materiales y Métodos

(2,8 x 10 cm) equilibrada con 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM 2-mercaptoetanol y 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> (tampón K). Se lavó con el tampón K hasta el cese de absorbancia a 280 nm y se realizó un segundo lavado con tampón K más 0,5 M NaCl hasta obtener nuevamente cero a D.O. a 280 nm. La columna se eluyó con 1mM EGTA en tampón K sin CaCl<sub>2</sub>. Se recolectaron fracciones de 2 ml con un flujo de 0,5 ml/min. Las fracciones con actividad de calmodulina se reunieron y dializaron contra tampón K en presencia de 1 mM CaCl<sub>2</sub>.

### XIII. PURIFICACION DE CALMODULINA DE CEREBRO BOVINO

El modulador se purificó por una modificación del método descrito por Bazari y Clarke (240). Las fracciones con actividad de calmodulina de la primera columna de DEAE-celulosa del extracto de cerebro (ver apartado XII de Materiales y Métodos) que eluyen a 0,4 M NaCl se reunieron y calentaron durante 10 minutos a 100°C. El sobrenadante se dializó y se purificó del mismo modo que el indicado para la calmodulina de *Trypanosoma cruzi* empleando la cromatografía hidrofóbica ya descrita en el apartado XII.3.

### XIV. PREPARACION DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMPc DEL HONGO *N. crassa*

La quinasa de proteínas dependiente de AMPc (tipo I) del hongo *N. crassa* se purificó en cromatografía en DEAE-celulosa de acuerdo a la técnica descrita por Judewicz y colaboradores (241).



XV. REACTIVOS UTILIZADOS

Los siguientes reactivos y resinas se obtuvieron de:

DEAE-celulosa (DE-52), DEAE-Sephadex A25, papel de filtro 3MM y papel de fosfocelulosa (P81) comprados a Whatman Chemical Separation Inc. (Clifton, New Jersey, USA).

Sephacryl S300, Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno, Agarosa-8-(6-aminohexylamino)-AMPc, Sephadex G-25 y Carboxymetil Sephadex C50. Malato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa y marcadores de bajo peso molecular para electroforesis, comprados a Pharmacia Fine Chemicals.

MOPS, Tris-base, MIX, BSA, catalasa de hígado de ternera, citocromo C de corazón de caballo, histonas, fosvitina, caseína, kemptido, protamina, clorpromazina, compuesto 48/80, AMPc, GMPc, ATP, ADP, adenosina, guanosina, NAD<sup>+</sup>, NADH, PMSF, veneno de serpiente (King cobra), gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, se compró a Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri, USA).

Anticuerpos policlonales contra las subunidades regulatorias RI y RII de eucariotes superiores fueron donados por el Dr. Brian Hemmings (Basilea, Suiza).

Flufenazina fue donada por el Dr. J.P. Rossi, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A.

Análogos del AMPc fueron donados por la Dra. S. Moreno, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A.

CAPP fue donada por el Dr. A. Manian, del National Institute of Mental Health, M.D., USA.

Aprotinina (Trasylol) de Bayer (Leverkusen, Alemania Occidental).

[<sup>32</sup>P] ortofosfato, [<sup>3</sup>H]-AMPc, [<sup>3</sup>H]-GMPc, Omnifluor, se compraron a New England Nuclear Research Products.

## Materiales y Métodos

Resinas de intercambio iónico AG<sub>1</sub>-X<sub>4</sub> (200 a 400 mesh); AG<sub>3</sub>-X<sub>4</sub> (200 a 400 mesh) y Biogel-P60 compradas a BioRad.

Membranas de diálisis compradas a Arthur R. Thomas.

Acrilamida y bisacrilamida son de IBI.

SDS, glicerol de Mallinckrodt.

Filtros (HAWP 02500 tipo HA, 0,45  $\mu\text{m}$ ) de Millipore.

Nitrocelulosa BA 0,45  $\mu\text{m}$  de Schleicher & Schull.

El resto de los reactivos y drogas utilizados fueron de grado analítico.

### III. RESULTADOS Y DISCUSION

## I. QUINASAS DE PROTEINAS EN *Trypanosoma cruzi*

### I.1. EXTRACTOS CRUDOS

El estudio de la actividad de quinasas de proteínas en sistemas crudos, ya sea en el sobrenadante de 105.000 g (S<sub>100</sub>) o en las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial, presentó diversas dificultades. En primer lugar, la gran cantidad de proteasas presentes en el extracto crudo, así como la existencia de un complejo sistema de fosforilación-defosforilación y de enzimas degradadoras del sustrato radioactivo, impidieron obtener una cinética lineal de la enzima.

En segundo lugar, la concentración intracelular de AMP cíclico enmascaraba el efecto del nucleótido agregado exógenamente, sobre las quinasas de proteínas presentes en el extracto.

Los estudios, en esta etapa, se limitaron a determinar actividad de fosfotransferasa y a la búsqueda de sustratos endógenos fosforilables. Se determinó la actividad de quinasa de proteínas en el S<sub>100</sub> y en los distintos sedimentos. La mayor actividad se encontró en el soluble (80%) y también se detectó una actividad minoritaria en los sedimentos de 5.000 x g y 30.000 x g. Con el fin de identificar los sustratos solubles fosforilables, se incubó el S<sub>100</sub> a 4°C y 30°C con  $\gamma^{32}$  P-ATP y Mg<sup>+2</sup>, en las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

Se analizaron las muestras fosforiladas en geles de poli-acrilamida en condiciones disociantes. En la autorradiografía correspondiente (Figura III-1) se observa una serie de bandas de diversos tamaños (16,5 a 100 Kd) cuya fosforilación fue dependiente de la temperatura, ya que no hubo incorporación de  $\gamma^{32}$ P a

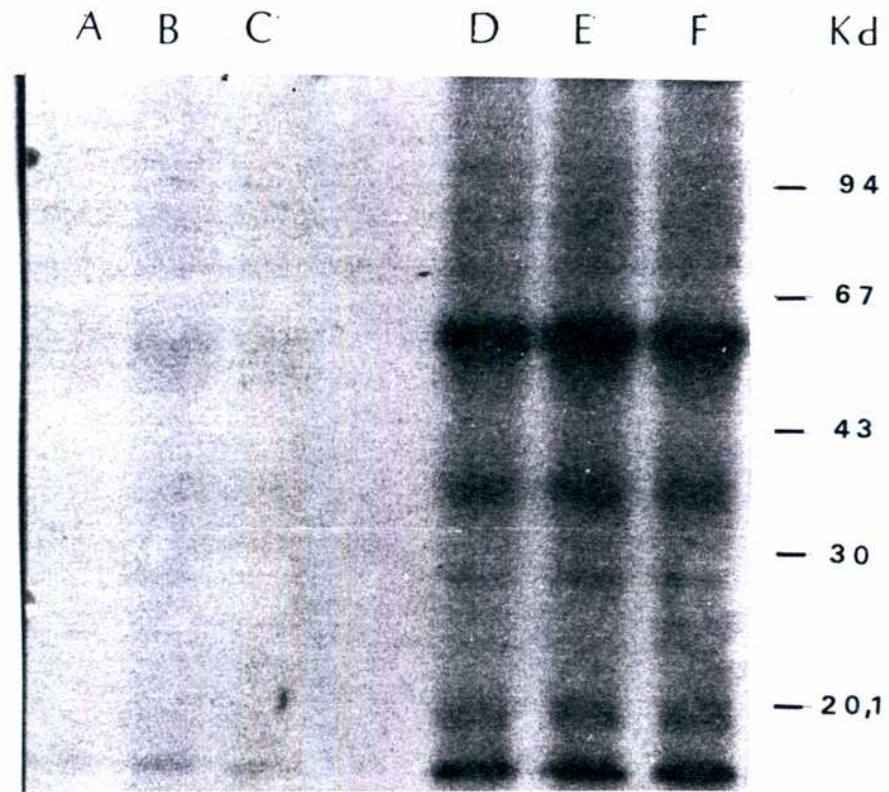


Figura III-1: Autofosforilación del extracto crudo (S100) de *Trypanosoma cruzi*. Se incubó el S100 de *T. cruzi* (200 µg proteína) con 10 µM  $\gamma$ <sup>32</sup>P-ATP (1000 cpm/pmol) y 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> durante 2 min en distintas condiciones: a 4°C (carriles A,B,C) y a 30°C (carriles D,E,F).

Carriles A y D: sin adiciones, B y E: con 0,1 mM dibutiril AMPc, C y F: con 1 mM dibutiril AMPc. Las flechas indican los pesos moleculares de las proteínas marcadoras.

4°C. Entre las bandas se destacó una de 56 Kd cuya fosforilación se incrementó cuando el extracto crudo se incubó con dibutiril AMPc.

Para caracterizar las quinasas de proteínas solubles se procedió a la purificación de las mismas.

### I.2. CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA

El sobrenadante de 105.000 g, en presencia de inhibidores de proteasas, se sembró en una columna de DEAE-celulosa que se eluyó con un gradiente salino. Se determinó actividad de quinasa de proteínas a todas las fracciones eluidas de la columna, incluyendo el lavado y el percolado. En los ensayos de rutina se utilizó histona II-AS y kemptido como sustratos aceptores.

Un perfil característico se observa en la Figura III-2. La actividad de quinasa eluyó en dos picos a 0.15 M y 0.32 M NaCl que se denominaron PKI y PKII, respectivamente. Cuando la actividad de fosfotransferasa se determinó con kemptido, se resolvió un tercer pico que coeluyó parcialmente con el primero. Cuando se utilizó caseína o fosvitina como sustrato se observó una actividad quinásica minoritaria. Todos los ensayos mencionados se realizaron en ausencia y presencia de 1  $\mu$ M AMPc. La PKI y el kemptido resultaron insensibles al agregado del nucleótido, mientras que la PKII se estimuló positivamente en presencia de AMPc (Figura III-2).

Paralelamente, se determinó la capacidad de unir [<sup>3</sup>H]-AMPc a las fracciones citadas anteriormente. El pico mayoritario coeluyó con la actividad de fosfotransferasa de PKII a 0.32 M NaCl. Además, se detectó un pico menor con capacidad de unir AMPc que eluyó entre 0.14 y 0.22 M NaCl. El ensayo se realizó en au-

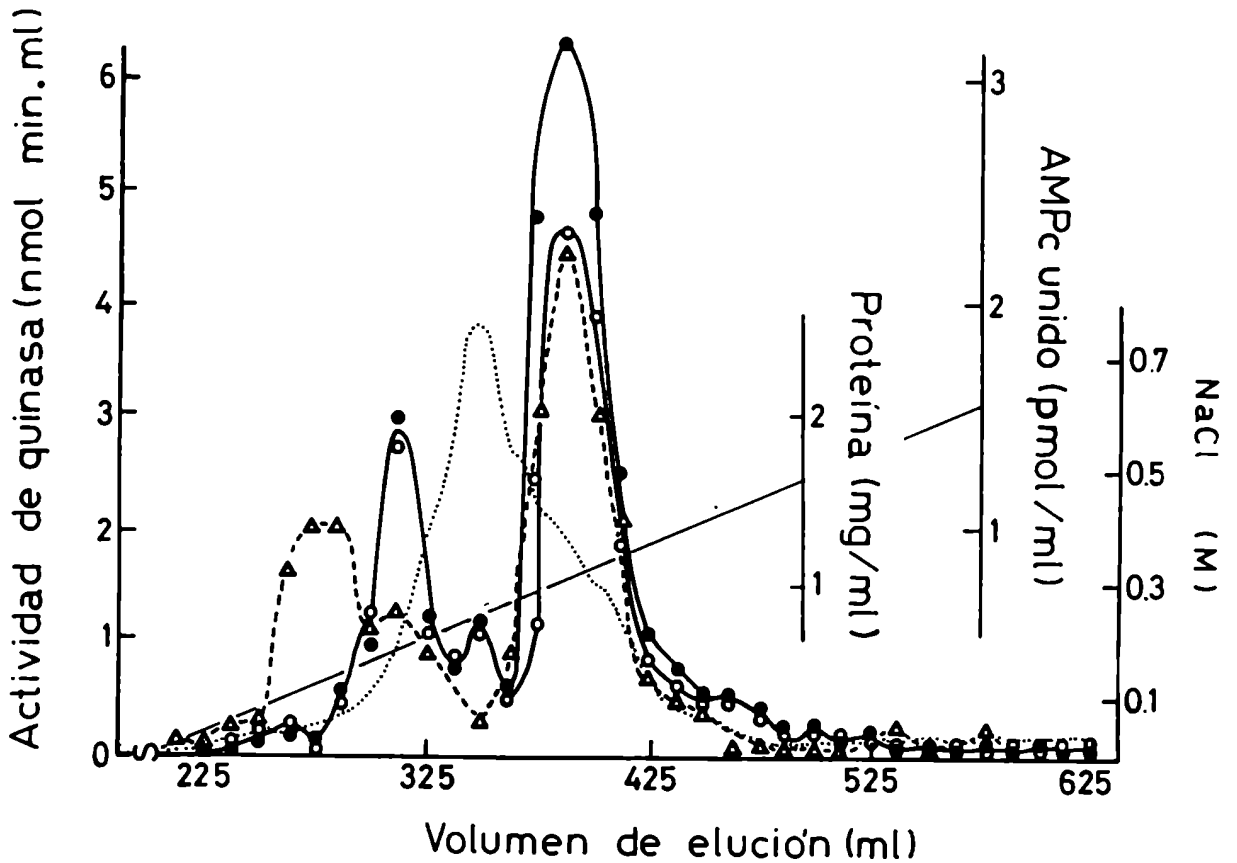


Figura III-2: Cromatografía en DEAE-celulosa. Perfil de elución de las actividades de quinasa de proteínas y de unión a AMPc de *T. cruzi*.

La actividad de quinasa se determinó con (●-●) y sin (○-○) 1 μM AMP cíclico; (Δ-Δ) capacidad de unión de AMPc; (.....) concentración de proteínas; (—) gradiente salino.

Las condiciones están descritas en Materiales y Métodos.

sencia o presencia de 100  $\mu\text{M}$  AMPc frío, para determinar si la unión era específica. En todos los casos el desplazamiento fue total.

Las fracciones con actividad de quinasa dependiente de AMPc (PKII) se reunieron, se concentraron con sulfato de amonio y luego de dializadas se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La fracción congelada conservó su actividad enzimática durante 40 días.

### I.3. ACTIVACION POR AMPc

La preparación de PKII obtenida de la DEAE-celulosa se incubó con concentraciones crecientes de AMPc frío ( $10^{-10}\text{M}$  a  $10^{-6}\text{M}$ ) durante 10 minutos a  $30^{\circ}\text{C}$ . En la Figura III-3 se observa que la enzima incrementó cuatro veces su actividad basal en presencia de AMPc, obteniéndose un 50% de estimulación a concentraciones nanomolares del nucleótido (1 nM).

El GMPc no modificó la actividad de la enzima (resultados no mostrados).

### I.4. ESPECIFICIDAD DE LA UNION A AMPc

Se comprobó la especificidad de la unión a [ $^3\text{H}$ ]-AMPc de las enzimas PKI y PKII de *Trypanosoma cruzi*, en términos del desplazamiento del nucleótido marcado por el agregado de 10 o 100  $\mu\text{M}$  de AMPc frío o por la adición de otros análogos. Se estudiaron dos preparaciones diferentes de PKII: la enzima obtenida de la DEAE-celulosa y el componente regulatorio de la PKII, obtenido por cromatografía de afinidad en AMPc-agarosa como se describió en Materiales y Métodos.

Paralelamente, se determinó la especificidad de la unión a AMPc de la subunidad regulatoria (RII) de corazón bovino, con la cual se comparó las enzimas del *Trypanosoma*.



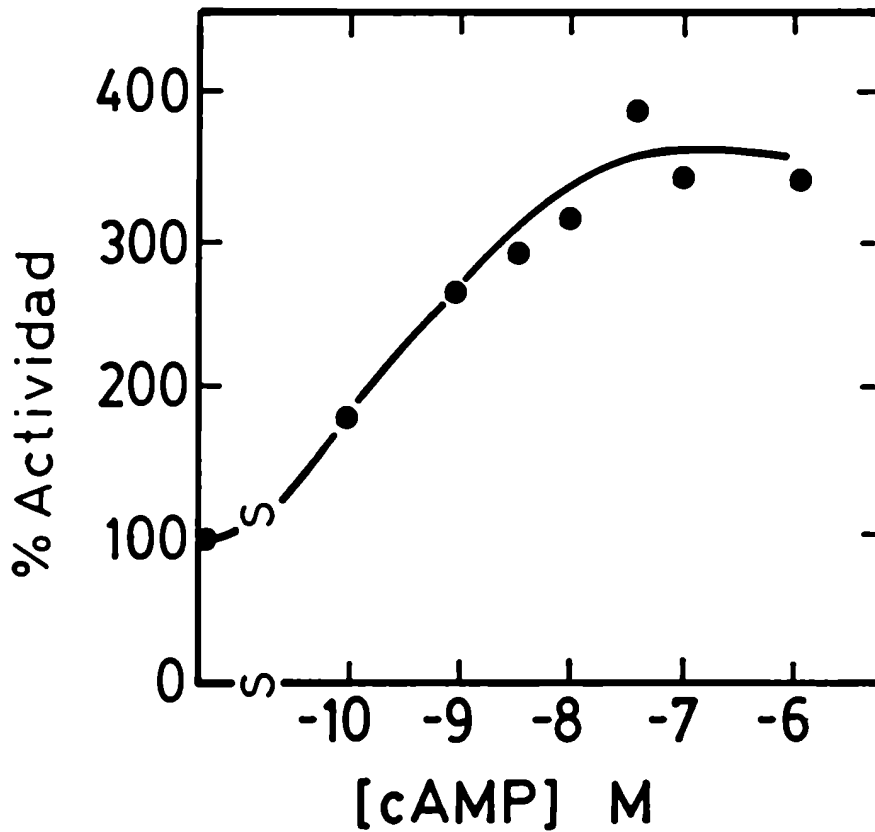


Figura III-3: Actividad de quinasa de proteínas en función de la concentración de AMPc. Como fuente de enzima se utilizó la PKII de *T. cruzi* (26  $\mu$ g proteína/ensayo) proveniente de una DEAE-celulosa. Las condiciones del ensayo están descritas en el capítulo Materiales y Métodos.

Como se detalla en la Tabla III-1, PKI y PKII unen específicamente AMPc. El GMPc no desplazó al nucleótido marcado, como tampoco lo hicieron el ATP, el 5'AMP o la adenosina. Los análogos del AMPc, C<sup>8</sup>-bromo-AMPc y N<sup>6</sup>-monobutiril AMPc, son específicos para los sitios 1 y 2 respectivamente, de la RII de corazón. El C<sup>8</sup>-bromo-AMPc desplazó el 76% del [<sup>3</sup>H]-AMPc unido al componente regulatorio de la PKII de *T. cruzi* y el 90% del unido a la RII de corazón, en cambio, el N<sup>6</sup>-monobutiril únicamente desplazó el 60% y el 81% del nucleótido marcado unido a dichas subunidades.

En la Figura III-4, se observa el desplazamiento del [<sup>3</sup>H]-AMPc unido a las subunidades regulatorias de *T. cruzi* (a) y de corazón (b), en función de concentraciones crecientes del nucleótido frío o de los análogos ya mencionados. Los ensayos se determinaron a tiempos fijos.

Tanto en *T. cruzi* como en corazón, el AMPc frío desplazó más eficientemente al nucleótido marcado que ambos análogos y el C<sup>8</sup>-bromo fue mejor competidor que el N<sup>6</sup> sustituido. Es interesante notar que, a iguales concentraciones utilizadas, ambos análogos desplazaron mayor proporción del [<sup>3</sup>H]-AMPc unido a la subunidad RII de corazón que el unido a la enzima de *T. cruzi*. Se podría concluir que la enzima del parásito posee sitios con menor afinidad por los análogos del AMPc que la enzima de corazón.

### I.5. ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO

Diversas proteínas se ensayaron como aceptores de fosfato de la PKII obtenida por cromatografía en DEAE-celulosa. En la Tabla III-2 se observa que la histona VII-S (F2b) y el kemptido fueron los sustratos óptimos de dicha enzima. Sin embargo, histona II-AS y protamina también fueron buenos sustratos. Cuando se determinó la actividad de PKII en presencia de AMPc, la mejor ac-

## Resultados y Discusión

TABLA III-1. Especificidad de la unión a AMP cíclico de las preparaciones de *Trypanosoma cruzi* y corazón bovino. Las condiciones del ensayo se describieron en Materiales y Métodos.

Adiciones	Concentración ( $\mu$ M)	[ $^3$ H]-AMPc unido (%)			
		PKI <sub>a</sub>	PKII <sub>b</sub>	PKII <sub>c</sub>	RII <sub>d</sub>
Sin	---	100	100	100	100
AMP cíclico	10	34	27	20	10
	100	17	3	5	3
GMP cíclico	10	103	84	100	nd
	100	85	84	90	nd
C <sup>8</sup> -Bromo-AMPc	10	nd	nd	33	15
	100	nd	nd	24	10
N <sup>6</sup> -monobutiril AMP cíclico	10	nd	nd	48	30
	100	nd	nd	38	18
ATP	10	99	88	nd	nd
	100	60	88	nd	nd
5' AMP	10	89	108	nd	nd
	100	56	96	nd	nd
Adenosina	10	89	64	nd	nd
	100	67	49	nd	nd

nd = no determinado

- a. *T. cruzi* obtenida de DEAE-celulosa; actividad específica=1,7 pmol unido/mg
- b. *T. cruzi* obtenida de DEAE-celulosa; actividad específica=3,6 pmoles unidos/mg proteína
- c. *T. cruzi* "componente regulatorio" purificado por cromatografía de afinidad en "cAMP-agarosa"; actividad específica=98 pmoles unidos/mg proteína
- d. Subunidad regulatoria tipo II (RII) de corazón bovino; actividad específica=1 nmol unido/mg proteína

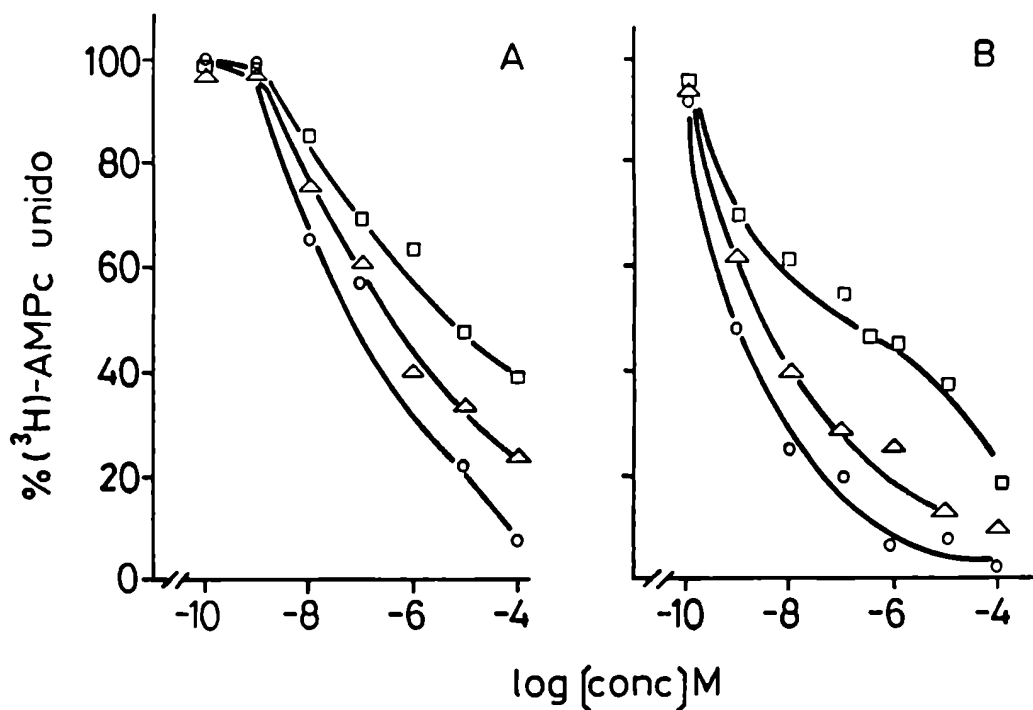


Figura III-4: Desplazamiento del  $^3\text{H}$ -AMPc unido a la subunidad RII de corazón (A) o a la subunidad reguladora de *T. cruzi* (B). ( $\square$ - $\square$ ) N<sup>6</sup>-dibutiril-AMPc; ( $\Delta$ - $\Delta$ ) C<sup>8</sup>-bromo-AMPc y ( $\circ$ - $\circ$ ) AMPc. La subunidad RII de corazón (actividad específica=1 nmol unido/mg proteína) se obtuvo de una columna de afinidad AMPc-agarosa. El componente regulador de *T. cruzi* (actividad específica = 98 pmol unido/mg proteína) se purificó por cromatografía de afinidad en AMPc-agarosa. Las condiciones del ensayo se describen en Materiales y Métodos.

TABLA III-2. Especificidad de sustratos para PKII

[100 $\mu$ M]	nmoles $^{32}$ P incorp/min/mg	
		+ [cAMP] $10^{-8}$ M
Sin adiciones	0,18	0,26
Histona 7S	1,47	1,76
Kemptide	1,49	5,2
Histona 2AS	1,26	3,15
Protamina	0,86	1,4
Histona 6S	0,43	0,67
Histona 3S	0,32	0,44
Histona 8S	0,30	0,43
Caseína	0,24	0,31
Fosvitina	0,16	0,30

tivación se obtuvo con kemptido o histona como sustratos fosforilables. Esto es característico de una quinasa dependiente de AMPc, ya que el kemptido representa el sitio de fosforilación de un sustrato de dicha quinasa en eucariotes superiores (piruvato quinasa).

Los ensayos subsiguientes fueron realizados con kemptido o histona II-AS. Se determinó la concentración óptima para ambos sustratos, siendo ésta de 25  $\mu$ M para kemptido y 2 mg/ml para histona II-AS.

Los picos I y II de *T. cruzi* tienen marcada preferencia por los sustratos básicos, siendo caseína y fosvitina aceptores inadecuados de las quinasas solubles del parásito. El tercer pico con actividad de quinasa sólo se detectó con kemptido y es específico para el heptapéptido.

Es importante destacar que, en ensayos de PKII realizados en ausencia de sustrato agregado exógenamente, se detectó fosforilación.

### I.6. CURVA DE $Mg^{2+}$

Se determinó la actividad de PKII en presencia de cantidades crecientes de  $Mg^{2+}$ . El óptimo de fosforilación se obtuvo a 5 mM  $Mg^{2+}$ , concentración con la cual se continuó trabajando. Concentraciones mayores del metal inhibieron levemente la enzima (Figura III-5).

### I.7. CONCENTRACION DE ATP

La enzima obtenida de un Sephacryl S300 se incubó con concentraciones crecientes del sustrato ATP y se mantuvo fija la concentración de  $Mg^{2+}$  en 5 mM y la de histonas en 2 mg/ml.

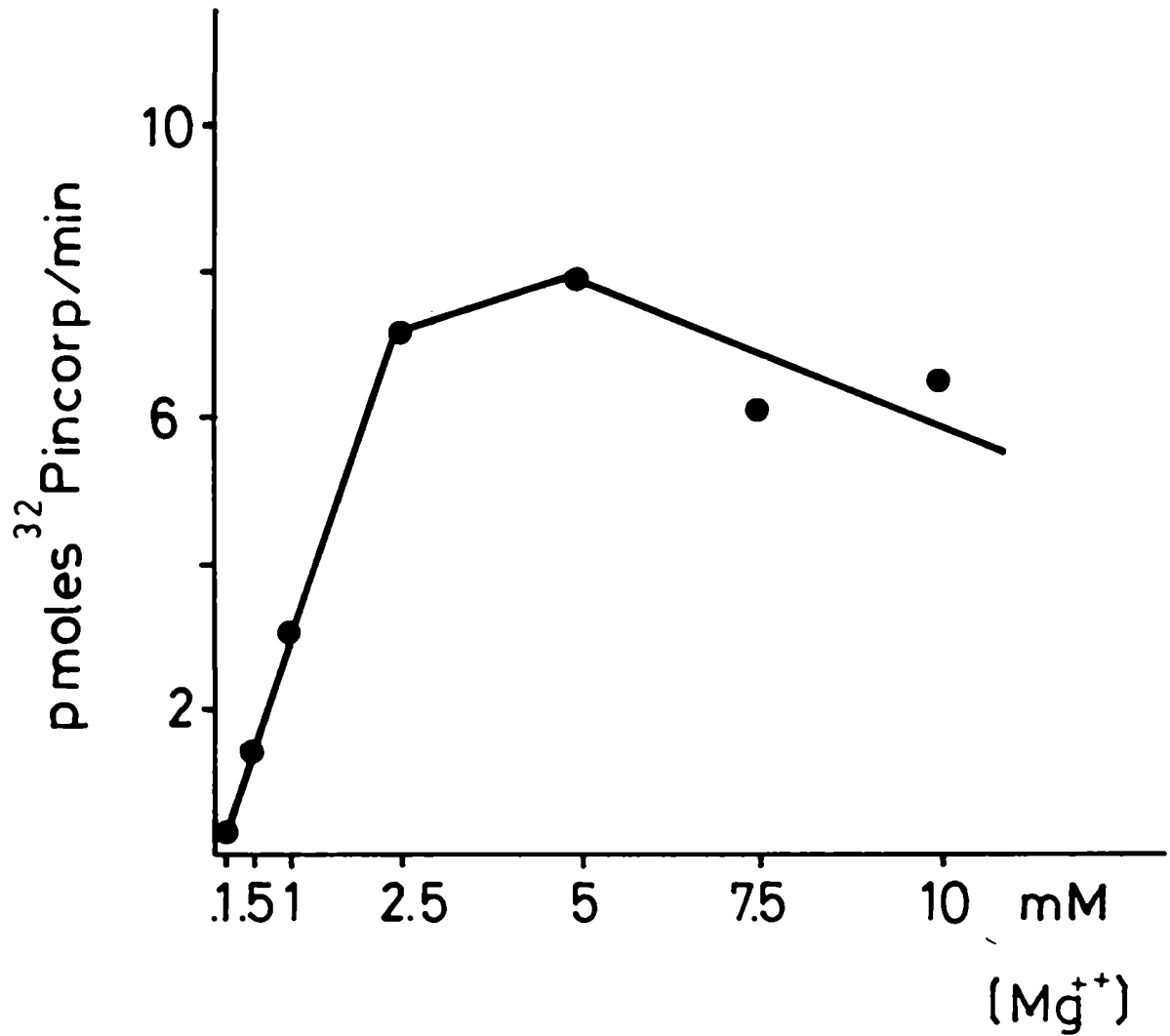


Figura III-5: Curva de Mg<sup>2+</sup>. Como fuente de enzima se utilizó la PKII de *T. cruzi* (10 µg/ensayo) proveniente de una DEAE-celulosa. Las condiciones del ensayo se describen en Materiales y Métodos.

## Resultados y Discusión

De acuerdo al gráfico de Lineweaver-Burke (Figura III-6), se obtuvieron los siguientes valores de velocidad máxima,  $V_{m\acute{a}x}$ , y de afinidad de la enzima por su sustrato,  $K_m$ . En ausencia de AMPc, el  $K_m$  de la enzima fue  $75 \mu M$  y la  $V_{m\acute{a}x}$   $1,65 \text{ nmoles } ^{32}P\text{-incorporado/ min.mg}$ . En presencia de AMPc no se modificó el  $K_m$  de la enzima, pero la  $V_{m\acute{a}x}$  aumentó a  $6,7 \text{ nmoles } ^{32}P\text{incorporado/min. mg}$  (dato no mostrado).

### I.8. EFEECTO DE SALES

Se incubó el pico de la DEAE-celulosa correspondiente a PKII en presencia de concentraciones crecientes de NaCl. Como observa en la Figura III-7, la actividad de la enzima decayó rápidamente a partir de  $0,1 \text{ M NaCl}$  y se inhibió por completo a  $0,4 \text{ M}$ . El agregado de AMPc no revirtió la inhibición; sin embargo, luego de una diálisis prolongada o desalado en columnas de filtración, se recuperó la actividad enzimática.

## II. PURIFICACION DE LA PKII

Hasta el momento se había caracterizado una quinasa de proteínas que eluía a  $0,32 \text{ M NaCl}$ , fosforilaba preferentemente sustratos básicos, se activaba en presencia de concentraciones nanomolares de AMPc y unía el nucleótido específicamente. A partir de estos resultados se trató de caracterizar y dissociar la putativa "holoenzima" en sus subunidades correspondientes.



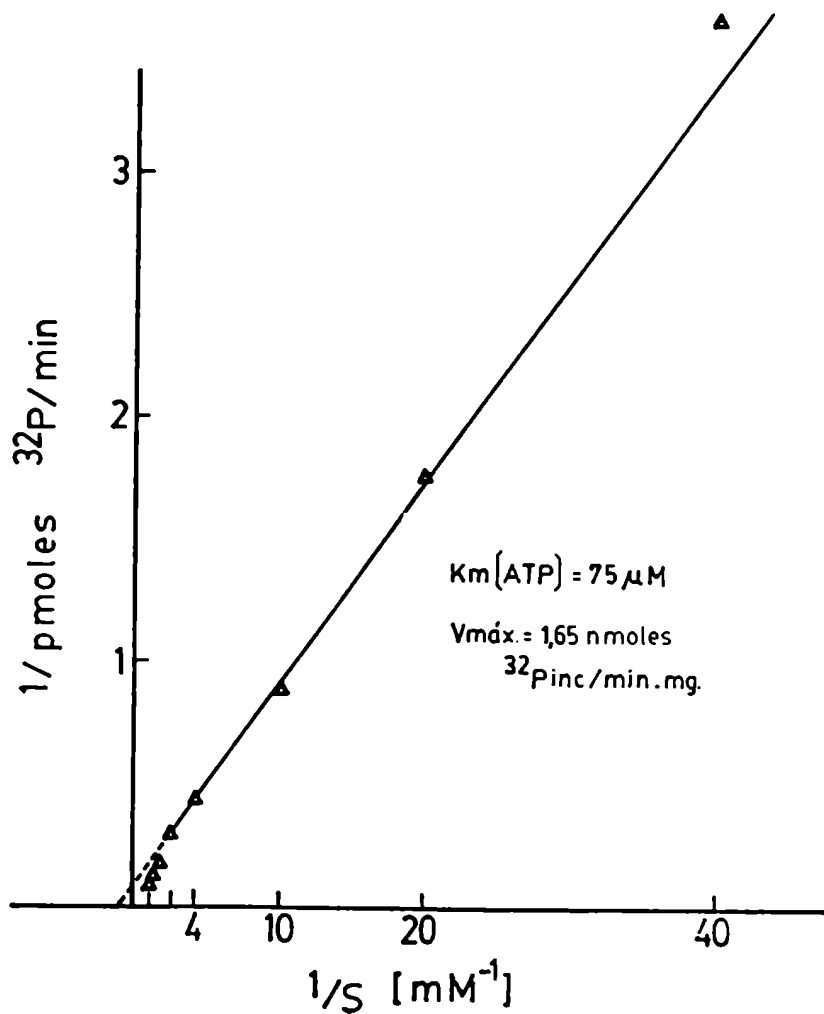


Figura III-6: Gráfico de Lineweaver-Burke mostrando la actividad de PKII en función de la concentración de ATP, en ausencia de AMPc. Como fuente de enzima se utilizó la holoenzima de *T. cruzi* (10  $\mu\text{g}/\text{ensayo}$ ) purificada en Sephacryl S300 (Figura III-8A). Las condiciones del ensayo están descriptas en Materiales y Métodos.

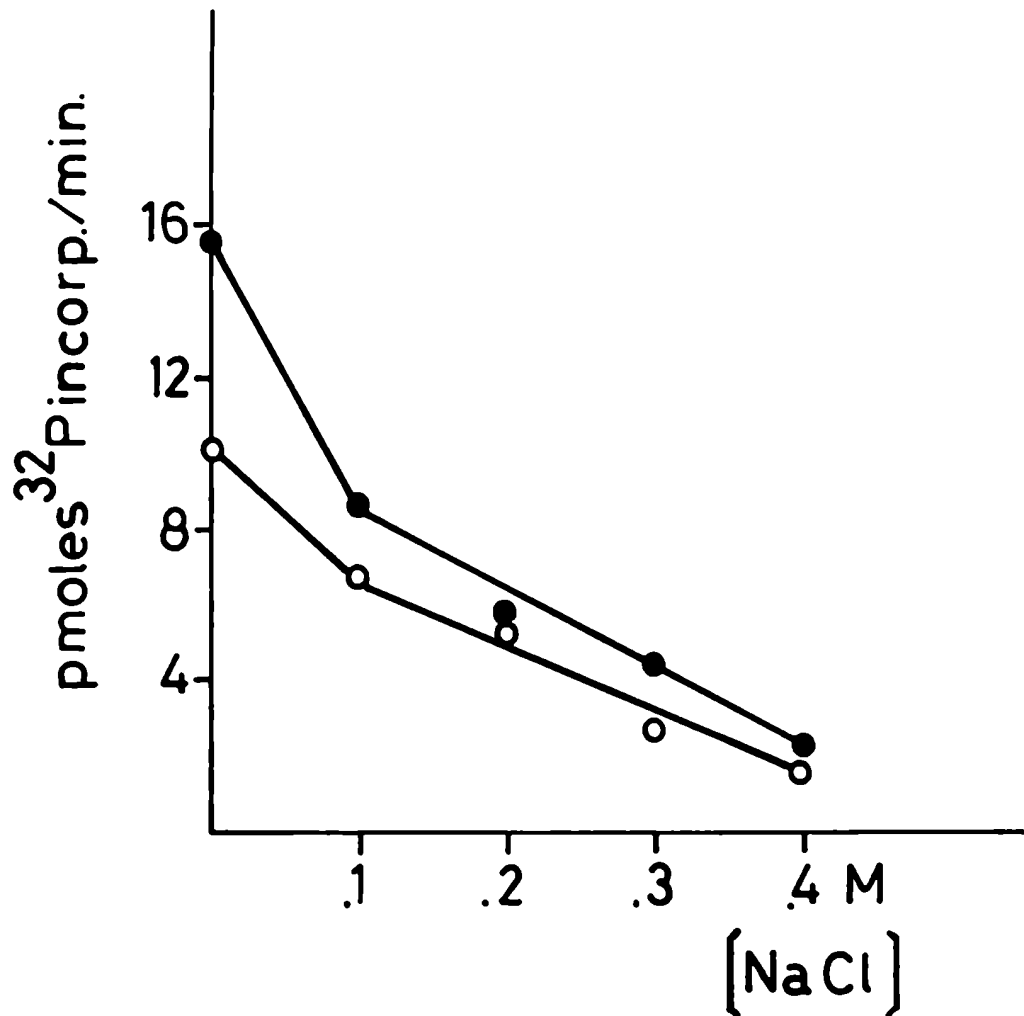


Figura III-7: Efecto de la concentración salina. La PKII de *T. cruzi* (15  $\mu\text{g}$  proteína) obtenida de la DEAE-celulosa se incubó con ( ) o sin ( )  $10^{-6}\text{M}$  AMPc en presencia de concentraciones crecientes de NaCl. Otras condiciones están descriptas en Materiales y Métodos.

II.1. CROMATOGRAFÍA EN SEPHACRYL S300

LA PKII precipitada con S.A. proveniente de la DEAE-celulosa se sembró en una columna de Sephacryl S300 equilibrada con tampón A y 0.1 M NaCl. Se eluyó con el mismo tampón de equilibrio y se obtuvo un único pico con actividad de fosfotransferasa asociada a la capacidad de unir AMPc que se denominó "holoenzima". En la Figura III-8A se observa que el Kel ( $V_e/V_o$ ) de la holoenzima fue 1,25.

Con el fin de disociar la "holoenzima" se la dializó contra tampón B más 2 mM AMPc. Se sembró la muestra dializada, en un Sephacryl S300 equilibrado con tampón B más 0.1 mM AMPc y se la eluyó con el mismo tampón. Se resolvieron dos picos, uno con el mismo Kel de la holoenzima, con actividad de fosfotransferasa asociada a la capacidad de unir AMPc y un segundo pico con un Kel mayor (1,86) que sólo tenía actividad fosfotransferasa (Figura III-8B).

Este segundo pico no se activó en presencia de AMPc, comportándose como una subunidad catalítica libre. En estas condiciones se disoció parcialmente la quinasa en subunidades catalíticas libres y en subunidades regulatorias. Estas últimas coeluyeron junto a otras especies moleculares, probablemente  $R_2C$   $R_2C_2$  (holoenzima). La enzima de *T. cruzi* mostró un comportamiento anómalo para una quinasa dependiente de AMPc porque no se disoció completamente en presencia de concentraciones milimolares (0,1 y 2 mM) del nucleótido. Sin embargo, otros autores (242,243) han descrito lo mismo para la enzima de *Mucor rouxii*.

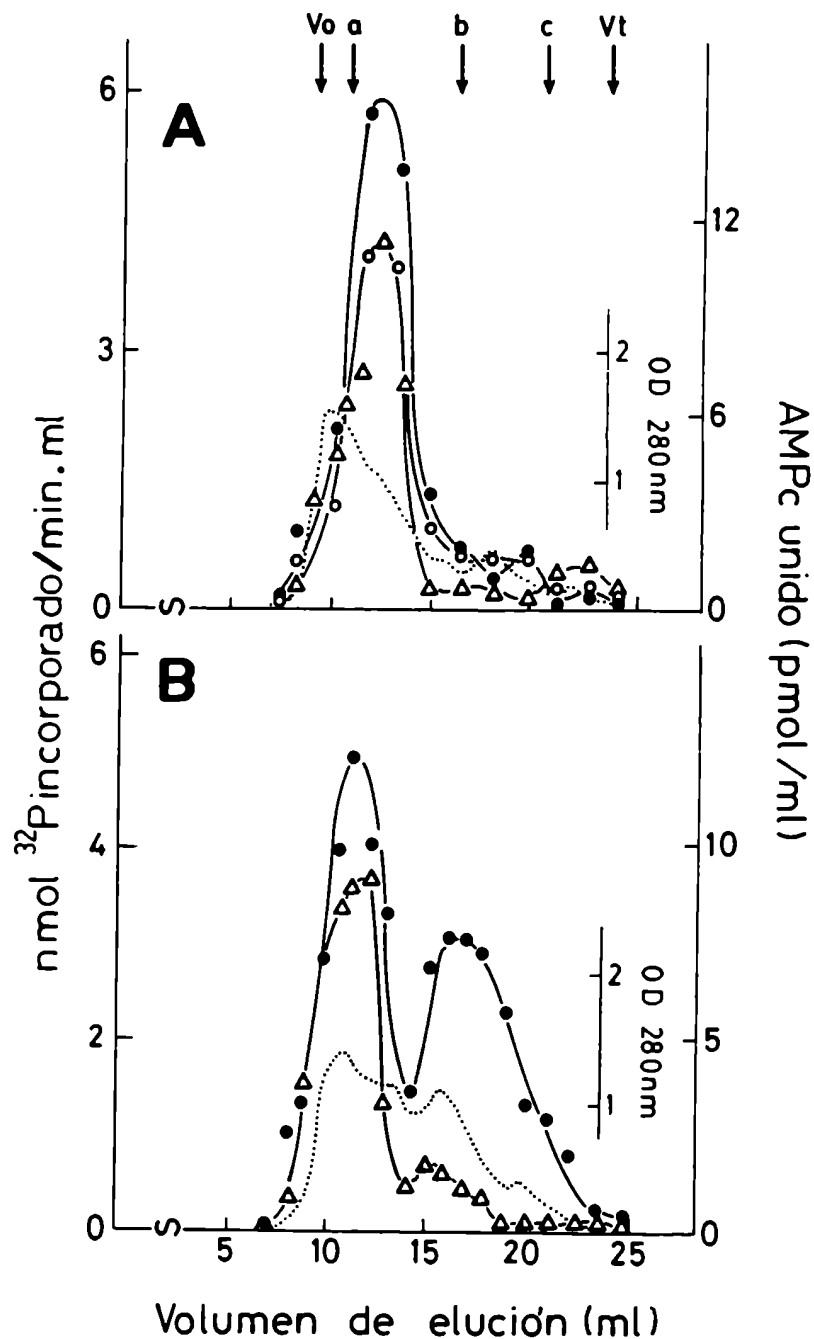


Figura III-8: Perfil de elución de las actividades de quinasas de proteínas y de unión a AMPc de la PKII de *T. cruzi* cromatografiada en una columna de Sephacryl S300.  
 A. La fracción S.A., obtenida de la DEAE-celulosa, se sembró en un Sephacryl S300 equilibrado con tampón A y 0.1 M NaCl. Se eluyó con el mismo tampón.  
 B. La fracción S.A. se dializó contra tampón C y se sembró en una columna de Sephacryl S300 equilibrada con tampón A con 0,1 M NaCl y 0,1 mM AMPc. Se eluyó con el tampón de equilibrio. Las fracciones eluidas se dializaron 48 h contra tampón A previamente a determinar la capacidad de unión a AMPc.  
 Se determinó actividad de quinasas de proteínas con (●—●) o sin (○—○)  $10^{-8}$ M AMPc; (Δ—Δ) capacidad de unir AMPc; (.....) D.O. a 280 nm. La columna se calibró con los siguientes marcadores: azul de dextrano (Vo), catalasa (a), BSA (b), citocromo c (c) y  $CoCl_2$  (Vt).

## Resultados y Discusión

Para disociar la PKII de *Trypanosoma cruzi* se preincubó la PKII con histona II-AS (1 mg/ml),  $10^{-6}$  M AMPc y 0,5 M NaCl y luego se la sembró en un Sephacryl S300 equilibrado con tampón B con 0,5 M NaCl. En la Figura III-9A se observa el perfil de elución de la enzima. Se resolvieron dos picos con los mismos Kel que en el caso antes mencionado, pero se logró una separación más definida de la subunidad catalítica libre. El pico de mayor peso molecular se activa con AMPc, lo cual indicaría que es una holoenzima o R<sub>2</sub>C. La capacidad de unión a AMPc está un poco desplazada de la actividad de fosfotransferasa y podría considerarse que es una subunidad regulatoria libre. Otros autores (82) trabajando con la enzima de corazón han observado que la holoenzima y el dímero regulatorio no se resuelven bien en Sephacryl S300 porque sus radios de Stokes son muy similares.

Paralelamente se purificó la quinasa dependiente de AMPc de corazón bovino, siguiendo el protocolo detallado en el capítulo anterior. Al igual que a la enzima de *T. cruzi*, se la preincubó con histona, AMPc y NaCl y se sembró la muestra en el mismo Sephacryl S300 equilibrado con 0,5 M NaCl. En la Figura III-9B se observa que se resolvieron dos picos: el primero, con características de holoenzima, eluyó con un Kel de 1,17 y el segundo, únicamente con actividad catalítica, eluyó antes que la subunidad catalítica del parásito. La disociación parcial de la quinasa de corazón pudo ser consecuencia de la concentración de enzima con la cual se trabajó (12,2 mg/ml). Rangel-Aldao y Rosen (92) observaron que se requieren concentraciones de AMPc mayores que 1 mM para disociar altas concentraciones de enzima. Otros autores (82) obtuvieron el mismo perfil en Sephacryl S300, en experimentos de reasociación de la holoenzima de corazón a partir de sus subunidades purificadas.

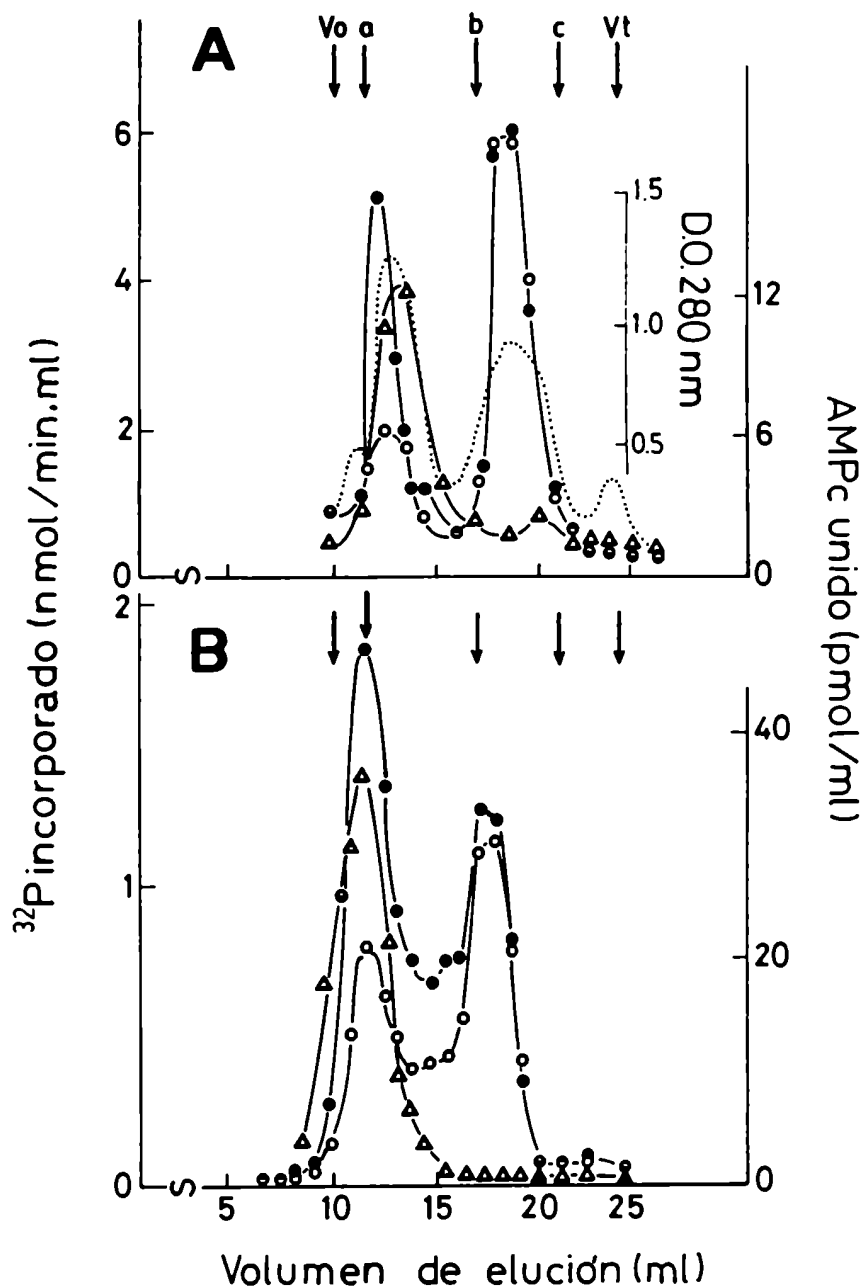


Figura III-9: Filtración en columna de Sephacryl S300, equilibrada con tampón A y 0,5 M NaCl, de la PKII de *T. cruzi* (A) y de la quinasa de corazón bovino (B).

A: La fracción S.A. de *T. cruzi* obtenida de una DEAE-celulosa se preincubó 10 min a 0°C en presencia de 1,5 mg/ml histona II-AS, 1  $\mu$ M AMPc y 0,5 M NaCl y se sembró en el Sephacryl S300. La columna se eluyó con el tampón de equilibrio.

B: Lo mismo que A, pero con la enzima de corazón bovino obtenida de una DEAE-celulosa.

Se determinó actividad de quinasa de proteínas con (●—●) o sin (○—○)  $10^{-6}$  M AMPc. ( $\Delta$ — $\Delta$ ) capacidad de unir AMPc, (-----) D.O. a 280 nm.

Las otras condiciones se describen en Materiales y Métodos.

Los radios de Stokes de las subunidades catalíticas del parásito y de corazón fueron: 2,2 nm y 2,8 nm, respectivamente. De estos resultados se puede inferir que el "componente catalítico" de la enzima de *T. cruzi* es menor que la subunidad de corazón.

### II.2. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD HISTONA-SEPHAROSA

Otro método usado para intentar disociar la holoenzima fue la cromatografía de afinidad en histona-Sepharosa. Se eligió la histona II-AS por ser un buen sustrato de la quinasa de *T. cruzi*.

Se sembraron 3 ml de la fracción "holoenzima", obtenida del Sephacryl S300 eluido a 0,1 M NaCl (Figura III-8A), en la columna de afinidad histona-Sepharosa. La siembra fue lenta para favorecer la interacción enzima-ligando y luego se lavó la columna hasta D.O. a 280 nm igual a cero. Se eluyó con alta fuerza iónica para romper el complejo formado.

En la Figura III-10 se observa el perfil de elución de la quinasa en dicha columna. Gran parte del sembrado percoló dada la limitada capacidad de la resina. Luego del agregado de una solución con alta concentración salina se resolvieron dos picos: el primero con características de "holoenzima", es decir con capacidad de unir AMPc específicamente y con actividad de fosfotransferasa activable por el nucleótido y un segundo pico únicamente con actividad catalítica no regulada por AMPc y sin capacidad de unir el nucleótido.

Rutherford y colaboradores (244) utilizando una columna de afinidad histona-Sepharosa disociaron la quinasa dependiente de AMPc de *D. discoideum* en sus subunidades. La enzima de *T. cruzi*, en cambio, sólo se disoció parcialmente indicando diferencias en el comportamiento de ambas quinasas.

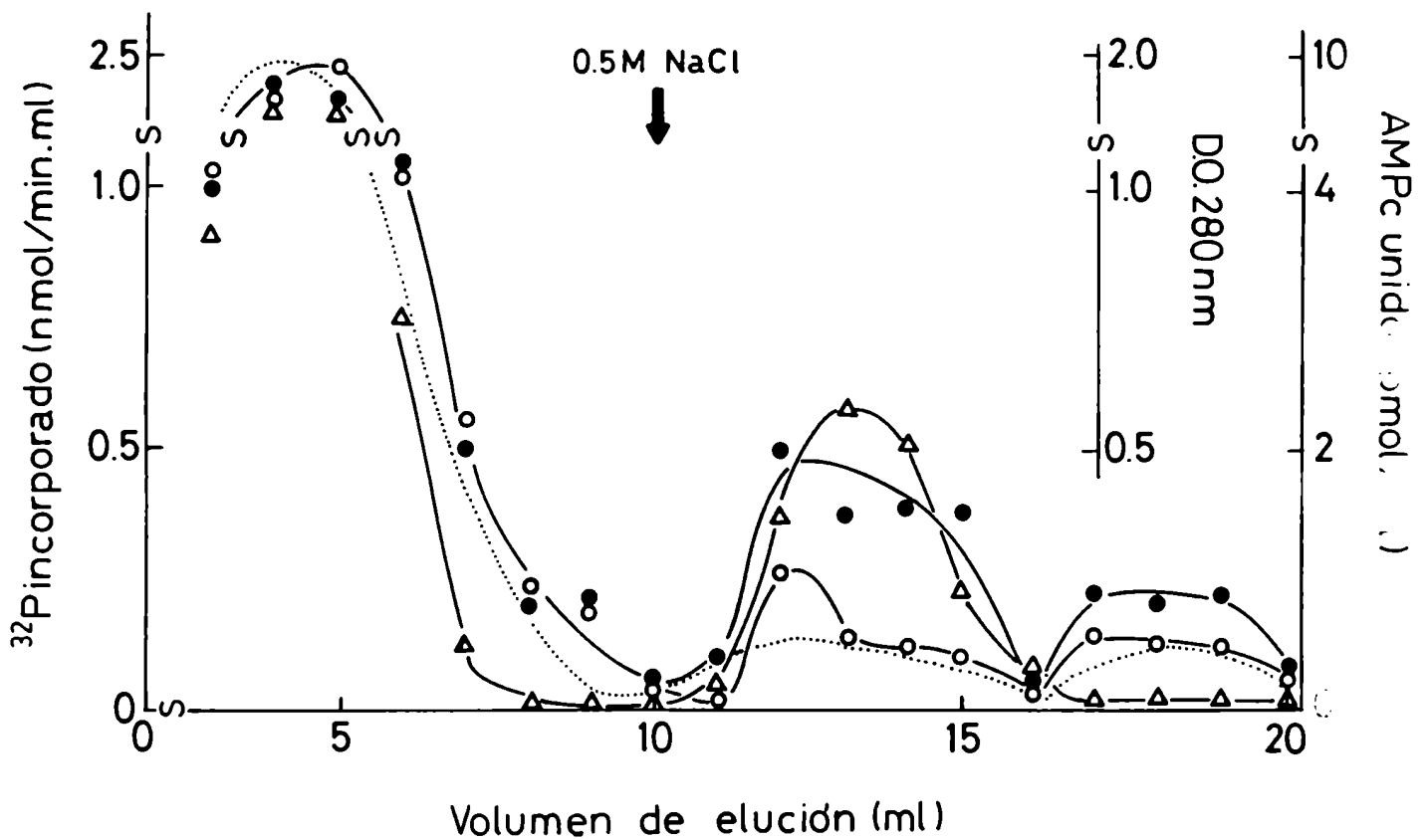


Figura III-10: Cromatografía de afinidad Histona-Sepharosa. La 'holoenzima' de *T. cruzi* obtenida de un Sephacryl S300 (Figura III-8A) se sembró en una columna de afinidad histona IIAS-Sepharosa. Las condiciones están descritas en Materiales y Métodos. Se determinó actividad de quinasa de proteínas con (●-●) o sin (○-○) AMPc; (Δ-Δ) capacidad de unir AMPc; (-----) D.O. a 280 nm.



### II.3. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD "AMPc-AGAROSA"

Con el objeto de obtener subunidades catalíticas y regulatorias libres se cromatografió la PKII de *T. cruzi* proveniente de una DEAE-celulosa en una columna de afinidad "AMPc-agarosa", de acuerdo al método descrito para las quinasas dependientes de AMPc de mamíferos. La subunidad regulatoria quedó retenida al unirse al AMPc inmovilizado en la matriz, mientras que la subunidad catalítica percoló.

Como se observa en la Figura III-11, parte de la "holoenzima" percoló, probablemente por falta de capacidad de la columna. Por recromatografía de este percolado se pudo obtener nuevamente el mismo perfil de elución (resultados no mostrados). La subunidad regulatoria que se obtuvo por este método se eluyó con 30 mM AMPc y no con 0,1 mM indicando que este componente se comporta en forma similar a la RII de corazón. Además se observó una actividad marginal de fosfotransferasa asociada a la capacidad de unir AMPc.

Se repitió este experimento con la enzima de corazón bovino que se eluyó a 10 mM obteniéndose las subunidades regularias y catalíticas correspondientes.

### II.4. CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G25-CM50

Otro método empleado para lograr la disociación de la quinasa del parásito fue la cromatografía mixta en Sephadex G-25-CM-Sephadex C-50. Se sembró el S.A. obtenido de la DEAE-celulosa en una columna de doble capa de Sephadex G25-CM50 equilibrada con 0,1 mM AMPc que, previos lavados con el mismo tampón, se eluyó aumentando la fuerza iónica del eluyente, en ausencia de AMPc.

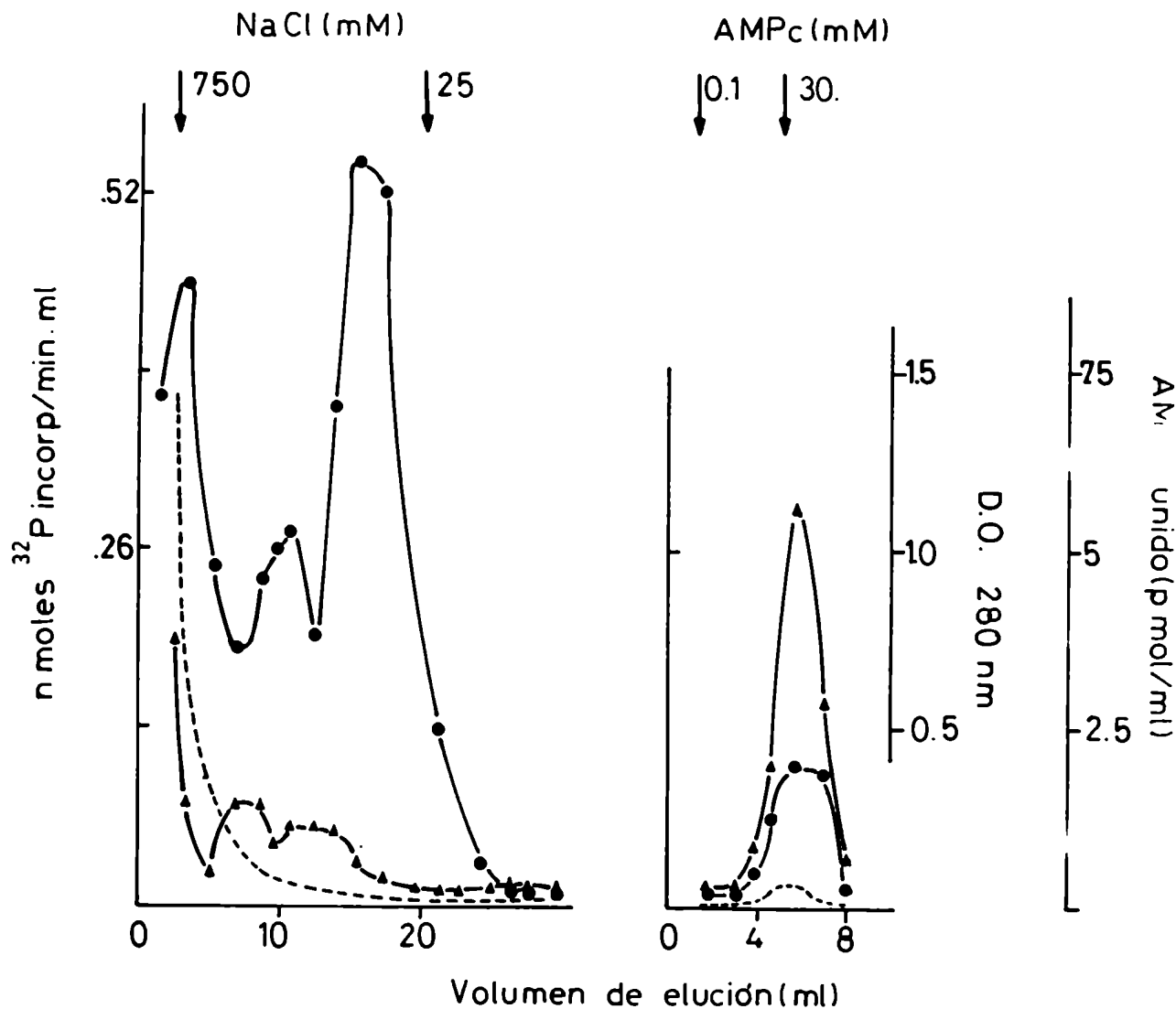


Figura III-11: Cromatografía de afinidad AMPc-agarosa. La PKII de *T. cruzi* proveniente de la DEAE-celulosa se cromatografió en una columna de afinidad AMPc-agarosa que se eluyó de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos. Las flechas indican los distintos eluyentes utilizados. (●-●) actividad de quinasa de proteínas determinada en ausencia de AMPc; (▲-▲) capacidad de unir AMPc; (-----) D.O. a 280 nm.

A las fracciones eluidas y previamente dializadas, se determinó actividad de fosfotransferasa, en presencia o no de 1  $\mu$ M AMPc y capacidad de unir el nucleótido marcado como se describió en Materiales y Métodos. En la Figura III-12A se observa que la subunidad regulatoria disociada percoló, sin embargo se detectó una actividad residual de fosfotransferasa, estimulable por AMPc, que coeluyó con esta putativa subunidad regulatoria. La subunidad catalítica quedó retenida dada su afinidad por la CM50 y se eluyó posteriormente al aumentar la fuerza iónica del eluyente. Su actividad de fosfotransferasa no se modificó por el agregado de AMPc.

Del mismo modo, se disoció la holoenzima de corazón obteniéndose las subunidades regulatorias y catalíticas bien diferenciadas (Figura II-12B).

### III. ENSAYOS DE RECONSTITUCION DE LA HOLOENZIMA A PARTIR DE LAS SUBUNIDADES "C" Y "R" CORRESPONDIENTES

Todos los métodos detallados hasta el momento, permitieron una disociación parcial, en mayor o menor grado, de la quinaasa del parásito en sus subunidades constituyentes, "C" y "R".

Las subunidades catalíticas y regulatorias de una quinaasa dependiente de AMPc se pueden identificar por su capacidad de reasociarse formando la holoenzima correspondiente. Al reasociarse, la subunidad regulatoria inhibe la actividad fosfotransferasa de la subunidad catalítica y esta inhibición se revierte por el agregado de AMPc.

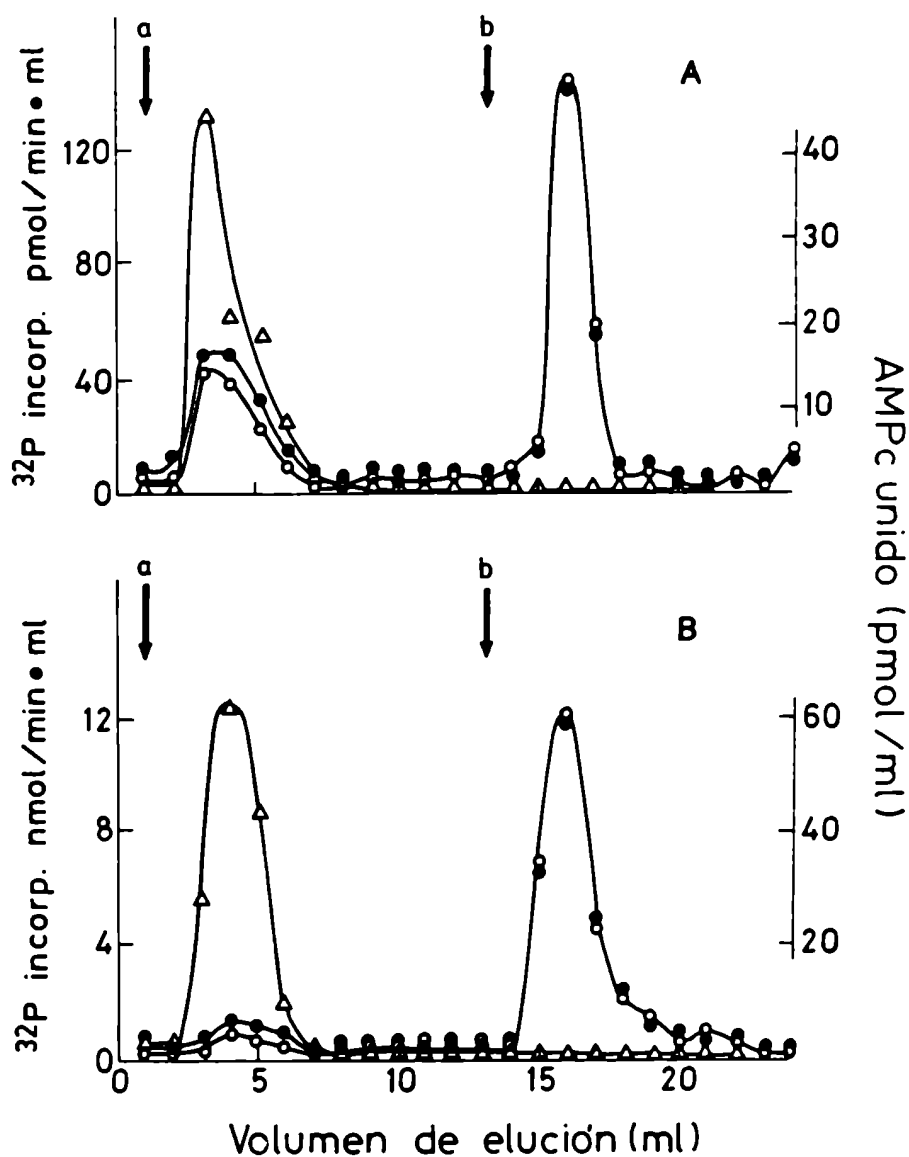


Figura III-12: Cromatografía mixta en Sephadex G-25-CM Sephadex C-50. Perfil de elución de las actividades de quinasa de proteínas y de unión a AMPc de *T. cruzi* (A) y corazón bovino (B). Las preparaciones enzimáticas provenientes de respectivas columnas de DEAE-celulosa se sembraron en la columna mixta que se eluyó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. a, tampón de equilibrio; b, tampón eluyente. Los ensayos se realizaron con (●-●) o sin (○-○)  $10^{-6}$  M AMPc; (△-△) capacidad de unir AMPc. Las condiciones de los ensayos se describen en Materiales y Métodos.

III.1. RECONSTITUCION DE LA HOLOENZIMA DE *Trypanosoma cruzi*

Una mezcla con cantidades equimoleculares de los componentes "catalíticos" y "regulatorios" de la PKII del parásito se incubó en presencia o no de AMPc, para determinar si se podía reconstituir la holoenzima a partir de ellos.

En la Tabla III-3 (exp. 1) se observa que al reasociarse los componentes originales, obtenidos por cromatografía en "AMPc-agarosa", la actividad de la subunidad catalítica se redujo al 25%. El 95% de la actividad se recuperó al añadirse  $10^{-6}$  M AMPc. Como control se incubó la subunidad catalítica libre en presencia de AMPc, no modificándose la actividad de la misma.

En el gráfico de barras (Figura III-13), se observa que la subunidad catalítica, obtenida de un Sephacryl S300 (Figura III-9A), se pudo reasociar con una subunidad regulatoria homóloga. Al reconstituirse, se inhibió el 80% de la actividad catalítica. Esta inhibición se revirtió con AMPc; sin embargo, con concentraciones de AMPc menores que  $10^{-6}$  M no se recuperó el 100% de la actividad.

Se puede concluir que los componentes "catalíticos" y "regulatorios" de la PKII del parásito eran auténticos y pueden reconstituir la holoenzima homóloga.

III.2. RECONSTITUCION DE UNA HOLOENZIMA HETEROLOGA

Se reconstituyó una "holoenzima" heteróloga con subunidades provenientes de la PKII de *Trypanosoma cruzi* y de la enzima de corazón.

La subunidad catalítica de *T. cruzi* obtenida de un Sephacryl S300 (Figura III-9A), se incubó con la subunidad regulatoria de corazón purificada en una "AMPc-agarosa".

## Resultados y Discusión

**TABLA III-3.** Reconstitución de la "holoenzima" a partir de los componentes "catalíticos" y "regulatorios" de *Trypanosoma cruzi* y corazón bovino:

Experi- mento	Origen	Componente	Actividad de qui- nasa de proteínas (nmol/min/mg prot)	
			-AMPc	+AMPc
1.	<i>Trypanosoma cruzi</i>	"catalítico" <sup>a</sup>	0,403	0,405
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	"catalítico" <sup>a</sup> más	0,105	0,387
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	"regulatorio" <sup>a</sup>		
2.	<i>Trypanosoma cruzi</i>	"catalítico" <sup>b</sup>	1,000	0,900
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	"catalítico" <sup>b</sup> más	0,410	1,250
	Corazón bovino	"regulatorio" <sup>a</sup>		
3.	Corazón bovino	"catalítico" <sup>a</sup>	18,200	21,030
	Corazón bovino	"catalítico" <sup>a</sup> más	9,330	21,300
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	"regulatorio"		
4.	Corazón bovino	"catalítico" <sup>a</sup>	23,400	23,000
	Corazón bovino	"catalítico" <sup>a</sup> más	3,600	20,500
	Corazón bovino	"regulatorio" <sup>a</sup>		

a. Purificado por cromatografía de afinidad en "AMPc-agarosa"

b. Purificado por cromatografía en Sephacryl S300 (Figura 9A).

Las mezclas incluyendo las distintas fracciones proteicas, 1 mg/ml BSA y todos los componentes del ensayo de quinasa (con kemptido como aceptor de fosfatos), exceptuando el  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, se preincubaron a 0°C durante 20 minutos. Las reacciones se iniciaron por la adición de  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP.

Otras condiciones están descriptas en Materiales y Métodos.

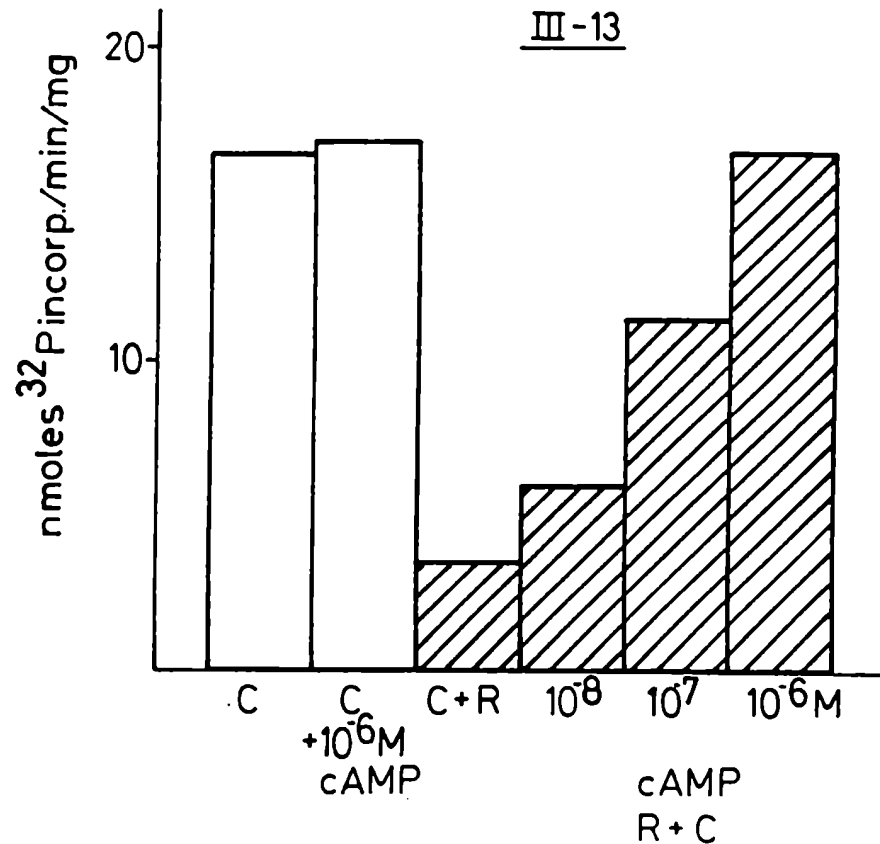


Figura III-13: Experimento de reconstitución a partir de las subunidades disociadas de la quinasa de proteínas de *T. cruzi*. C: componente catalítico (8  $\mu\text{g}$ /ensayo) purificado de un Sephacryl S300 0,5 M NaCl (Figura III-9A). R: componente regulatorio purificado por AMPc-agarosa (actividad específica= 98 pmoles unidos/mg proteína). Alícuotas de las subunidades C y R se preincubaron 20 min a 0°C en presencia de 100  $\mu\text{g}$  BSA y todos los componentes de la mezcla de reacción a excepción del  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP. La incubación (10 min a 30°C) se inició con el agregado del sustrato radioactivo. Se utilizó kemptido como sustrato fosforilable. Otras condiciones están descriptas en Materiales y Métodos.

Como se detalla en la Tabla III-3 (exp. 2), en presencia de la RII de corazón se inhibió el 60% de la actividad catalítica que se recuperó por el agregado de AMPc.

En el experimento inverso (Tabla III-3, exp. 3), la subunidad catalítica de corazón se inhibió un 50% al reasociarse con la subunidad regulatoria del parásito. La inhibición se revirtió por AMPc. En este experimento se observa un 15% de activación de la subunidad catalítica en presencia de AMPc que puede deberse a una contaminación marginal. Es importante destacar que a tiempos largos de incubación (16') se logró una mejor reasociación de las subunidades heterólogas.

### III.3. RECONSTITUCION DE LA HOLOENZIMA DE CORAZON

Se realizó un experimento control con las subunidades de la quinasa de corazón bovino. Como se observa en el experimento 4 de la Tabla III-3, la subunidad catalítica se inhibió hasta 6,5 veces por la subunidad regulatoria homóloga y recuperó el 100% de su actividad en presencia de AMPc. Con ello, comprobamos que las subunidades de corazón con que hemos trabajado eran adecuadas.

### IV. CARACTERIZACION DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA DE *Trypanosoma cruzi*

Los resultados obtenidos, es decir: elución a 0.32 M NaCl de la cromatografía en DEAE-celulosa, la alta concentración de AMPc requerida para eluir la enzima de la AMPc-agarosa y la fosforilación detectada en ausencia de sustratos protéicos exógenos, indicaban que la subunidad regulatoria de la PKII de *T. cruzi* era semejante a la RII de corazón.



### IV.1. AUTOFOSEFORILACION

Una de las características de la subunidad RII de corazón es la capacidad de autofosforilarse. En la Figura III-14 se muestra un experimento de fosforilación realizado con la PKII de *T. cruzi* obtenida de la DEAE-celulosa (Figura III-1) y del Sephacryl S300 (Figura III-8A). Dichas enzimas se incubaron con  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP y  $\text{MgCl}_2$  en ausencia de sustrato proteico y se analizaron electroforéticamente en geles disociantes. En la autorradiografía correspondiente (carriles B y C) se observa una única banda marcada de 56Kd. Como control positivo se utilizó la enzima de corazón y se obtuvo el mismo resultado (carril A). Dado que la banda fosforilada de *T. cruzi* coincide con el tamaño de la subunidad regulatoria de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc tipo II, se puede concluir que la enzima del parásito también se autofosforila.

### IV.2. INMUNODETECCION (DOT BLOT)

La enzima del parásito se caracterizó empleando anticuerpos policlonales específicos para las subunidades RI y RII de las quinasas dependientes de AMPc de mamíferos. Se tomaron alícuotas de distintas preparaciones de la "holoenzima" y de las subunidades parcialmente purificadas del parásito que se sembraron en nitrocelulosa. Se utilizó la holoenzima de corazón bovino como control positivo de la quinasa tipo II y la enzima de *Neurospora crassa* como control del tipo I (Figura III-15, n° 1 y 2 respectivamente). Las tiras de nitrocelulosa se incubaron con los antisueros correspondientes y se hizo un control negativo con suero preinmune de conejo. Se los reveló con el kit de VECTASTAIN por una reacción de biotina-avidina.

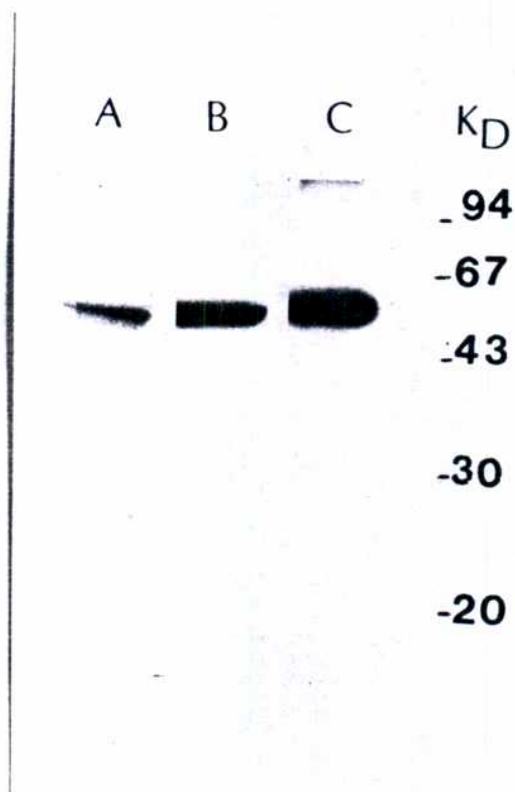


Figura III-14: Autofosforilación de las enzimas de *T. cruzi* y de cerebro bovino.

A: Quinasa de corazón bovino (holoenzima) purificada por Sephacryl S300 en condiciones no disociantes (21  $\mu$ g proteína).

B y C: PKII de *T. cruzi* obtenida de la DEAE-celulosa y del Sephacryl S300 (216 y 115  $\mu$ g proteína) respectivamente.

Las muestras se incubaron 2 min con 10  $\mu$ M  $\gamma$ <sup>32</sup>P-ATP (1000 cpm/pmol) y 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Las condiciones del ensayo están descritas en Materiales y Métodos.

En la Figura III-15, n° 3 a 7, se observa que la enzima del parásito fue reconocida específicamente por el anticuerpo anti RII (A), aunque también se detectó una leve señal con el anti-suero contra RI (B). El componente catalítico proveniente del Sephacryl S300 (Figura III-9A) no reaccionó con ninguno de los antisueros, confirmándose su identidad como subunidad libre (Figura III-15, n° 4). El control con suero preinmune de conejo dio negativo indicando que el reconocimiento fue específico.

### IV.3. TRANSEFERENCIA A NITROCELULOSA E INMUNOPRECIPITACION *in situ*. (Western-blot)

Para confirmar el resultado anterior se realizó un *Western blot*.

La enzima obtenida de la DEAE-celulosa fue sometida a electroforesis en condiciones disociantes y se transfirió a nitrocelulosa, como se indicó en Materiales y Métodos.

Paralelamente se hizo un control con la enzima de corazón bovino proveniente de un Sephacryl S300. Las tiras de nitrocelulosa se preincubaron con el suero policlonal anti RII y con el suero preinmune de conejo, y se revelaron con el kit de VETASTAIN. Se confirmó la transferencia revelando las proteínas (Figura III-16, carriles D, E y F).

Como se observa en la Figura III-16, la enzima de *T. cruzi* no reaccionó con el suero preinmune de conejo (carril A); en cambio, con el suero anti RII se obtuvo una única banda de 56 Kd, tanto en el carril correspondiente a la enzima de *T. cruzi* (carril C) como en el control de corazón (carril B).

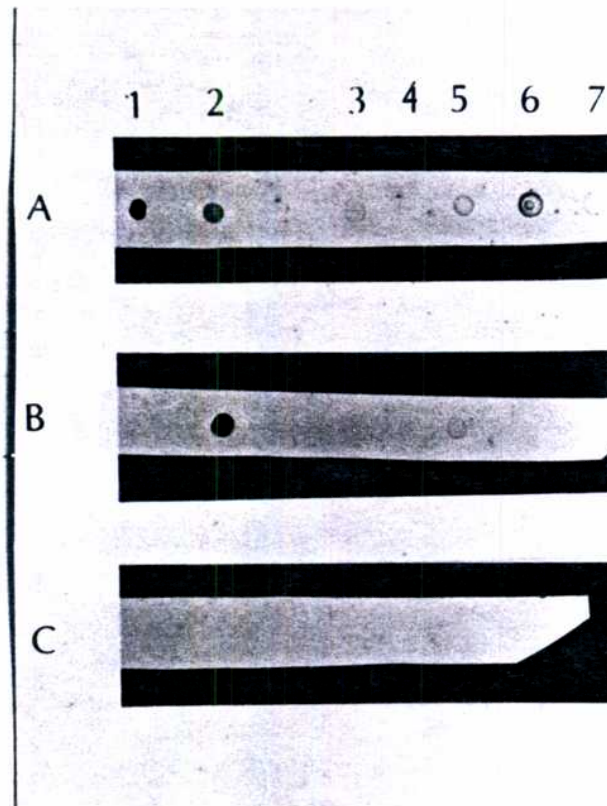


Figura III-15: Ensayo de inmunodetección de quinasas (*Dot blot*). Alícuotas de 1  $\mu$ l (1  $\mu$ g de proteína) de diferentes preparaciones enzimáticas de *T. cruzi* (n° 3 a 7) y de los respectivos controles (n° 1 y 2) se sembraron en papel de nitrocelulosa. Los n° corresponden a: 1, RII de corazón bovino obtenida de la AMPc-agarosa; 2, PKI de *N. crassa* obtenida de una DEAE-celulosa; 3, holoenzima de *T. cruzi* obtenida de Sephacryl S300 (Figura III-8A); 4, subunidad catalítica obtenida de Sephacryl S300 (Figura III-9A); 5, holoenzima obtenida de Sephacryl S300 (Figura III-9A); 6 y 7, PKII de *T. cruzi* obtenidas de la DEAE-celulosa.

Las tiras se incubaron con antisueros policlonales contra las subunidades RI (B) y RII (A) de la quinasa dependiente de AMPc y contra un suero preinmune de conejo (C). Otras condiciones están descriptas en Materiales y Métodos.

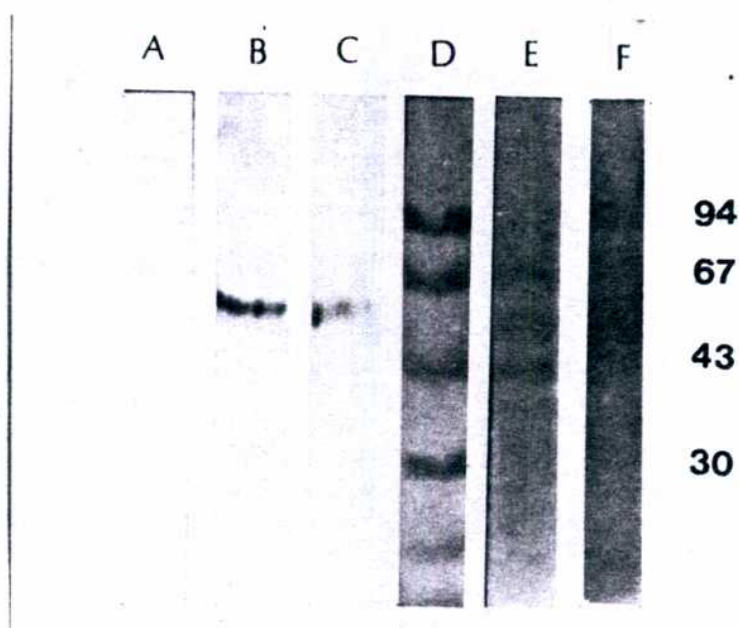


Figura III-16: Transferencia a nitrocelulosa e inmunoprecipitación *in situ* con el antisuero policlonal anti-RII. Se utilizaron las mismas preparaciones enzimáticas que en el experimento III-14, que fueron sometidas a electroforesis en condiciones disociantes en minigeles.

Carril A: PKII de *T. cruzi* (60  $\mu$ g) obtenida de la DEAE-celulosa incubada con suero preinmune (control negativo).

Carriles B y C: preparación de corazón bovino (14  $\mu$ g) obtenida de Sephacryl S300 y PKII de *T. cruzi* (60  $\mu$ g) obtenida de DEAE-celulosa respectivamente, incubadas con el anticuerpo policlonal anti-RII.

Carriles D, E y F: tinción de proteínas con Amido-Schwartz, que corresponden a las proteínas marcadoras de peso molecular y a las preparaciones de *T. cruzi* y corazón bovino, respectivamente.

## Resultados y Discusión

Estos resultados indican que la PKII de *T. cruzi* es una quinasa dependiente de AMPc tipo II, cuya subunidad regulatoria de 56 Kd se autofosforila y es reconocida por anticuerpos contra la subunidad RII de corazón. El reconocimiento de ciertos determinantes antigénicos por el antisuero de mamíferos no indica que la subunidad regulatoria de la PKII del parásito sea idéntica a la subunidad RII de corazón, ya que ambas subunidades difieren en su afinidad por los análogos del AMPc y en la eficiencia de la unión al nucleótido.

## DISCUSION

El AMP cíclico regula una gran variedad de procesos en células animales y en microorganismos. En eucariotes, el sistema de control del AMPc se ha conservado a lo largo de la escala evolutiva. Esta conservación sugiere que la función regulatoria del AMPc también se ha conservado. Ciertas características del sistema se han mantenido: la adenilato ciclasa, la quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico y el control de los niveles endógenos del nucleótido. Una de las áreas de mayor similitud y conservación, ha sido la quinasa de proteínas dependiente de AMPc, proteína receptora del nucleótido, que está presente en todos los eucariotes superiores y en la mayoría de los inferiores (245).

Ya en 1974, Takai y colaboradores (246) demostraron que la subunidad catalítica de la quinasa dependiente de AMPc de levadura tenía la misma especificidad de sustrato que la enzima de mamíferos. Posteriormente, diversos autores observaron que las subunidades regulatorias de dicha quinasa de *Sacharomyces cerevisiae* (247,248,249,250,251), *Neurospora crassa* (231,241,252), *Mucor rouxii* (242,243), *Blastocladiella emersonii* (253,254) y



## Resultados y Discusión

*Dictyostelium discoideum* (255,256,257,258) poseen características y comportamientos similares a los de dichas subunidades de eucariotes superiores y son capaces de reconstituir una quinasa heteróloga con la subunidad catalítica de mamíferos. Se han descrito dos tipos de receptores del AMPc en *D. discoideum*: la subunidad regulatoria de la quinasa dependiente del nucleótido (receptor intracelular) y un receptor localizado en la superficie celular que no está asociado con una actividad de fosfotransferasa (259). Ambos receptores se pueden distinguir por su distinta afinidad por los análogos del AMPc. Durante el crecimiento vegetativo *D. discoideum* se desarrolla individualmente como una ameba, pero en condiciones de ayuno se agrega formando un organismo multicelular. La agregación es mediada por AMPc que actúa vía el receptor del nucleótido presente en la superficie celular. Se ha sugerido que la expresión de muchos genes tempranos de *D. discoideum* está regulada por este receptor (260).

A su vez, Woffendin y colaboradores (261) observaron la traslocación reversible al núcleo de las subunidades catalíticas y regulatorias de la quinasa dependiente de AMPc durante el desarrollo. Luego de la disociación decaen los niveles de quinasa dependiente de AMPc en el núcleo y disminuyen ciertas especies de ARNm; al agregar AMPc a las células disociadas se recuperan los niveles anteriores. Se ha aislado un factor morfogénico, DIF (inductor de la diferenciación) que regula la formación de esporas aparentemente por una modificación del pH intracelular (262). Gunzburg y colaboradores (263) han observado que la actividad de la quinasa dependiente del nucleótido se modifica por cambios de pH y sugieren que los efectos del pH y del AMPc en la expresión génica durante la diferenciación terminal son mediados por la regulación de la actividad de dicha enzima.

## Resultados y Discusión

En el protozoario ciliado *Tetrahymena pyriformis* (264) se ha descrito una proteína con capacidad de unir AMPc que coeluye de una DEAE-celulosa en un solo pico, junto con una actividad de quinasa de proteínas. Los autores observaron un aumento de esta proteína en las fracciones ciliares, mitocondriales y microsomales, durante la transición de la fase exponencial a la estacionaria. En presencia de AMPc se duplicó la actividad de quinasa presente en estas fracciones. Los autores postulan que la distribución subcelular de estas proteínas puede deberse a que están implicadas en la regulación de los niveles intracelulares de AMPc.

En los Trypanosomas, se han descrito quinasas independientes de nucleótidos cíclicos y proteínas con capacidad de unir AMPc que, aparentemente, no regulan una actividad fosfotransferasa. En *T. gambiense* (52,53,118) se han detectado tres formas de quinasas de proteínas que difieren en su afinidad por los sustratos fosforilables. Una de estas formas, PKII, se regula positivamente por nucleósidos y otra, PKI, se inhibe en presencia de la droga antitripanocida suramina. En *T. brucei* también se hallaron estas formas de quinasas y los autores (50) proponen que la quinasa sensible a suramina está asociada a la membrana y que la modulable por nucleósidos es soluble. En *T. cruzi* Rangel-Aldao y colaboradores (55,119) encontraron dos quinasas no reguladas por AMPc y una proteína receptora del nucleótido no asociada con actividad fosfotransferasa y con características diferentes a las de las subunidades regulatorias de las quinasas dependientes de AMPc de eucariotes superiores.

Se ha postulado que el AMPc regula la diferenciación en los Trypanosomas. La forma no proliferativa de *T. lewisi* (59a) y la forma trypomastigote de *T. cruzi* (60) tienen muy elevados los niveles intracelulares del nucleótido cíclico respecto de las



## Resultados y Discusión

formas proliferativas. Hasta el momento no se había descrito una quinasa de proteínas dependiente de AMPc en *Trypanosomas*, por lo que los autores sugieren que los efectos del nucleótido son mediados por la proteína con capacidad de unirlo.

Los resultados presentados en esta Tesis, indican la existencia de dicha enzima en *Trypanosoma cruzi*. Se ha purificado una actividad de fosfotransferasa con capacidad de unir AMP cíclico que se modula positivamente por dicho nucleótido. Se puede considerar que esta actividad enzimática es una quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico, de acuerdo a los siguientes criterios:

- 1) La enzima se activa específicamente por concentraciones nanomolares de AMP cíclico.
- 2) La especificidad de sustratos fosforilables de PKII es característica de una quinasa dependiente de AMP cíclico.
- 3) Las preparaciones de PKII unen en forma específica AMPc.
- 4) Se pueden obtener componentes catalíticos y regulatorios a partir de la enzima.
- 5) El componente regulatorio de *Trypanosoma cruzi* inhibe la actividad fosfotransferasa de las subunidades catalíticas de *T. cruzi* y de corazón y esta inhibición se revierte por el agregado de AMPc. A su vez, la subunidad regulatoria de corazón inhibe la actividad del componente catalítico de *T. cruzi* y dicha inhibición también se revierte por AMP cíclico.
- 6) Anticuerpos policlonales contra la subunidad regulatoria de corazón bovino, RII, reconocen un polipéptido de 56 Kd en las preparaciones de PKII de *Trypanosoma cruzi*. Este peso molecular es idéntico al de la subunidad regulatoria de corazón.

- 7) La quinasa de *Trypanosoma cruzi* (PKII) es capaz de autofosforilar su propia subunidad regulatoria como es característico de las quinazas dependientes de AMPc tipo II.

Por todo lo señalado anteriormente, la PKII del parásito puede considerarse una quinasa dependiente de AMPc tipo II. La enzima está compuesta por subunidades regulatorias y catalíticas, la primera de las cuales es similar a la RII de corazón, tiene un peso molecular de 56 K y se autofosforila.

La subunidad catalítica de *Trypanosoma cruzi* es aparentemente más pequeña que dicha subunidad en eucariotes superiores ( $a = 2,2$  nm para el componente catalítica de *T. cruzi*). Se obtuvo un polipéptido de 30 K en geles disociantes que podría corresponder a esta subunidad del parásito. Sin embargo, se deben realizar más estudios para confirmarlo.

No se puede concluir por los datos presentados, cuál es la estructura polimérica de la enzima. Resultados preliminares obtenidos en gradientes de sacarosa, indican que la enzima posee una estructura tetramérica, como es característico de este tipo de quinazas. Se obtuvo un peso molecular aparente de 200 K para la "holoenzima" y de 104 K para la subunidad regulatoria, lo que sugiere una estructura dimérica para el componente regulatorio del parásito. Son necesarios más experimentos para confirmar estos resultados.

Otros autores (99) han secuenciado la subunidad regulatoria de *Dictyostelium discoideum* y la han comparado con las correspondientes secuencias de las subunidades RI y RII de eucariotes superiores (88,89). Dicha subunidad tiene un peso molecular de 41 K y no es reconocida por anticuerpos contra las subunidades regulatorias de mamíferos (265). Dada la temprana divergencia de *D. discoideum* del tronco de los eucariotes, esta comparación pue-

de adelantar alguna evidencia sobre la evolución de la subunidad regulatoria. La subunidad R de *D. discoideum* carece de los primeros 70 residuos del extremo aminoterminal correspondientes al dominio de dimerización presente en la R de eucariotes superiores, probablemente la R de *Dictyostelium discoideum* sea un monómero y su quinasa dependiente de AMPc sea un dímero RC.

La región "bisagra" que corresponde a la zona donde interactúa la subunidad catalítica con RI, RII y con el inhibidor termoestable, está conservada en *Dictyostelium*, lo que permite la reconstitución de una quinasa con subunidades heterólogas. La mayor homología ocurre en el extremo carboxiterminal, donde están los sitios de unión al AMP cíclico.

Los autores proponen que la presencia de dos dominios de unión a AMP cíclico en *Dictyostelium discoideum* indicaría que duplicación del gen a partir de un putativo "gen ancestral" fue anterior a la adquisición del dominio dimérico. Además, postulan que la afinidad del dominio ancestral de unión al AMPc era baja dado que la proteína CAP de *E. coli* tiene una afinidad en el rango micromolar.

En el modelo propuesto por los autores, un gen ancestral debió adquirir un dominio de interacción con la subunidad catalítica y luego, uno de los sitios de unión al AMPc se modificó aumentando su afinidad por el nucleótido, al rango nanomolar. Más tarde, el segundo dominio de unión a AMPc mejoró su afinidad, lo que permitió a la actual quinasa de mamíferos una flexibilidad regulatoria adicional a través de la cooperatividad entre sitios.

Se puede suponer que la enzima de *Trypanosoma cruzi* ha dado un paso más en la evolución que la de *Dictyostelium discoideum*, ya que el tamaño de la subunidad regulatoria indicaría que posee el dominio de dimerización y es reconocida por anticuerpos policlonales contra las subunidades de eucariotes superiores. A-

## Resultados y Discusión

simismo, la posibilidad de formar una quinasa heteróloga con subunidades provenientes del parásito y de corazón, indicaría que la región de interacción con la subunidad catalítica está conservada en la subunidad regulatoria de *Trypanosoma cruzi*.

Dado el importante papel del AMPc en la diferenciación del parásito, es posible que la quinasa dependiente del nucleótido esté implicada en la regulación de la misma. Podría ser que en *T. cruzi* se repita el caso de *D. discoideum* y que ambos receptores para el AMPc, la subunidad regulatoria de la quinasa dependiente de AMPc y la proteína con capacidad de unirlo descrita por otros autores (55), regulen distintos eventos involucrados en la diferenciación del parásito.

### V. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA FOSFODIESTERASA DE AMPc Y DE LA CALMODULINA DE *T. CRUZI*

Se determinó la actividad de PDE de AMPc y la presencia de calmodulina en los extractos citosólicos y en la fracción particulada (sedimento de 105000xg) de epimastigotes de *T. cruzi*. La actividad de PDE se localizó mayormente en el S<sub>100</sub> (80%) al igual que la calmodulina (70%). En la fracción particulada están presentes ambas actividades, pudiendo variar la proporción de las mismas según el cultivo utilizado.

A fin de purificar las actividades de fosfodiesterasa y calmodulina presentes en el extracto crudo, se sembró el S<sub>100</sub> en una DEAE-celulosa que se eluyó con un gradiente salino.

#### V.1. PERFIL DE ELUCION DE LA DEAE-CELULOSA

En la Figura III-17 se observa el perfil de elución de la actividad de fosfodiesterasa de AMP cíclico de una DEAE-celulosa. La fosfodiesterasa (1  $\mu$ M sustrato) se resolvió en un único pico que eluyó a 0,23 M NaCl. Cuando se usó 1  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]-GMPc como sustrato el perfil de elución fue el mismo que con AMPc. La actividad de PDE determinada a altas concentraciones de AMPc (200  $\mu$ M) fue muy baja. Estos resultados indican que la forma predominante es la enzima de alta afinidad hacia el sustrato. Las fracciones correspondientes se agruparon para proceder a su ulterior caracterización y purificación.

Para detectar calmodulina, se incubaron las alícuotas calentadas de cada fracción de la DEAE-celulosa con la fosfodiesterasa de cerebro bovino en presencia de 50  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> y 200  $\mu$ M de [<sup>3</sup>H]-AMPc como sustrato. El aumento de la actividad basal de la enzima de cerebro, indicó presencia del activador, que eluyó en un amplio pico con un máximo entre 0,35 y 0,4 M NaCl.

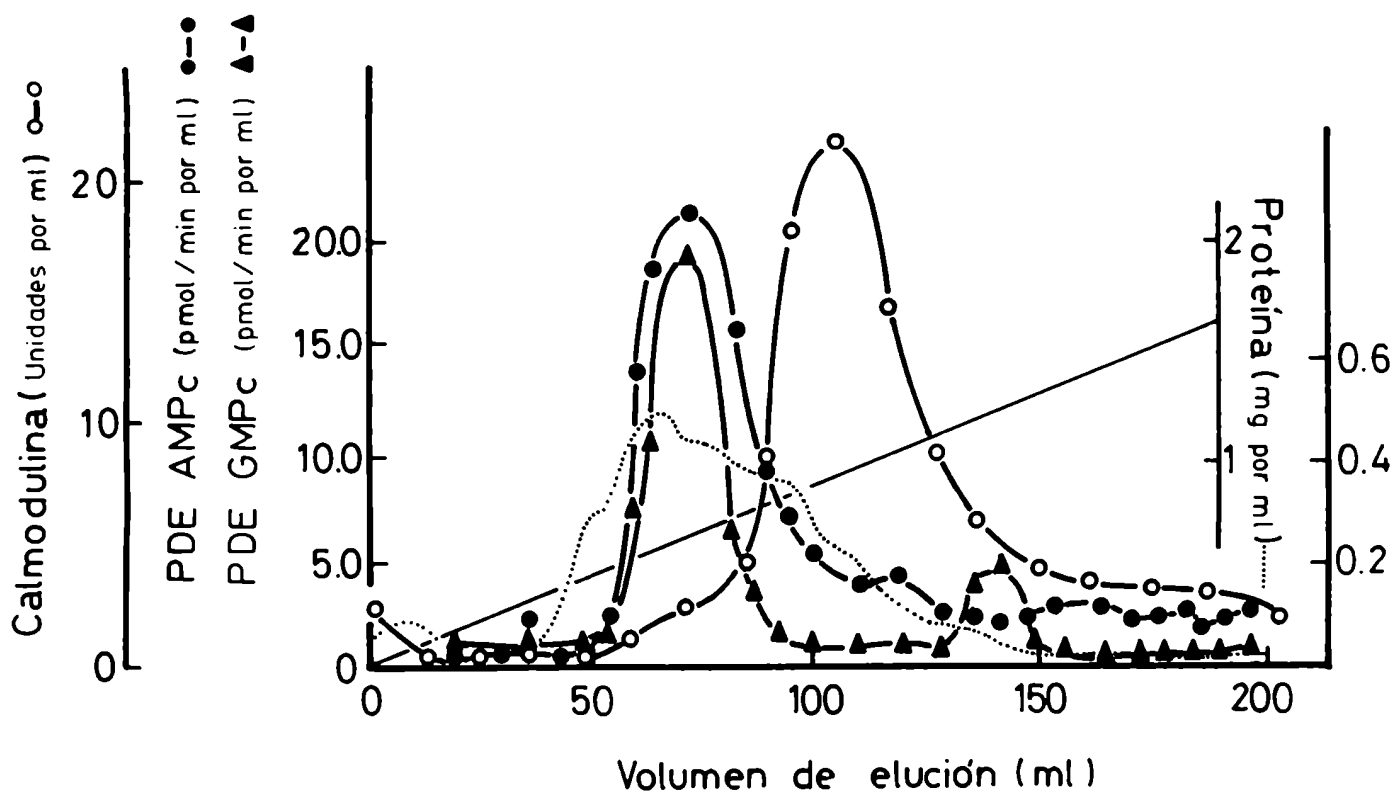


Figura III-17: Cromatografía en DEAE-celulosa del S<sub>100</sub> de *T. cruzi*

Se determinó la actividad de PDE con 1  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]-AMPc (●—●) o 1  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]-GMPc (▲—▲). (O—O) determinación de CaM a 200  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]-AMPc con PDE de cerebro bovino (0,04 mg/ml), 50  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub> y 1 mg/ml BSA. (.....) proteínas determinadas por Lowry. Otras condiciones están descriptas en Materiales y Métodos.

## Resultados y Discusión

Las fracciones de la DEAE-celulosa correspondientes a la calmodulina, se calentaron a 100°C y se centrifugaron. El sobrenadante obtenido se dializó durante 15 horas y se liofilizó. El material sólido se resuspendió en 1,5 ml de 25 mM Tris-HCl pH 7,4 con 0,1 M NaCl, con lo cual la muestra se concentró hasta 30 veces.

El perfil proteico se determinó por el método de Lowry. Como se observa, la mayor concentración proteica coeluyó junto a la actividad de fosfodiesterasa.

### VI. CARACTERIZACION DE LA FOSFODIESTERASA DE *Trypanosoma cruzi*

#### VI.1. ACTIVACION POR $Ca^{2+}$ -CALMODULINA

En la Figura III-18 se observa la actividad de la PDE de *T. cruzi*, obtenida de la DEAE-celulosa, en función del tiempo. La calmodulina de cerebro bovino estimuló varias veces la actividad enzimática y esta activación se bloqueó con EGTA. El efecto de la calmodulina fue más notorio a tiempos cortos.

Luego se ensayó la fosfodiesterasa de *Trypanosoma cruzi*, con concentraciones crecientes de calmodulina de diversos orígenes, en presencia de 25  $\mu$ M  $Ca^{2+}$ . Como se observa en la Figura III-19, la enzima se activó hasta 12 veces en presencia de la calmodulina homóloga, y entre 7 y 10 veces con las calmodulinas de *Neurospora* y cerebro bovino, respectivamente; mostrando una dependencia absoluta por el activador, cualquiera sea la procedencia de éste. El 50% de la activación de la enzima se logró a muy bajas concentraciones de calmodulina (0,3  $\mu$ g/ml).

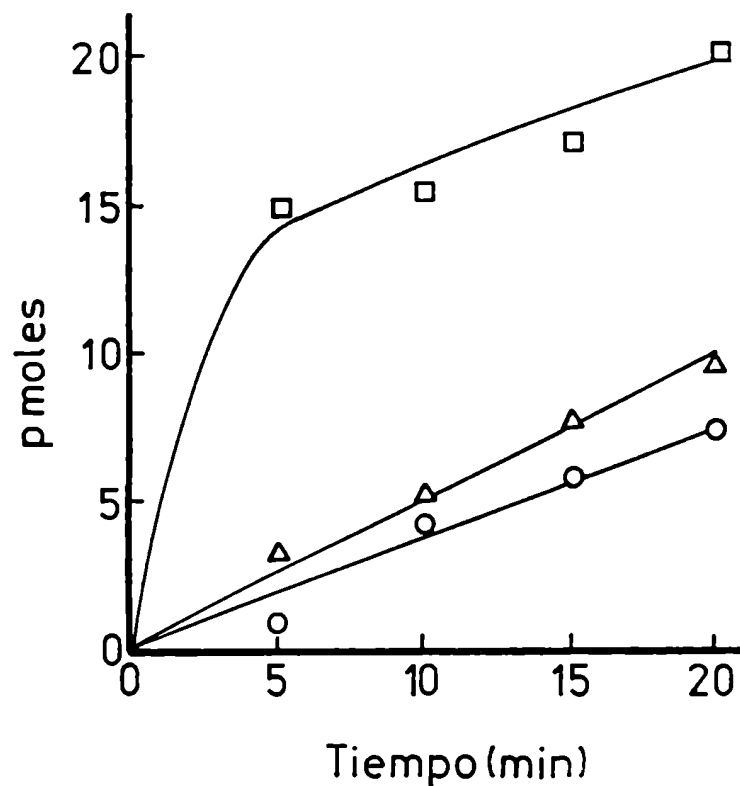


Figura III-18: Cinética de la actividad de PDE de *T. cruzi* en presencia o ausencia de calmodulina. La mezcla de reacción contuvo: PDE de *T. cruzi* obtenida de una DEAE-celulosa (18  $\mu\text{g}$ /ensayo), 1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-AMPc, 25  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , 1  $\text{mg}/\text{ml}$  BSA y los siguientes agregados: (O-O) sin adiciones; (□-□) con CaM de cerebro bovino (1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); (Δ-Δ) con CaM cerebro bovino y 0,7 mM EGTA. Otras condiciones están descriptas en Materiales y Métodos.



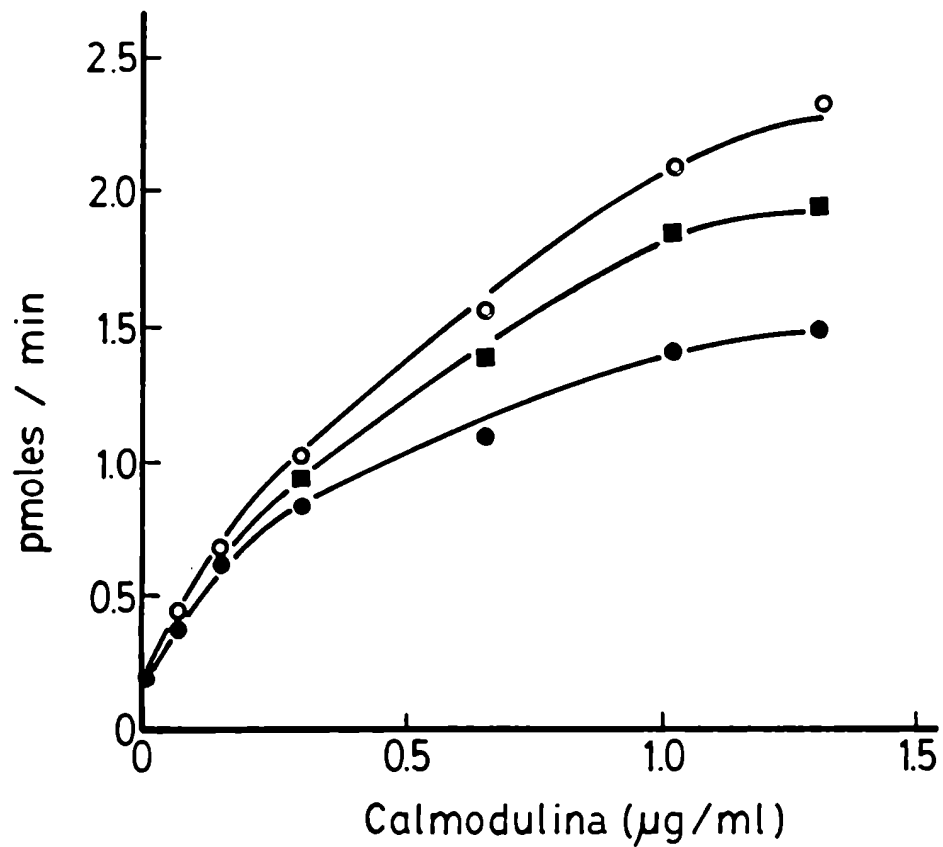


Figura III-19: Activación de la PDE de *T. cruzi* por calmodulina homóloga y heterólogas. La PDE de *T. cruzi* obtenida de una DEAE-celulosa (18 µg/ensayo) se incubó con 1 µM [<sup>3</sup>H]-AMPc, 25 µM Ca<sup>2+</sup>, 1 mg/ml BSA y concentraciones crecientes de CaM de *N. crassa* (●—●), cerebro bovino (■—■) o *T. cruzi* (○—○).

VI.2. EFEECTO DEL Ca<sup>2+</sup>, EGTA Y DROGAS BLOQUEANTES DE CALMODULINA SOBRE LA FOSFODIESTERASA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

En la Tabla III-4, se detalla el efecto del Ca<sup>2+</sup>, del EGTA (agente quelante del Ca<sup>2+</sup>) y de drogas que bloquean la calmodulina, sobre la fosfodiesterasa del parásito, en presencia o no del activador homólogo.

El Ca<sup>2+</sup> por sí solo, estimuló levemente la enzima (20%). Cuando se agregó calmodulina al medio de incubación, se observó activación; sin embargo, en ausencia de Ca<sup>2+</sup>, sólo se duplicó la actividad enzimática. La activación observada, en ausencia de Ca<sup>2+</sup>, se debió a una contaminación de la preparación enzimática con el catión.

El agregado de EGTA revirtió el 70% de la activación producida por la calmodulina, sin modificar la actividad basal de la enzima. Se ensayó el efecto de clorpromazina y flufenazina, drogas derivadas de la fenotiazina, sobre la enzima en presencia o no de calmodulina. Estas drogas no modificaron la actividad basal de la fosfodiesterasa, pero inhibieron (50 a 66%) la activación de la misma. Se conoce que las drogas fenotiazínicas poseen gran afinidad por la calmodulina y compiten por ésta con la enzima. Lo mismo ocurrió con el compuesto 48/80. El 50% de la inhibición producida por la flufenazina, se logró con 40 µM de la droga (datos no mostrados), concentración un poco más elevada que la señalada en la literatura para la enzima de cerebro (266).

La inhibición de la activación enzimática producida por estas drogas sirve para caracterizar enzimas específicamente reguladas por calmodulina.

## Resultados y Discusión

**TABLA III-4.** Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$ , EGTA y drogas bloqueantes de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina sobre la actividad de la fosfodiesterasa de *Trypanosoma cruzi*.

Adiciones	Actividad de fosfodiesterasa pmol/min ( $\pm$ SD)	
	sin calmodulina	con calmodulina
sin	0,19 $\pm$ 0,006	0,40 $\pm$ 0,098
25 $\mu$ M $\text{CaCl}_2$	0,24 $\pm$ 0,042	1,71 $\pm$ 0,071
25 $\mu$ M $\text{CaCl}_2$ + 0,7mM EGTA	0,22 $\pm$ 0,086	0,56 $\pm$ 0,032
25 $\mu$ M $\text{CaCl}_2$ + 0,1mM clorpromazina	0,20 $\pm$ 0,077	0,91 $\pm$ 0,070
25 $\mu$ M $\text{CaCl}_2$ + 0,1mM flufenazina	0,20 $\pm$ 0,035	0,57 $\pm$ 0,048
25 $\mu$ M $\text{CaCl}_2$ + 50 $\mu$ g/ml compuesto 48/80	0,23 $\pm$ 0,049	0,63 $\pm$ 0,139

La mezcla de reacción conteniendo 0,018 mg de fosfodiesterasa y 1  $\mu$ M [ $^3\text{H}$ ]-AMP cíclico, se incubó en presencia o ausencia de 1  $\mu$ g/ml de calmodulina de *Trypanosoma cruzi*. Las condiciones del ensayo están descritas en Materiales y Métodos. Estos valores son el promedio de tres experimentos  $\pm$ S.D.

### VI.3. CURVA DE CONCENTRACION DE CA<sup>2+</sup>

La fosfodiesterasa de *Trypanosoma cruzi* se incubó con concentraciones crecientes de Ca<sup>2+</sup> en presencia o no de calmodulina. La concentración de Ca<sup>2+</sup> libre se calculó de acuerdo a Bartfai (267). Como se observa en la Figura III-20, se requieren concentraciones micromolares del catión para lograr el 50% de la estimulación máxima. En ausencia de calmodulina el Ca<sup>2+</sup> no modificó la actividad enzimática, pero en presencia de una concentración constante del activador, no hubo activación sin el catión, lo cual confirma que es el complejo Ca<sup>2+</sup>-calmodulina y no únicamente la calmodulina, el verdadero activador de la fosfodiesterasa.

### VI.4. CARACTERIZACION CINETICA DE LA FOSFODIESTERASA

La enzima se incubó a distintas concentraciones de sustrato, AMPc, en ausencia o presencia de calmodulina homóloga (concentración saturante) o heteróloga de cerebro bovino (concentración subsaturante) y 25 µM Ca<sup>2+</sup>.

En el gráfico de Lineweaver-Burke (Figura III-21), se observa una cinética bifásica que indica una compleja dependencia por el sustrato, como es característico de otras fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos. La enzima posee por lo menos dos componentes cinéticos diferentes: uno de alta afinidad (K<sub>m</sub>=2,5 µM) y otro de baja afinidad (K<sub>m</sub>=100 µM). Ambas calmodulinas aumentaron la velocidad máxima de cada componente sin modificar la afinidad de la enzima por su sustrato. Se observa asimismo, que la estimulación de la enzima ocurrió a concentraciones micromolares de sustrato.

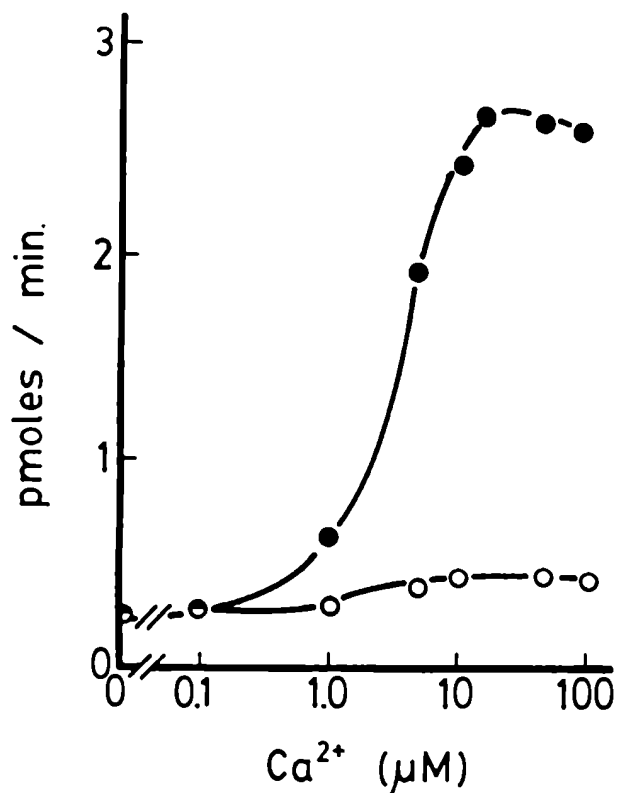


Figura III-20: Actividad de la PDE de *T. cruzi* en función de la concentración de  $Ca^{2+}$  en presencia (●-●) o ausencia (○-○) de CaM de *T. cruzi* (1  $\mu g/ml$ ). La mezcla de reacción contuvo: PDE de *T. cruzi* obtenida de una DEAE-celulosa (18  $\mu g/ensayo$ ), concentraciones variables de  $Ca^{2+}$  y 100  $\mu M$  EGTA. Las concentraciones de  $Ca^{2+}$  libre se calcularon de acuerdo a Bartfai (267).

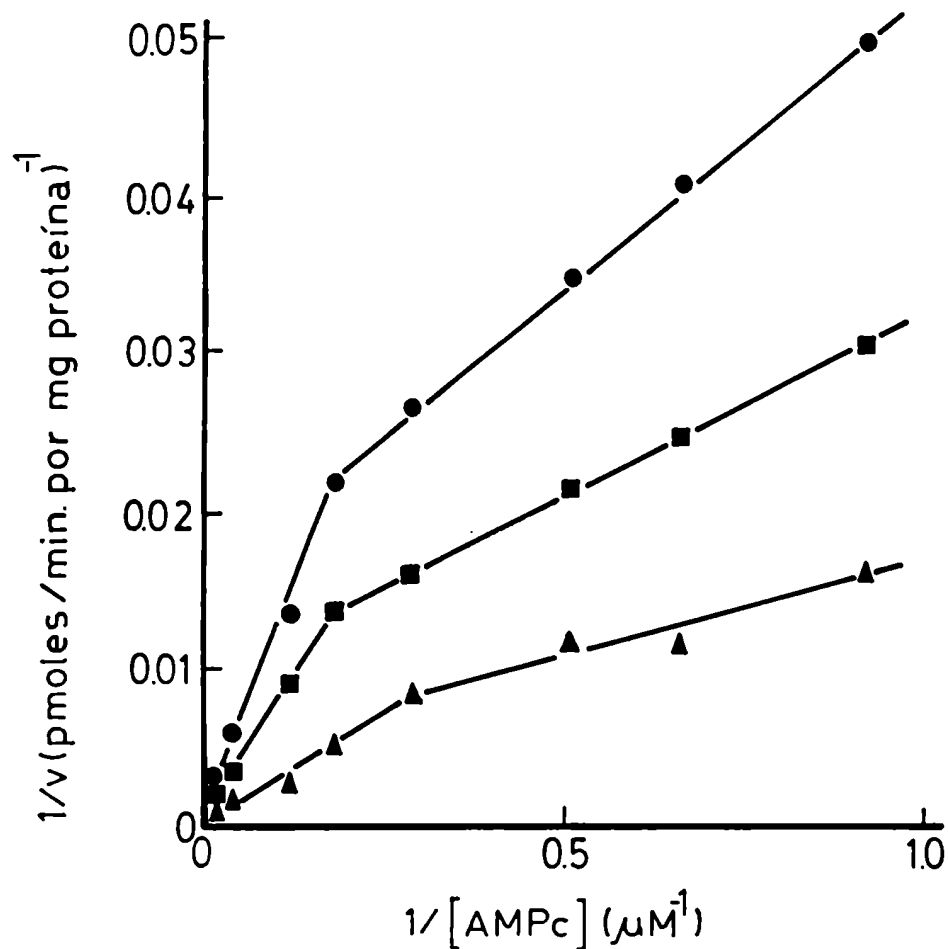


Figura III-21: Gráfico de Lineweaver-Burke. Actividad de la PDE de *T. cruzi* (18 μg proteína) en función de la concentración del sustrato AMPc, en ausencia (●—●) o presencia de calmodulina de cerebro (0,5 μg/ml) (■—■) o de *T. cruzi* (1,4 μg/ml) (▲—▲). Los ensayos se realizaron con 25 μM Ca<sup>2+</sup> y 1 mg/ml BSA. Otras condiciones se describen en Materiales y Métodos.

## VII. COLUMNA DE AFINIDAD CALMODULINA-SEPHAROSA

La PDE de *T. cruzi* se caracterizó por activarse por calmodulina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y este efecto se revirtió por EGTA. Dadas estas características se quiso estudiar si la enzima era capaz de interaccionar con calmodulina unida a una matriz sólida. Para ello se acopló calmodulina de cerebro bovino a Sepharosa activada.

La enzima obtenida de la DEAE-celulosa, previa diálisis, se sembró lentamente en la cromatografía de afinidad en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como se observa en la Figura III-22 la enzima retenida en la columna se eluyó con 2 mM EGTA. Al añadir 0,3 M NaCl al tampón de elución se obtuvo un segundo pico con actividad de fosfodiesterasa. Para determinar si los picos de PDE eluidos de la calmodulina-Sepharosa eran dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, se ensayó su actividad en presencia o no del activador. Como se observa en la Tabla III-5, ambas enzimas se activaron por  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina al igual que la enzima proveniente de la DEAE-celulosa y el EGTA bloqueó esta activación sin modificar la actividad basal de las mismas. La actividad de PDE en el S<sub>100</sub> no varió por el agregado de calmodulina exógena porque el activador ya estaba presente en el extracto crudo. La actividad específica de la enzima aumentó 200 veces respecto a la actividad del S<sub>100</sub>, obteniéndose un rendimiento del 20%; luego de este paso de purificación la enzima fue muy poco estable.

En las condiciones utilizadas en esta cromatografía, percoló una proporción variable de la enzima, pudiendo indicar que una parte de la actividad de fosfodiesterasa era independiente de calmodulina. Sin embargo, al sembrar este percolado en una segunda columna de "calmodulina-Sepharosa", se repitió el mismo perfil (dato no mostrado), lo cual indicó que la columna no tenía capacidad suficiente para retener la enzima sembrada.

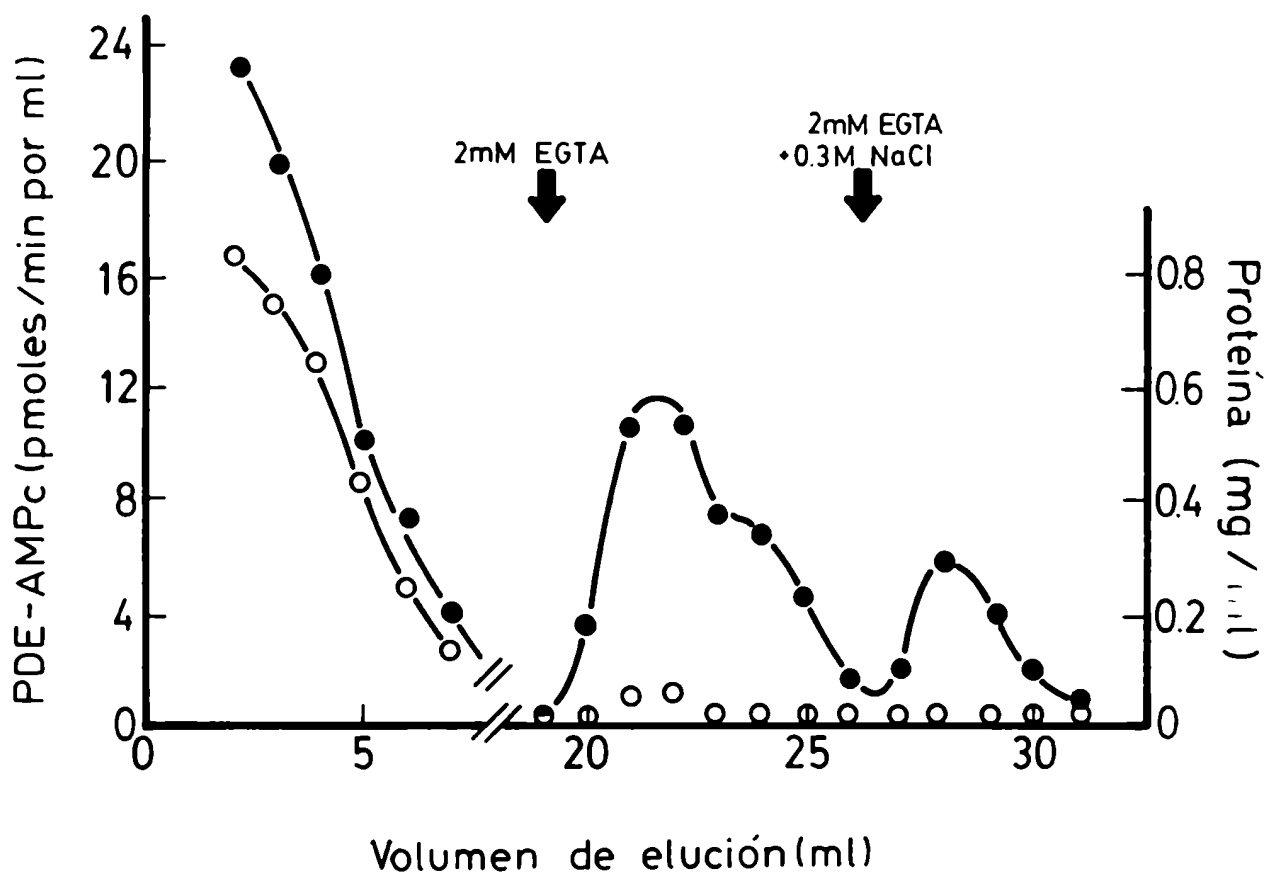


Figura III-22: Perfil de elución de la PDE de *T. cruzi* de una columna de afinidad calmodulina-Sepharosa. Las flechas indican los eluyentes utilizados.

La actividad enzimática se determinó a  $1 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-AMPc (●-●); determinación de proteínas (O-O). Otras condiciones están descriptas en Materiales y Métodos.



## Resultados y Discusión

TABLA III-5: Activación de la PDE de AMPc de *Trypanosoma cruzi* en diferentes etapas de purificación.

Origen de la PDE utilizada	pmoles/min.mg		
	Sin adiciones	25 $\mu$ M Ca <sup>2+</sup> 1,5 $\mu$ g/ml CaM	0,7 mM EGTA 25 $\mu$ M Ca <sup>2+</sup> 1,5 $\mu$ g/ml CaM
S100	6	7	nd
DEAE-celulosa	12	139	14
CaM-Sepharosa pico-I	240	1728	248
CaM-Sepharosa pico-II	123	1580	120

nd: no determinado

CaM: calmodulina de cerebro bovino obtenida de Biogel P60. El ensayo se realizó a 1  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]-AMPc en las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

El uso de esta columna permitió purificar la enzima y confirmar la dependencia de la misma por el activador.

### VIII. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD "ANTICUERPO-SEPHAROSA"

Como se describió en Materiales y Métodos con el fin de caracterizar la fosfodiesterasa de *Neurospora crassa* se obtuvieron anticuerpos monoclonales contra la misma. Estos anticuerpos se seleccionaron por su capacidad de inhibir la actividad enzimática. El anticuerpo aislado (IgM) y acoplado a Sepharosa se utilizó para purificar a homogeneidad la enzima del hongo (268).

En el ensayo de actividad enzimática, el anticuerpo anti-PDE de *N. crassa* no era capaz de inhibir la actividad de la enzima de *T. cruzi*. Aún con altas concentraciones de IgM (clon 17) no se modificó la PDE del parásito. Sin embargo, cuando se sembró la fosfodiesterasa del parásito en la cromatografía de afinidad "anticuerpo-Sepharosa" antes mencionada, parte de la enzima quedó retenida en la columna, y se eluyó posteriormente (Figura III-23). Esto podría indicar una similitud entre ambas enzimas, ya que las dos son reconocidas por un mismo anticuerpo monoclonal, que es altamente específico para una PDE de eucariotes inferiores.

### IX. CALMODULINA DEL PARASITO

A partir de las fracciones calentadas obtenidas de la DEAE-celulosa (Figura III-17) y liofilizadas se purificó el activador del parásito. El material sólido resuspendido se sembró en una columna de filtración de Biogel P60.

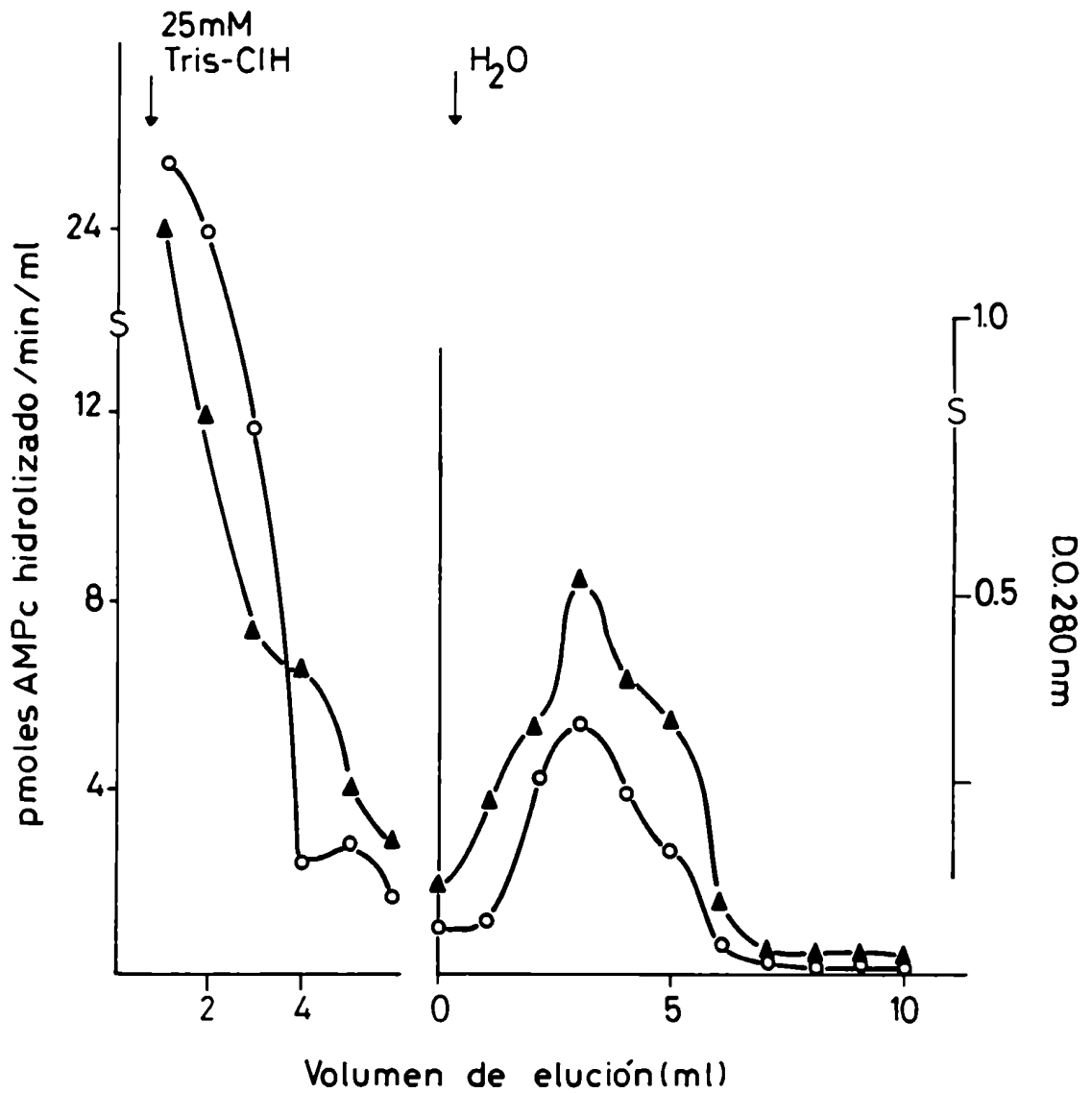


Figura III-23: Perfil de elución de la PDE de *T. cruzi* de una columna de afinidad anticuerpo-Sepharosa. La actividad enzimática se determinó a  $1 \mu\text{M}$   $[^3\text{H}]\text{-AMPc}$  (▲-▲); (○-○) D.O. a 280 nm. Las flechas indican la adición del eluyente utilizado. Otras condiciones se describen en Materiales y Métodos.

### IX.1. PERFIL DE ELUCION DEL BIOGEL P60

Como se observa en la Figura III-24, la calmodulina eluyó en un único pico simétrico. No se pudo inferir el peso molecular del activador a partir del Biogel P60, porque la calmodulina, debido a su bajo punto isoeléctrico, forma agregados moleculares que migran en filtración por geles con un radio de Stokes anormalmente alto para una proteína de tan bajo peso molecular (168).

Las fracciones correspondientes al activador, previa diálisis, se concentraron por liofilización. El material sólido se resuspendió en agua bidestilada.

### IX.2. ACTIVACION DE LA FOSFODIESTERASA DE CEREBRO BOVINO

La enzima de cerebro se incubó con concentraciones crecientes de calmodulina de *T. cruzi* obtenida del Biogel P60 en presencia de 50  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . En la Figura III-25 se observa que la calmodulina del parásito activó la fosfodiesterasa de cerebro bovino lográndose el 50% de estimulación máxima a 350 ng/ml del factor. Este valor fue tres veces mayor que el obtenido con la calmodulina homóloga y puede deberse a diferencias aminoacídicas entre la calmodulina del parásito y la de cerebro.

## X. PURIFICACION DE LA CALMODULINA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

### X.1 CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD CAPP-SEPHAROSA

Dada la gran afinidad de la calmodulina por drogas derivadas de la fenotiazina, se utilizó esta característica para purificar a homogeneidad el activador.

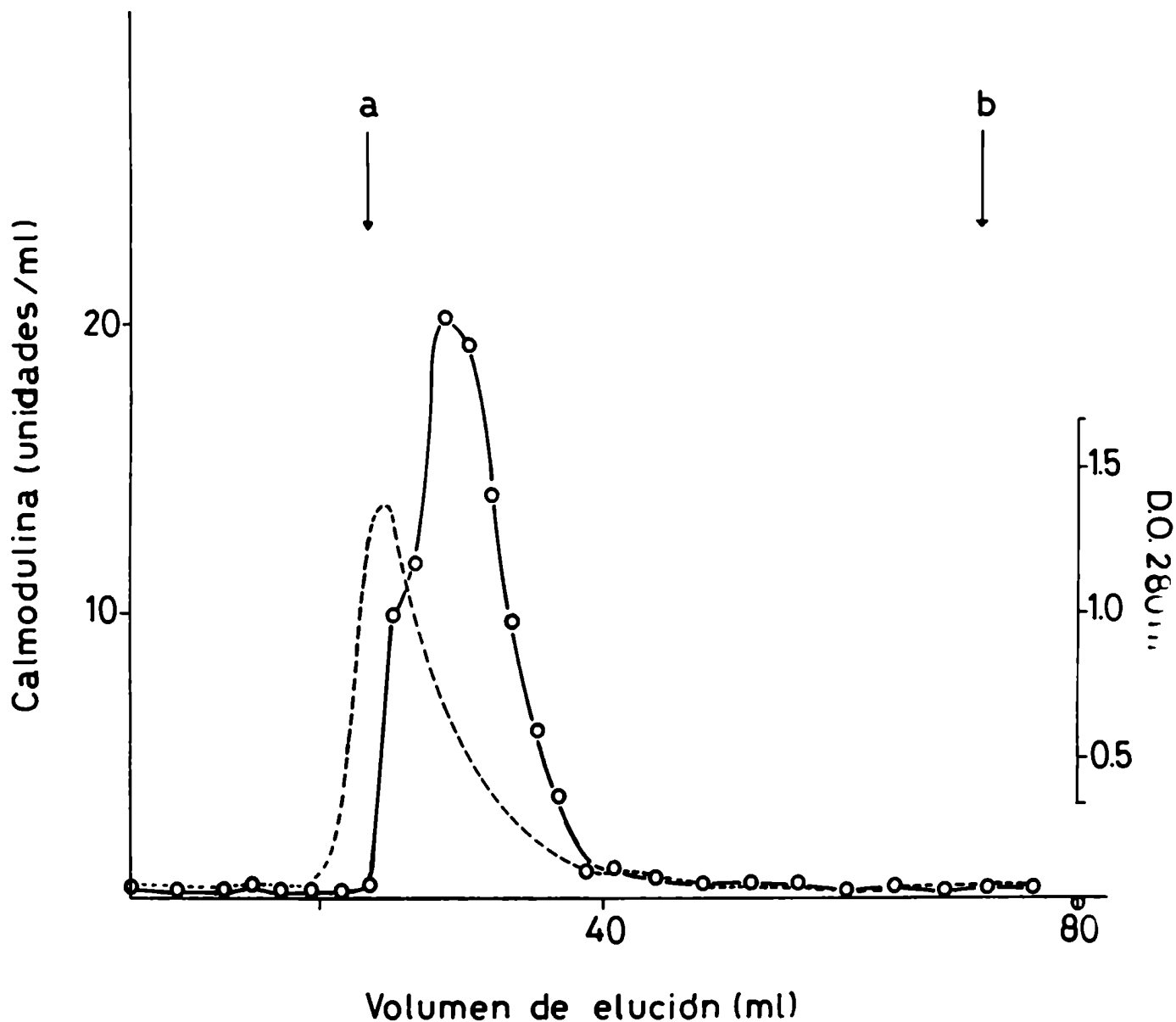


Figura III-24: Filtración en Biogel P60 del extracto de calmodulina proveniente de una DEAE-celulosa. La presencia de calmodulina (O-O) se determinó en alícuotas de las fracciones eluidas. El ensayo se realizó a 200  $\mu$ M [ $^3$ H]-AMPc con la PDE de cerebro bovino (0,04 mg/ml), 50  $\mu$ M  $Ca^{2+}$  y 1 mg/ml BSA. (-----) D.O. a 280 nm. Otras condiciones se describen en Materiales y Métodos. El  $V_o$  y  $V_t$  de la columna se determinaron con azul de dextrano y  $CoCl_2$ , respectivamente.

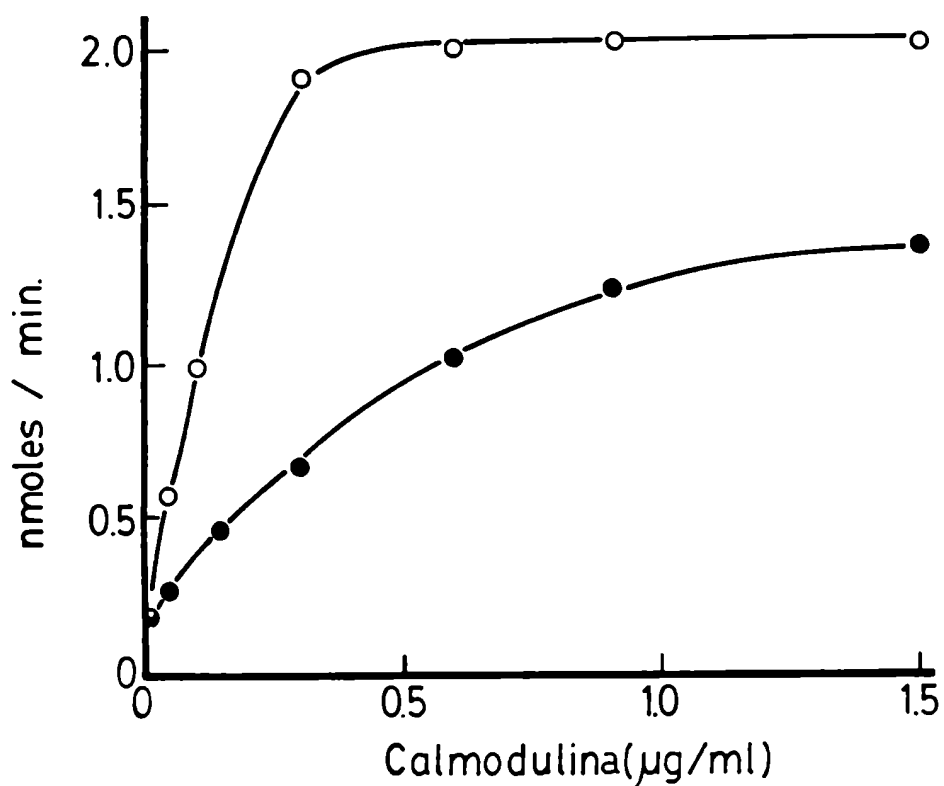


Figura III-25: Activación de la PDE de cerebro bovino por la calmodulina homóloga (○-○) y la heteróloga de *T. cruzi* (●-●). La PDE de cerebro bovino (4 µg/ensayo) se determinó a 200 µM [<sup>3</sup>H]-AMPc en presencia de 50 µM Ca<sup>2+</sup>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml BSA y las concentraciones de CaM indicadas. Otras condiciones están descriptas en Materiales y Métodos.

## Resultados y Discusión

Se efectuó una cromatografía de afinidad en 10(3-amino-propil)fenotiazina-Sepharosa. La calmodulina, obtenida del Biogel P60, se sembró lentamente, en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y previos lavados hasta D.O. a 280 nm nula, se eluyó con EGTA (Figura III-26). Se obtuvo un único pico, que luego de concentrarse, se sembró en un gel de poliacrilamida-SDS al 15%. En la Figura III-27 se observa la corrida electroforética de las calmodulinas de *T. cruzi* (carril B) y de cerebro bovino (carril A) teñidas con Coomassie Blue. La calmodulina del parásito mostró una única banda con un peso molecular aparente de 16 K. El activador de cerebro, purificado de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos mostró una banda de 18,5 K que es característica de esta calmodulina.

El peso molecular (16 K) obtenido, es el mismo que el descrito para las calmodulinas de Trypanosomas africanos y la diferencia de 2,5 K respecto del activador de cerebro no implica necesariamente que la proteína de *T. cruzi* sea más pequeña. Ambos activadores, de cerebro y de Trypanosomas africanos, están compuestos por 148 aminoácidos y las diferencias en el punto isoelectrico y una estructura secundaria más compacta de la calmodulina de los parásitos son las responsables de la migración diferencial en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes (197). En electroforesis no desnaturizante, las calmodulinas de cerebro y de Trypanosomas africanos migraron igual.

Puede ser que la calmodulina de *T. cruzi* sea semejante a la de los Trypanosomas africanos, sin embargo para confirmarlo es necesario tener previamente la secuencia aminoacídica de la proteína.

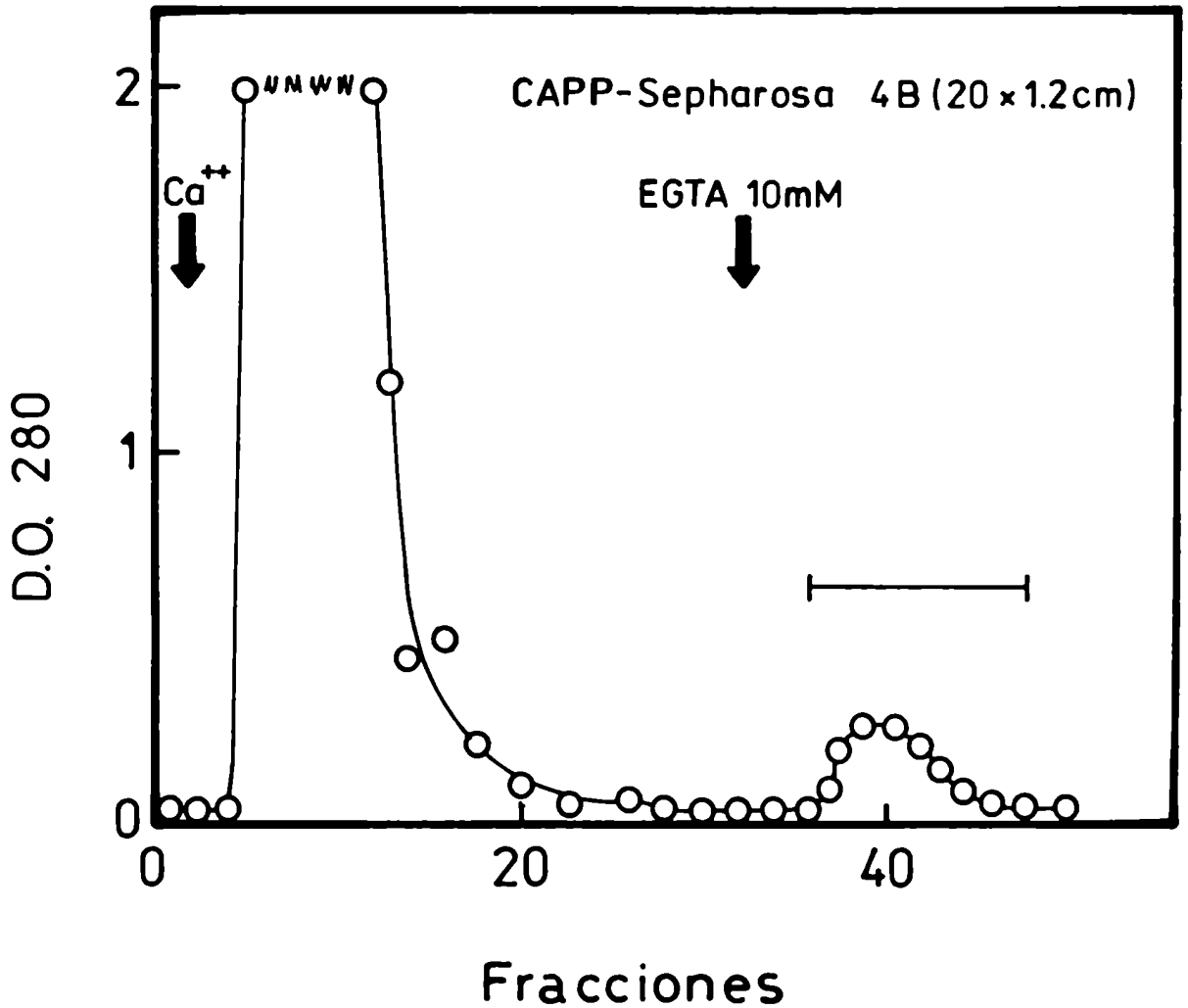


Figura III-26: Cromatografía de afinidad CAPP-Sepharosa. Las fracciones con actividad de calmodulina eluidas del Biogel P60 se sembraron en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la columna de afinidad. La columna se eluyó con 10mM EGTA. El pico de proteínas se determinó por D.O. a 280 nm. Otras condiciones están descritas en Materiales y Métodos.



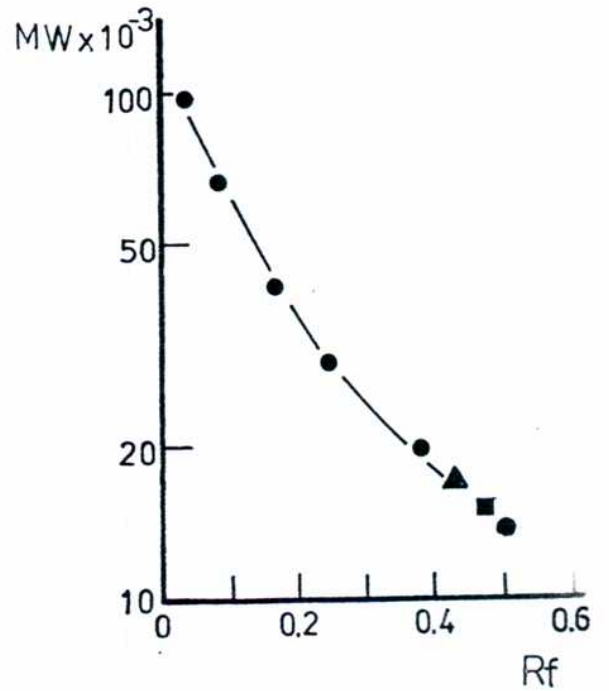
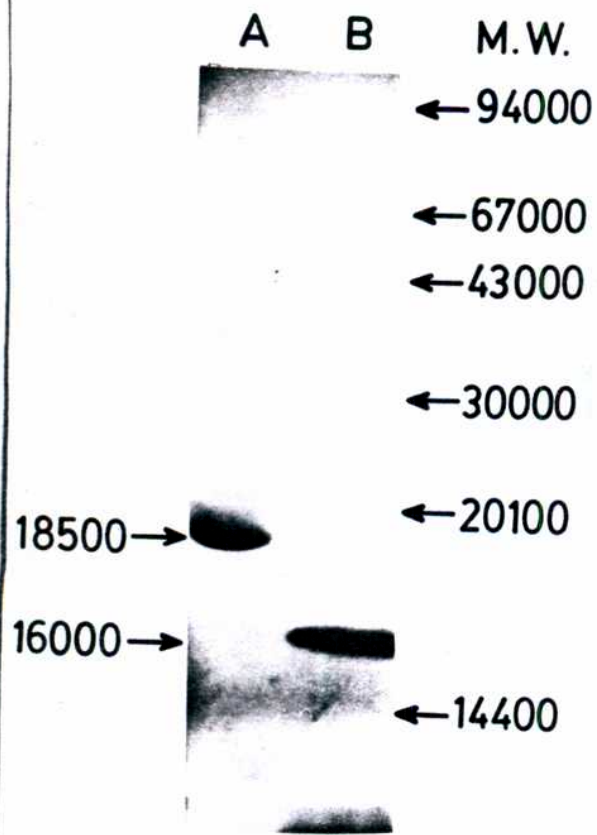


Figura III-27a: Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, teñidos con Coomassie Blue, de la calmodulina de cerebro bovino (A) y de *T. cruzi* (B).

Las proteínas marcadoras de peso molecular fueron: fosforilasa b, BSA, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina de soja y  $\alpha$ -lactalbumina. Otras condiciones están descriptas en Materiales y Métodos.

(b) Curva de calibración de las proteínas marcadoras indicadas, (▲) CaM de cerebro bovino, (■) CaM de *T. cruzi*.

X.2. CROMAT. GRAFIA DE AFINIDAD "PHENYL-SEPHAROSA"

Alternativamente se utilizó esta columna para purificar la calmodulina del parásito. El activador, retenido en la columna, se eluyó con EGTA. Dicha fracción purificada dio una única banda de 16 K en geles de poliacrilamida al igual que el activador purificado por CAPP-Sepharosa.

XI. EFEECTO DE DROGAS SOBRE LA MOVILIDAD DEL PARASITO

La calmodulina del parásito es un blanco de la acción de drogas neurolépticas *in vitro* de acuerdo a los resultados presentados en la Tabla III-4. Con este enfoque se quiso estudiar si estas drogas tenían un efecto citotóxico o modificaban la movilidad del parásito *in vivo*.

Epimastigotes de *T. cruzi* fueron resuspendidos en 45 mM fosfato de sodio pH 8, conteniendo 100 mM NaCl, 5 mM glucosa, 1 mM Ca<sup>2+</sup> y 1 mg/ml de seroalbúmina bovina, hasta una densidad de 2,5x10<sup>6</sup> células/ml. Las células se incubaron a temperatura ambiente en presencia de concentraciones crecientes de clorpromazina y flufenazina y se observaron al microscopio óptico luego de 5 y 20 minutos. Como control se observaron los parásitos incubados en ausencia de drogas.

En la Figura III-28 se observa que a los 5 minutos de incubación la movilidad celular disminuyó en función de la concentración de la droga lograndose un 50% de inhibición a 100 µM de flufenazina o clorpromazina.

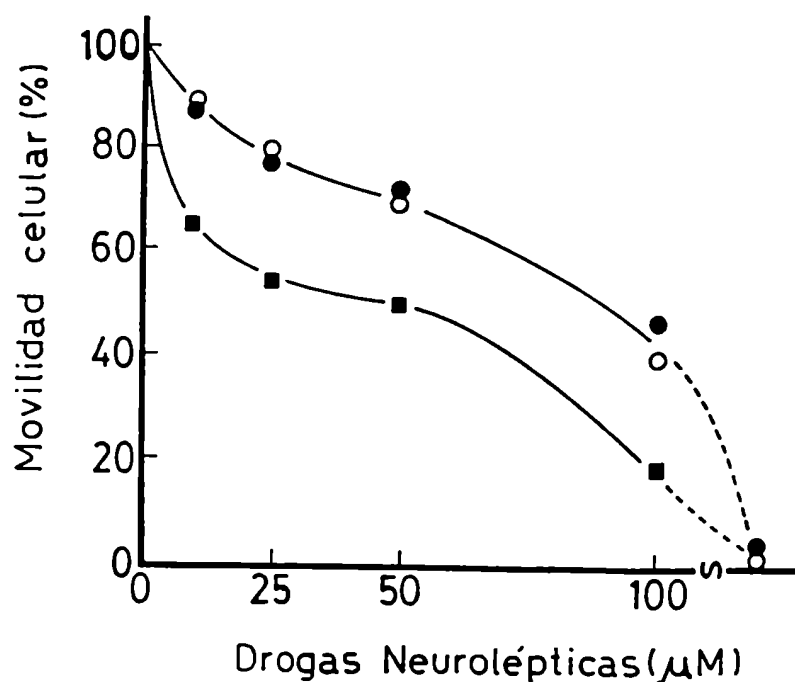


Figura III-28: Movilidad celular en función de la concentración de drogas neurolépticas. Los epimastigotes de *T. cruzi* se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de clorpromazina (O) o flufenazina (●,■). La movilidad celular se determinó a los 5 (O) o 20 (■) minutos de incubación. Las condiciones de incubación de las células están descriptas en Materiales y Métodos.

En incubaciones más prolongadas, el efecto de la droga fue más notorio, observándose un 80% de formas inmóviles con 100  $\mu$ M de flufenazina. A mayores concentraciones de las drogas, la inhibición fue del 100%. Pasados los 20 minutos, las células inmóviles se redondearon y perdieron el flagelo, adquiriendo una forma similar a la de los amastigotes.

Estos resultados indican que la calmodulina estaría involucrada en la movilidad del parásito, lo cual concuerda con numerosas evidencias que sugieren que el movimiento de cilios y flagelos es uno de los fenómenos biológicos regulados por  $Ca^{2+}$  (200 a 206,211).

Las drogas derivadas de la fenotiazina tuvieron además un efecto altamente citotóxico sobre las formas epimastigotes del parásito. Otros autores observaron una acción similar sobre el protozooario parásito *Leishmania donovani* (269), sobre Trypanosomas africanos (197) y sobre *Plasmodium falciparum*, agente causal de la malaria (270). Estas evidencias podrían abrir nuevas posibilidades terapéuticas para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

## DISCUSION

LA PDE, enzima que degrada los nucleótidos cíclicos se ha descripto en numerosos eucaríotes inferiores, presentando en algunos casos más de una forma enzimática. En *S. cerevisiae* se encontraron dos formas enzimáticas, una soluble de alto  $K_m$  que hidroliza ambos nucleótidos cíclicos (271) y una de bajo  $K_m$ , asociada a microsomas, que es específica para AMPc (272). En *Neurospora crassa* (273) se describieron diversas formas de PDE con distinta especificidad de sustratos, que se presentan en formas a-

gregadas interc convertibles entre sí. La PDE I del hongo, que hidroliza tanto AMPc como GMPc con alta afinidad, se regula por calmodulina homóloga y heteróloga (235). En *Mucor rouxii* también se encontró una forma específica de FDE de AMPc que se regula por un mecanismo de fosforilación dependiente del nucleótido y por proteólisis controlada (274,275).

En el protozoario ciliado *Tetrahymena* se demostró actividad de PDE de AMPc en la fracción soluble y asociada a la particulada y de GMPc localizada en la soluble (276). Ambas enzimas presentan dos componentes cinéticos de alta y baja afinidad por el sustrato (0,5 y 50  $\mu\text{M}$  para AMPc y 0,1 y 62  $\mu\text{M}$  para GMPc). Además, se detectó un factor dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  que activa la PDE endógena.

En Trypanosomas la mayor actividad de PDE se describió en la fracción soluble. En *T. gambiense* (47) la enzima está presente en forma tetramérica y monomérica. Ambas formas están en equilibrio entre sí y el agregado de AMPc induce la forma disociada. El  $K_m$  de estas formas es 7  $\mu\text{M}$  para el tetrámero y 35  $\mu\text{M}$  para el monómero. En *T. brucei* (50) existe una única forma enzimática presente en la fracción soluble y en la particulada. Gonçalves y colaboradores (48) describieron en *T. cruzi* una PDE de AMPc soluble con baja afinidad por el sustrato (40  $\mu\text{M}$ ) que es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina.

En este trabajo de Tesis se presentan evidencias sobre la existencia en *T. cruzi* de una PDE soluble que hidroliza ambos nucleótidos cíclicos con alta afinidad (2,5  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ ) y que es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina. La calmodulina modifica la  $V_{\text{máx}}$  pero no la afinidad de la enzima por su sustrato.

De los extractos solubles de *T. cruzi* se purificó un factor termoestable, con características de calmodulina que activa la FDE endógena, la del hongo *N. crassa* (235) y la de cerebro

## Resultados y Discusión

bovino. Entre este trabajo y el de Gonçalves y colaboradores (48) existen diferencias en el modo de extracción y purificación de la enzima, siendo necesaria la presencia de antiproteásicos durante todo el proceso de purificación.

Es interesante notar que la enzima del parásito es reconocida por anticuerpos monoclonales contra la PDE dependiente de calmodulina de *N. crassa*, lo que implica que ambas comparten ciertos epitopes. Además, la calmodulina del hongo activa la PDE del parásito (49) y viceversa (235), indicando otra similitud entre ambas enzimas.

Es difícil asimilar las PDE de eucariotes inferiores a los tipos descritos en eucariotes superiores, sin embargo la enzima del parásito puede considerarse una PDE dependiente de  $Ca^{2+}$ -calmodulina porque cumple los criterios de Cheung (136) para definir dichas enzimas. La PDE de *T. cruzi* requiere  $Ca^{2+}$  para activarse por calmodulina, la activación se revierte por el agregado de EGTA o de drogas fenotiazínicas y la calmodulina está presente en la célula.

Además de regular la PDE, probablemente la calmodulina esté implicada en la regulación del movimiento flagelar. El tratamiento *in vivo* del parásito con drogas fenotiazínicas provocó el detenimiento del batido flagelar y la pérdida de la forma alargada. Probablemente la calmodulina de *T. cruzi* sea muy similar a la de los Trypanosomas africanos, tanto en estructura como en función y localización. En *T. brucei* se localiza en la base del flagelo (199), lo que indica una posible función en la regulación del movimiento del parásito. Mayores estudios son necesarios pues la calmodulina y las enzimas reguladas por ella pueden ser un blanco de acción terapéutica.

Se puede concluir que en *T. cruzi* se han conservado las enzimas directamente involucradas en el metabolismo del AMPc y éstas se comportan en forma similar a las enzimas de eucariotes

## Resultados y Discusión

superiores. Existe una adenilato ciclasa, una quinasa dependiente del nucleótido ; una fosfodiesterasa activada por  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina. Sin embargo, quedan muchas incógnitas por resolver, entre ellas cuál es la señal extracelular que al activar la ciclasa desencadena la diferenciación del parásito; cuál es el o los blancos definitivos de la quinasa dependiente de AMPc y si dicha enzima regula la diferenciación del *Trypanosoma*. Dada la importancia del  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero es necesario estudiar la interrelación de los caminos regulados por ambos mensajeros y su papel en la diferenciación y división celular.

*Rita Cullis*

*Rita Cullis*

#### IV. BIBLIOGRAFIA



- Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1, 155-215 (1909).
- Hoare, C.A. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Blackwell Scientific Publications. Oxford y Edinburgh, 88, 60-80 (1972).
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, ..., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.F.III, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. y Wallace, F.G., J. Protozool. 27, 37-56 (1980).
- 4a. Borst, P., Review, Cell 29, 291-303 (1982)
- 4b. Bangs, J.D., Andrews, N.W., Hart, G.W. y Englad, P., The Journal of Cell. Biology 103, 255-263 (1982)
- Afchain, D., Le Ray, D., Fruit, J., Capron, A. Parasitol. 65, 507-514 (1979).
- Afchain, D., Orozco, O., Dissons, C., Labremetz, J.F., Lemesre, J.L. y Capront, A., J. Protozool. 30, abstract nº 230 (1983).
- Brener, Z. Proceedings of an international symposium held in conjunction with the 5th international congress on protozoology. Scientific Publication N° 347 (1977).
- Nussenzweig, V. y Goble, F.C., Exp. Parasitol. 18, (1966).
- González-Cappa, S.M. y Kagan, I.G., Parasitol. 25, 50-57 (1969).
6. Brener, Z. y Chiari, E., Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 5, 220-224 (1963).
- Goldberg, S.S., Silva Pereira, A.A., Chiari, E., Mares-Guia, M. y Gazzinelli, G., J. Protozool. 23, 179-186 (1976).
- Mancilla, R. y Naquira, C., J. Protozool. 11, 509-514 (1964).
- Miles, M.A., Tove, P.J., Oswald, S.C. y Godfrey, D.G., Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 71, 217-225 (1977).

## Bibliografía

14. Miles, M.A., Souza, A., Póvoa, M., Shaw, J.J., Lainson, R. y Toyé, J.J., *Nature* **272**, 819-821 (1976).
15. Miles, M.A., Lanham, S.M., Souza, A.A. de y Póvoa, M., *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74**, 221-237 (1980).
16. Romanha, A.J., Da Silva Pereira, A.A., Chiari, E. y Kilgour, V., *Comp. Biochem. Physiol.* **62B**, 139-142 (1979).
17. Riou, G.F. y Gutteridge, W.E., *Biochimie* **60**, 365-379 (1978).
18. Mattei, D.M., Goldenberg, S., Morel, C., Azevedo, H.F. y Roitman, I., *FEBS Lett.* **74**, 264-268 (1977).
19. Morel, C. y Simpson, L., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**, 1070-1074 (1980).
20. Frascch, A.C., Goijman, S.C., Cazzulo, J.J. y Stoppani, A.O.M., *Mol. Biochem. Parasitol.* **4**, 163-170 (1981).
21. Contreras, V.T., Salles, J.M., Thomas, N., Morel, C.M., Goldenberg, S., *Mol. Biochem. Parasitol.* **16**, 315-321 (1985).
22. Citri, N. y Grossowicz, N., *J. Gen. Microbiol.* **13**, 273-278 (1955).
23. Boné, G.J. y Parent, G., *J. Gen. Microbiol.* **31**, 261-266 (1963).
24. Montes, G.B.C., Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro (1970).
25. Brack, C., *Acta Tropica (Basel)* **25**, 289-356 (1968).
26. Dvorak, J.A., *Res. P.A.H.O. Scient. Publ.* **318**, 109 (1976).
27. Avila, J.L., Bretaña, A., Casanova, M.A. Avila, A. y Rodríguez, F., *Exp. Parasitol.* **48**, 27-35 (1979a).
28. Katzin, A.M. y Colli, W., *Biochim. Biophys. Acta* **727**, 403-411 (1983).
29. Nogueira, N., Bianco, C. y Cohn, Z., *J. Exp. Med.* **142**, 224-229 (1975).

## Bibliografía

30. Abramo. . ., Lansetti, J.C., Bozzini, J.P. y Wynne de Martini, G., *Medicina* **40**, 52-56 (1980).
31. Camargo, E.F., *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **6**, 93-100 (1964).
32. Castellani, O., Ribeiro, L.V. y Fernandes, J.F., *J. Protozool.* **14**, 451-455 (1967).
33. Chiari, E., *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **16**, 31-87 (1974).
34. Contreras, V.T., Morel, C.M. y Goldenberg, S., *Mol. Biochem. Parasitol.* **14**, 83-96 (1985).
35. Isola, E.L.D., Lammel, E.M., Giovanniello, O., Katzin, A.M. y González-Cappa, S.M., *J. Parasit.* **72**, 467-46 (1986).
36. Janker, C.E., Vaughn, J. y Cory, *Science* **155**, 1565-1566 (1967).
37. Wood, D.E. y Pipkin, A.C., *Exp. Parasitol.* **24**, 176-173 (1969).
38. Wood, D.E. y Souza, O.E., *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **18**, 93-96 (1976).
39. O'Daly, J., *J. Protozool.* **22**, 265-270 (1975).
40. Cuatrecasas, P., *Ann. Rev. Biochem.* **43**, 169-214 (1974).
41. Sher, A. y Snary, D., *Nature (London)* **300**, 639-640 (1982).
42. Pawalek, J.M., *J. Cell. Physiol.* **98**, 619-626 (1979).
- 43a. Murdoch, G.H., Rosenfeld, M.G. y Evans, R.M., *Science* **218**, 1315-1317 (1982).
- 43b. Schwarz, J.P., Quach, T.T., Tang, F., Kageyama, H., Guidotti, A. y Costa, E., *Adv. Cyclic Nucleotide Prot. Phosphorylation Res.* **17**, 529-534 (1984).
44. Martin, R., Voorheis, F.H. y Kennedy, E., *Biochem. J.* **175**, 207-212 (1978).

## Bibliografía

45. Zingales B., Carniol, C., Abrahamsohn, E.A. y Colli, W., *Biochim. Biophys. Acta* **550**, 233-244 (1979).
46. Torruella, M., Flawiá, M.M., Eisenschlos, C., Molina y Vedia, M., Rubinstein, C.F. y Torres, H.N., *Biochem. J.* **234**, 145-150 (1986).
47. Walter, R.D. y Hoppe-Seyler's, *Physiol. Chem.* **355**, 1443-1450 (1974).
48. Gonçalves, M.F., Zingales, B. y Colli, W., *Mol. Biochem. Parasitol.* **1**, 107-118 (1980).
49. Téllez-Iñón, M.T., Ulloa, R.M., Torruella, M. y Torres, H.N., *Mol. Biochem. Parasitol.* **17**, 143-153 (1985).
50. Walter, R.D. y Opperdoes, F.R., *Mol. Biochem. Parasitol.* **6**, 287-295 (1982).  
  
Walter, R.D. *The Biochemistry of Parasites*, (Slutzky, G.M., ed.), pp. 151-167, Pergamon Press, Oxford and New York.
52. Walter, R.D., *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 137-146 (1976).
53. Walter, R.D. y Hoppe-Seyler's. *Z., Physiol. Chem.* **359**, 601-606 (1978).
54. Walter, R.D. y Hoppe-Seyler's, *Physiol. Chem.* **359**, 607-612 (1978).
55. Rangel-Aldao, R., Tovar, G. y Ledezma de Ruiz, M., *Biol. Chem.* **258**, 6979-6983 (1983).
56. Rangel-Aldao, R. y Opperdoes, F.R., *Mol. Biochem. Parasitol.* **10**, 231-241 (1984).
57. Walter, R.D., Buse, E. y Ebert, F., *Trop. Med. Parasitol.* **29**, 439-442 (1978).
58. Oliveira, M.M., Antunes, A., Silva, R. y Mello de, F.G., BQ19, VII Reuniao Anual de Pesquisa Basica en Doença de Chagas, Hotel Gloria, Caxambú, M.G., Brasil (1980).
- 59a. Strickler, J. y Patton, C.L., *Science* **190**, 1110-1111 (1975).

## Bibliografía

- 59b. Mancini, P.E. y Patton, C.L., *Mol. Biochem. Parasitol.* **3**, 19-31 (1981).
60. Rangel-Aldao, R., Allende, O., Triana, F., Piras, R., Henriquez, D. y Piras, M., *Mol. Biochem. Parasitol.* **22**, 39-45 (1987)
61. Flawiá, M.M. Torres, H.N., *J. Biol. Chem.* **247**, 6873 (1972).
62. Kornblihtt, A.R., Flawiá, M.M. y Torres, H.N., *Biochem.* **20**, 1262 (1981).
63. Torres, H.N., *Endocrinología Molecular*, Ed. El Ateneo, Cap. 7, pp. 75, Bs.As. (1980).
64. Weiss, B., *Biogenic Amines as Physiological Regulators*, J.J. Blum Ed., Prentice Hall, New Jersey (1970).
65. Chlapowski, F.J. y Bütcher, R.W., *Biochim. Biophys. Acta* **309**, 138 (1973).
66. Varimo, K. y Londesborough, J., *Biochem. J.* **159**, 363 (1976).
67. Hirata, M. y Hayaishi, O., *Biochem. Biophys. Acta* **149**, (1967).
68. Tao, M. y Lipmann, F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **63**, 86 (1969).
- 69a. Robinson, G.A., Butcher, R.W. y Sutherland, E.W., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **139**, 703 (1967).
- 69b. Insel, P.A., Maguire, M.E., Gilman, A.G., Bourne, H.R., Coffino, F. y Melmon, K.L., *Mol. Pharmacol.* **12**, 1062 (1976).
70. Limbird, L.E. y Lefcowitz, R.J., *J. Biol. Chem.* **252**, 795 (1977).
71. Haga, T., Haga, K. y Gilman, A.G., *J. Biol. Chem.* **252**, 5776 (1977).
- Johnson, G.L., Kaslow, H.R., Farfel, Z. y Bourne, H.R., *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **13**, 1 (1980).

## Bibliografía

- Voorheis, F.h. y Martin, R.B., *Eur. J. Biochem.* **113**, 223-227 (1981).
74. Voorheis, F.h. y Martin, R.B., *Eur. J. Biochem.* **116**, 471-477 (1981).
75. Voorheis, F.h. y Martin, R.B., *Eur. J. Biochem.* **123**, 371-376 (1982).
76. Eisenschlos, C.D., Flawiá, M.M., Torruella, M. y Torres, H.N., *Biochem. J.* **236**, 185-191 (1986).
77. Eisenschlos, C.D., Paladini, A.A., Molina y Vedia, L., Torres, H.N. y Flawiá, M.M., *Biochem. J.* **237**, 913-917 (1986).
78. Sutherland, E.W. y Rall, T.W., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3606 (1957).
79. Sutherland, E.W. y Rall, T.W., *Biol. Chem.* **232**, 1077 (1958).
80. Walsh, D.A., Ferkins, J.P. y Krebs, E.G., *Biol. Chem.* **243**(13), 3763-3774 (1968).
- 81a. Tsuzuki, J. y Kiger, J.A., *Biochemistry* **17**, 2961-2970 (1978).
- 81b. Builder, S.E., Beavo, J.A. y Krebs, E.G., *Supramol. Struct.* **3**, 26 (1979).
- 81c. Palmer, W.K., McPherson, J.M. y Walsh, D.A., *J. Biol. Chem.* **255**, 2663-2666 (1980).
82. Connelly, P.A., Hastings, T.G. y Reimann, E.M., *J. Biol. Chem.* **261**, 2325-2330 (1986).
83. Cobb, C. y Corbin, J.D., *J. Biol. Chem.* **262**, 16566-16575 (1987).
84. Hoppe, J., *Trends Biochem. Sci.* **10**, 29-31 (1985).
85. Beebe, S.J., Holloway, R., Rannels, S. y Corbin, J.D., *J. Biol. Chem.* **259**, 3539-3547 (1984).
86. Steinberg, R.A., Russel, J.L., Murphy, C.S. y Yphantis, D.A., *J. Biol. Chem.* **262**, 2664-2671 (1987).

## Bibliografía

87. Rangel-Aldao, R., Kuprec, J.W. y Rosen, O.M., *J. Biol. Chem.* **254**, 2499-2508 (1979).
88. Takio, K., Smith, S.B., Krebs, E.G., Walsh, K.A. y Titani, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2544-2548 (1982).
89. Titani, K., Sasagawa, T., Ericsson, L.H., Kumar, S., Smith, S.B., Krebs, E.G. y Walsh, K.A., *Biochemistry* **23**, 4193-4199 (1984).
90. Ekanger, R., Sand, T.-E., Øgreid, D., Christoffersen, T. y Døskeland, S.O., *J. Biol. Chem.* **260**, 3393-3401 (1985).
91. Geahlen, R.L. y Krebs, E.G., *J. Biol. Chem.* **255**, 1164 (1980).
92. Rangel-Aldao, R. y Rosen, O.M., *J. Biol. Chem.* **252**, 7140-7145 (1977).
93. Blumenthal, D.K., Takio, K., Hausen, R.S., Krebs, E.G., *J. Biol. Chem.* **261**, 8140-8145 (1986).
94. Kapoor, C.L., Beavo, J.A. y Steiner, A.L., *J. Biol. Chem.* **255**, 12427-12432 (1980).
95. Lee, D.C., Carmichael, D.F., Krebs, E.G. y McKnight, G.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3608-3612 (1983).
96. Takio, K., Smith, S.B., Krebs, E.G., Walsh, K.A. y Titani, K., *Biochemistry* **84**, 4200-4206 (1984).
97. Jahnsen, T., Hedin, L., Kidd, V.J., Beattie, W.G., Lohmann, S.M., Walter, U., Durica, J., Schulz, T.Z., Schiltz, E., Browner, M., Lawrence, C.B., Goldman, D., Ratcliffe, S.L. y Richards, J.S., *J. Biol. Chem.* **261**, 12352-12357 (1986).
- 98a. McKay, D.B. y Steitz, T.A., *Nature (London)* **290**, 744-749 (1981).
- 98b. Weber, T., Takio, K., Titani, K. y Steitz, T.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7679-7683 (1982).
99. Mutzel, R., Lacombe, M.L., Simon, M.N., Gunzburg, J. y Veron, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6-10 (1987).

## Bibliografía

100. Jahnson, T., Hedin, L., Lohmann, S.M., Walter, U. y Richerson, J.S., *J. Biol. Chem.* **261**, 6637-6639 (1986).
- 101a. Weber, W. y Hilz, H., *Biochemistry* **25**, 5661-5667 (1986).
- 101b. Nigg, E.A., Hilz, H., Eppenberger, H.M. y Dutley, F., *EMBO J.* **4**, 2801-2806 (1985).
102. Khatra, B.S., Printz, R., Cobb, C.E. y Corbin, J.D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **130**, 567-573 (1985).
103. Jungmann, R.A. y Kranias, E.G., *Int. J. Biochem* **8**, 819-830 (1977).
104. Johnson, E.M., *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **8**, 267-300 (1977).
105. Lohmann, S.M., De Camilli, P., Einig, J. y Walter, U., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6723-6727 (1984).
106. Kurosawa, A., Guidotti, A. y Costa, E., *Science* **193**, 691-693 (1976).
107. Chuang, D., Hollenbeck, R.A. y Costa, E., *J. Biol. Chem.* **252**, 8365-8373 (1977).
108. Squinto, S.P., Kelley-Geraghty, D.C., Knettel, M.R. y Jungmann, R.A., *J. Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Res.* **10**, 65-73 (1985).
109. Wynshaw-Boris, A., Gorss Lugo, T., Short, J.M., Fournier R.E.K. y Hanson, R.W., *J. Biol. Chem.* **254**, 12161-12169 (1984).
110. Constantinou, A.I., Squinto, S.P. y Jungmann, R.A., *Cell.* **42**, 429-437 (1985).
111. Uhler, M.D., Chrivia, J.C. y McKnight, G.S., *J. Biol. Chem.* **261**, 15360-15363 (1986).
112. Cheng, H.C., Van Patten, S.M., Smith, A.J. y Walsh, D.A., *Biochem. J.* **231**, 655-661 (1985).
113. Gagelmann, M., Reed, J., Kübler, D., Pyerin, W. y Kinzel, V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2492-2496 (1980).
- 114a. Hemmings, B.A., *FEBS* **196**, 126-130 (1986).



## Bibliografía

- 114b. Schwach. Biochem. J. **248**, 243-250 (1987).
115. Gill, S.N., Walton, G.M., Sperry, P.J., Biol. Chem. **252**, 6445-6448 (1977).
116. Tatic, E., Wade, R.D., Smith, S.E., Krebs, E.G., Walsh, K.A. y Titani, K., Biochemistry **23**, 4207-4218 (1984).
117. Lincoln, T.R., Flockhart, D.A. y Corbin, J.D., J. Biol. Chem. **253**, 6002-6009 (1978).
118. Walter, R.D., Mol. Biochem. Parasitol. **1**, 139-142 (1980).
119. Rangel-Aldac, R., Allende, O. y Cayama, E., Mol. Biochem. Parasitol. **14**, 75-82 (1985).
120. Butcher, R.W. y Sutherland, E.W., J. Biol. Chem. **237**, 1244-1250 (1962).
121. Thompson, W. y Appleman, M.M., Biochemistry **10**, 311-316 (1975).
122. Monn, E. Christiansen, R.O., Science **173**, 540-542 (1971).
123. Russell, T.R., Terasaki, W.L. y Appleman, M.M., J. Biol. Chem. **248**, 1334-1340 (1973).
124. Uzunov, F. y Weiss, B., Biochim. Biophys. Acta **284**, 220-226 (1972).
125. Pledger, W.J., Stancel, G.M., Thompson, W.J. y Strada, S.J., Biochim. Biophys. Acta **370**, 242-248 (1974).
126. Pichard, A.L. y Cheung, W.Y., J. Biol. Chem. **251**, 5737 (1976).
127. Strada, S.J. y Thompson, W.J., Adv. Cyclic Nucleotide Res. **9**, 265-288 (1978). Raven Press Ltd., New York.
128. Kincaid, R.L., Manganiello, V.C. y Vaughan, M., J. Biol. Chem. **256**, 11345-11350 (1981).
129. Téllez-Inón, M.T. y Torres, H.N., Mol. Cell. Biochem. **43**, 151-166 (1982).

## Bibliografía

130. Beavo, J.A., Hansen, F.E., Harrison, S.A., Hurwitz, R.L., Martin, T.J. y Mumby, M.C., *Molec. Cell. Endocrinol.* **28**, 337-410 (1982).
131. Weiss, B., *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **5**, 195-211 (1975). Raven Press Ltd, New York.
132. Cheung, W.Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 533-536 (1970).
133. Kakiuchi, S. y Yamasaki, R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41**, 1104-1110 (1970).
134. Teo, T.S. y Wang, J.H., *J. Biol. Chem.* **248**, 5950-5955 (1973).
135. Lin, Y.M., Liu, Y.P. y Cheung, W.Y., *J. Biol. Chem.* **249**, 4943-4954 (1974).
136. Cheung, W.Y., *Science* **207**, 19-27 (1980).
137. Ho, H.C., Wirch, E., Stevens, F.C. y Wang, J.H., *J. Biol. Chem.* **252**, 43-50 (1977).
138. La Porte, D.C., Toscano, W.A. y Storm, D.R., *Biochemistry* **18**, 2820-2825 (1979).
139. Sharma, R.K., Wang, T.H., Wirch, E. y Wang, J.H., *J. Biol. Chem.* **255**, 5 (1980).
140. Klee, C.B., Crouch, T.H. y Krinks, M.H., *Biochemistry* **18**, 722-729 (1979).
141. Tucker, M.M., Robinson, J.B. y Stellwagon, E., *J. Biol. Chem.* **256**, 9051-9058 (1981).
142. Smoake, J.A., Johnson, C.S. y Peake, G.T., *Arch. Biochem. Biophys.* **206**, 331-335 (1981).
143. Purvis, K., Olsen, A. y Hansson, V., *J. Biol. Chem.* **256**, 11434-11441 (1981).
144. Vaughan, M., Danello, M.A., Manganiello, V.C. y Strewler, G.J., *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **14**, 263-271 (1981).
145. Coquil, J.F., Franke, D.J., Wells, J.N., Dupuis, M. y Hamet, P., *Biochim. Biophys. Acta* **631**, 148-165 (1980).

## Bibliografía

146. Franci S.H., Lincoln y Corbin, J.D., *J. Biol. Chem.* 255, 620-626 (1980).
147. Stryer, L., *Ann. Rev. Neurosci.* 9, 87-119 (1986).
148. Appleman, M.M., Thompson, W.J. y Russell, T.R., *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 3, 65-98 (1973).
149. Manganiello, V.C., Smith, C.J., Newman, A.H., Rice, K., Degerman, E. y Belfrage, P., *J. Cyclic Nucleotide Prot. Phosphorylation Res.* 11, 497-511 (1987). Raven Press Ltd., New York.
150. Saltiel, A.R., Fox, J.A., Sherline, P. y Cuatrecasas, P., *Science* 233, 967-971 (1986).
151. Kelly, S.J. y Butler, J., *Biochemistry* 16, 1102-1104 (1977).
152. Helfman, D.M., Shoji, M. y Kuo, J.F., *J. Biol. Chem.* 256, 6327-6334 (1981).
153. Weishaar, R.E., *J. Cyclic Nucleotide and Prot. Phosphorylation Res.* 11, 463-472 (1987). Raven Press Ltd., New York.
154. Rudolph, S.A., Johnson, E.M. y Greengard, P., *J. Biol. Chem.* 246, 1271-1275 (1971).
155. Goldberg, N.D., Walseth, T.F., Stephenson, J.H., Krick T.P. y Graff, G., *J. Biol. Chem.* 255, 10344-10347 (1980).
156. Means, A.R. y Dedman, J.E., *Nature* 285, 73-77 (1980).
157. Wang, J.H. y Waissman, D.M., *Eur. Topics. Cell. Reg.* 15, 47-107 (1979).
158. Klee, C.B., Crouch, T.H. y Richman, P.G., *Ann. Rev. Biochem.* 49, 489-515 (1980).
159. Klee, C.E., *Biochemistry* 16, 1017-1024 (1977).
160. Walsh, M., Stevens, F.J., Oikawa, K. y Kay, C.M., *Biochemistry* 17, 3924-3930 (1978).
161. Babu, Y.S., Sack, J.E., Greenhough, T.J., Bugg, C.E., Means, A.R. y Cook, W.J., *Nature* 315, 37-40 (1985).

## Bibliografía

162. Walsh, M., Stevens, F.C., Kuznicki, J. y Drabikowski, W.J., Biol. Chem. 252, 7440-7443 (1977).
163. Guerine, D., Krebs, J. y Carafoli, E., J. Biol. Chem. 259, 15172-15177 (1984).
164. Kretzinger, R.H. y Barry, C.D., Biochem. Biophys. Acta 405, 40-52 (1975).
165. Marshak, D.R., Clarke, M., Roberts, D.M. y Watterson, D.M., Biochemistry 23, 2891-2899 (1984).
166. Putkey, J.A., Slaughter, G.R. y Means, A.R., J. Biol. Chem. 260, 4704-4712 (1985).
167. Baba, M.L., Goodman, M., Berger-Cohn, J., De Maille, J.G. y Matsuda, G., Molec. Biol. Evol. 1, 442-455 (1984).
168. Klee, C.B. y Vanaman, T.C., Adv. Protein. Chem. 35, 213-321 (1982).
169. Dedman, J.R., Potter, J.D. y Means, A.F., J. Biol. Chem. 252, 2437-2440 (1977).
170. Dedman, J.R., Jackson, R.L., Schreiber, W.E. y Means, A.R., J. Biol. Chem. 253, 343-346 (1978).
171. Manalan, A.S. y Klee, C.B., Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation res. 18, 227-278 (1984).
172. Hayakawa, T., Perkins, J.P., Walsh, D.A. y Krebs, E.G. Biochemistry 12, 567-573 (1973).
173. Cohen, P., Burchell, A., Foulkes, J.G., Cohen, P.T. Vanaman, T.C. y Nairn, A.C., FEBS Lett. 92, 237-240 (1978).
174. Adelstein, R.S., Conti, M.A., Hathaway, D.R. y Klee, C.B., J. Biol. Chem. 253, 8347-8350 (1978).
175. Creutz, C.E., Pazoles, C.J. y Pollard, H.B., J. Biol. Chem. 253, 2858 (1978).
176. Schulman, H. y Greengard, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5432-5436 (1978).

## Bibliografía

- 177a. De Lorenzo, R.J., Freedman, S.D., Yobe, W.B. y Maurer, S.C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1838 (1979).
- 177b. Nairn, A.C., Hemmings, H.C.(Jr.) y Greengard, P., Ann. Rev. Biochem. 54, 931-976 (1986).
178. Ratan, R.R. y Shelanski, M.L., Trends Biochem. Sci. 11, 456-459 (1986).
179. Chafouleas, J.G., Bolton, W.E., Hidaka, H., Boyd, A.E. y Means, A.R., Cell 28, 41-50 (1982).
180. Sasaki, Y. y Hidaka, H., Biochem. Biophys. Res. Comm. 104, 451-456 (1982).
181. Simmen, R.C.M., J. Biol. Chem. 260, 907-912 (1985).
182. Longberg, N. y Gilbert, W., Cell 40, 81-90 (1985).
183. Stein, J.F., Munjaal, R.P., Lagace, L., Lai, E.C., O'Malley, B.W. y Means, A.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6485-6489 (1983).
184. Chien, Y.-H. y Dawid, I.B., Mol. Cell. Biol. 4, 507-5 (1984).
185. Davis, T.N., Urdea, M.S., Masiarz, F.F. y Thorner, Cell 47, 423-431 (1986).
186. Goldhagen, H. y Clarke, M., Mol. Cell. Biol. 6, 1851-1854 (1986).
187. Yamanaka, M.K. y Kelly, L.E., J. Neurogenetics 2, 325 (1985)
188. Tschudi, C., Young, A.S., Ruben, L., Patton, C.L. Richards, F.F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3998-4001 (1985).
189. Iida, Y., J. Mol. Biol. 159, 167-177 (1982).
190. Watterson, D.M., Sharrief, F. y Vanaman, T.C., J. Biol. Chem. 255, 962-971 (1980).
191. Toda, H., Yazawa, M., Kondo, K., Honma, T., Narita, K. y Yagi, K., J. Biol. Chem. 90, 1493-1505 (1981).

## Bibliografía

192. Takagi, T., Nemoto, T., Konishi, K., Yasawa, M. y Yagi, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**, 377-381 (1980).
193. Yasawa, M., Yagi, K., Toda, H., Kondo, H., Narita, K., Yamashi, R., Sobue, K., Kakiuchi, S., Nagano, S. y Nozawa, Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**, 1051-1057 (1981).
194. Putkey, J.A., Draetta, G.F., Slaughter, G.R., Klee, C.E., Cohen, F., Stull, J.T. y Means, A.R., *J. Biol. Chem.* **261**, 9896-9903 (1986).
195. Gregori, L., Marriotti, D., West, C.M. y Chan, V., *J. Biol. Chem.* **260**, 5232-5235 (1985).
196. Schaefer, W.H., Lukas, T.J., Blair, I.A., Schultz, J.E. y Watterson, M.D., *J. Biol. Chem.* **262**, 1025-1029 (1987).
197. Ruben, L. y Patton, C.L., *Mol. Biochem. Parasitol.* **17**, 331-341 (1985).
198. Ruben, L., Egwuagu, C. y Patton, C.L., *Biochim. Biophys. Acta* **758**, 104-113 (1983).
199. Ruben, L., Webster, F. y Patton, C.L., *Fed. Proc.* **43**, (1984).
- 200a. Stavis, R.L. y Hirschberg, R., *Cell. Biol.* **59**, 367-377 (1973).
- 200b. Schmidt, J.A. y Eckert, R., *Nature* **262**, 713 (1976).
201. Eckert, R., Naitoh, Y. y Machemer, H., *Symp. Soc. Exp. Biol.* **30**, 233 (1976).
202. Takahashi, M. y Tonomura, Y., *J. Biochem.* **84**, 1339 (1977).
203. Satir, P., *Science* **190**, 586-588 (1975).
204. Tsuchiya, T., *Comp. Biochem. Physiol.* **56A**, 353 (1977).
205. Holwill, M.E.J. y McGregor, J.L., *Nature* **255**, 156 (1975).
206. Gibbons, B.H. y Gibbons, B.H., *Cell. Biol.* **84**, (1980).
207. Ohnishi, K., Suzuki, K. y Watanabe, Y., *Exp. Cell. Res.* **137**, 217-227 (1982).

## Bibliografía

208. Thiele, J., Klumpp, S., Schultz,                    y Bardele, C.F.,  
Eur. J. Cell. Biol. 28, 3-11 (1982)
209. Barnes, D.M., Science 234, 286-289
210. Putney, J.W., Cell. Calcium 7, 1-12 (1986).
211. Kung, C. y Saimi, Y., Ann. Rev. Physiol. 44, 519-534  
(1982).
212. Mainle, N.J., Garofalo, R.S. y Satir, B.H., J. Cell. Biol.  
83, 476a (1979).
213. Gitelman, S. y Witman, G.E., J. Cell. Biol. 98, 764-770  
(1980).
214. Stommel, E.W., Stephens, R.E., Masure, H.R. y Head, J.F.  
J. Cell. Biol. 92, 622-626 (1982).
215. Hirshberg, R. y Hutchinson, W.,                    Microbiol. 26,  
265-267 (1980).
216. Reed, W. y Satir, F., Ann. N.Y.                    Sci. 356, 423-428  
(1980).
217. Satir, P., J. Protozool. 31, 8-12 (1984)
218. Gerez de Burgos, N.M., Burgos, C., Blanco, A., Paulone, I.  
y Segura, E.L., Acta Physiol. Lat. Am. 26, 10-19 (1976).
219. Roskoski, R., Meth. Enzimol. 99, 3-6 (1983).
220. Døskeland, S.O. y Ueland, P.M., Biochem.                    165, 561-573  
(1977).
221. Londesborough, J., Anal. Biochem. 71, 623-628 (1976).
222. Lowry, O.H., Rosenborough, N.J., Farr, A.L. y Randall,  
J., J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
223. Worthington Enzyme Manual (1977), Worthington Biochemical  
Corporation, pp. 7.
224. Terenzi, H.F., Roselmo,                    Eur.  
Biochem. 18, 342 (1971).

## Bibliografía

- Glynn, L.M. y Chappell, J.B., *Biochem.* **90**, 147-149 (1984)
226. Cuatrecasas, P., *J. Biol. Chem.* **245**, 3058 (1970).
227. Dills, W.L., Goodwin, C.D., Lincoln, T.M., Beavo, J.A., Bechtel, P.J., Corbin, J.D. y Krebs, E.G., *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **10**, 199-217 (1979).
228. Rangel-Aldao, R., *Arch. Biol. Med. Exper.* **12**, 283 (1979).
229. Beavo, J.A., Bechtel, P.J. y Krebs, E.G., *Meth. Enzym.* **38**, 299-308 (1974).
230. Rannels, S.R., Beasley, A. y Corbin, J.D., *Meth. Enzymol.* **99**, 55-62 (1983).
231. Trevillyan, J.M. y Pall, M.L., *J. Biol. Chem.* **257**, 3970 (1982).
232. Bowen, E.J., Steinberg, J., Laemmli, U.K. y Weintraub, H., *Nucl. Acid. Res.* **8**, 1-20 (1980).
233. Schaltman, K. y Pongs, S.O., *Hoppe-Seyler's, Z., Physiol. Chem.* **361**, 207-212 (1980).
234. Klee, C.B. y Krinks, M.H., *Biochemistry* **17**, 120-126 (1978).
235. Téllez-Iñón, M.T., Ulloa, R.M., Glikin, G.C. y Tamm, H.N., *Biochem. J.* **232**, 425-430 (1985).
236. Köhler, G. y Milstein, C., *Nature* **256**, 495 (1975).
237. Garberi, J.C., Macario, A.J.L. y Conway de Macario, E., *J. Bacteriol.* **164**, 1-6 (1985).
238. Jamieson, G.A. y Vanaman, T.C., *Biochem. Biophys. Commun.* **90**, 1048-1055 (1979).
239. Gopalakrishna, R. y Anderson, W.B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 830-836 (1983).
240. Bazari, W.L. y Clarke, M., *J. Biol. Chem.* **256**, 3598-3603 (1981).



## Bibliografía

241. Judewicz, N., Glikin, G.C. y Torres, H.N., *Mol. Cell. Biochem.* **46**, 121-127 (1982).
242. Moreno, S.M. y Passeron. *Arch. Biochem. Biophys.* **199**, 321-326 (1980).
243. Pastori, R., Kerner, N., Moreno, S.M. y Passeron, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**, 663-667 (1981).
244. Rutherford, C.L., Vaughan, R.L., Cloutier, M.L., Ferris D.K. y Brickey, D.A., *Biochemistry* **23**, 4611-4617 (1984).
245. Pall, M.. manuscrito en preparación.
246. Takai, Y., Sakai, K., Morishita, Y., Yamamura, H. y Nishizuka, Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**, 646-652 (1974).
247. Hixson, C.S. y Krebs, E.G., *J. Biol. Chem.* **255**, 2137-2140 (1980).
248. Takai, Y., Yamamura, H. y Nishizuka, Y., *J. Biol. Chem.* **249**, 530-535 (1974).
249. Sy, J. y Roselle, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2874-2877 (1982).
250. Uno, I. y Ishikawa, T., *J. Biochem* **89**, 1275 (1981).
251. Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. y Wigler, M., *Cell* **50**, 277-287 (1987).
252. Murayama, T., Uno, I., Hamamoto, K. y Ishikawa, T., *Arch Microbiol.* **142**, 109-112 (1985).
253. Lopes Gomes, S., Juliani, M.H., Costa Maia, J.C. y Aldao, R., *J. Biol. Chem.* **258**, 6972-6978 (1983).
254. Brochetto-Braga, M.R., Lopes-Gomes, S. y Costa Maia, J.C., *Arch. Biochem. Biophys.* **217**, 295-304 (1982).
255. Sampson, J., *Cell* **11**, 173-180 (1977).
256. Leichtling, E.H., Spitz, E. y Rickenberg, H.V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 515-522 (1981).
257. Gunzburg, J. y Veron, M., *EMBO. J.* **1**, 1063-1068 (1982).

## Bibliografía

258. Rutherford, C.L., Taylor, P.D., Franke, L.T. y Auck, R.L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**, 1210-1220 (1982).
259. Gerish, G., *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 853-879 (1987).
260. Mann, S.K.O. y Firtel, R.A., *Mol. Cell. Biol.* **7**, 458-469 (1987).
261. Woffendin, C., Chambers, T.C., Schaller, K., Leichtling, B.H. y Rickenberg, H.V., *Dev. Biol.* **115**, 1-8 (1986).
- 262a. Gross, J.D., Town, C.D., Brookman, J.J., Jernyn, K.A., Peacey, M.J. y Kay, R.R., *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B.* **295**, 495-508 (1981).
- 262b. Gross, J.D., Bradbury, J., Kay, R.R. y Peacey, M.J., *Nature (London)* **303**, 244-245 (1983).
263. Gunzburg, J., Part, D., Guiso, N. y Veron, M., *Biochemistry* **23**, 3805-3812 (1984).
264. Kudo, S. y Nozawa, Y., *Protozool.* **30**, 30-36 (1983).
265. Chevalier, M., Gunzburg, J. y Veron, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**, 651-656 (1986).
266. Strada, S.J., Martin, M.W. y Thompson, W.J., *Adv. Cyclic Nucl. Res.* **16**, 13-29 (1984).
267. Bartfai, T., *Adv. Cyclic Nucl. Res.* **10**, 219-242 (1979).
268. Téllez-Iñón, M.T., Ulloa, R.M., Rubinstein, C.P. y Torre H.N., comunicación presentada en la XXI Reunión Anual de SAIB, Huerta Grande, Córdoba (1985).
269. Pearson, R.D., Marian, A.A., Marcus, J.W., Hall, D., Hewlett, E.L., *Science* **217**, 369-370 (1982).
270. Scheibel, L.W., Colombani, P.M., Mess, A.D., Aikawa, M., Atkinson, C.T. y Milhous, N.K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7310-7314 (1987).
271. Londesborough, J. y Suoranta, K., *Biol. Chem.* **258**, 2966-2972 (1983).
272. Londesborough, J. y Jonkkari, L., *Mol. Cell. Biochem.* **46**, 65-70 (1982).

## Bibliografía

273. Teller Iñon, M.T., Glikin, G.C. Torres, H.N., Biochem. J. 203 611-616 (1982).
274. Galvagno, M.A., Moreno, S.M., Cantore, N.L. y Passeron, S., Arch. Biochem. Biophys. 89, 779 (1979).
275. Galvagno, M.A., Moreno, S.M. y Passeron, S. Arch. Biochem. Biophys. 214, 573 (1982).
276. Kudo, S. Nakasawa, K. y Nozawa, Y., J. Protozool. 27, 342-344 (1980).

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

a:	radio de Stokes
5'AMP:	5'Adenosina monofosfato
ADN:	ácido desoxirribonucleico
ADP:	5'adenosina difosfato
AMPc hexano-agarosa:	8-(6-aminohexyl-amino)-AMPc-agarosa
AMPc=AMP ciclico:	3'-5' Adenosina monofosfato ciclico
ARN:	ácido ribonucléico
ATP:	5'Adenosina trifosfato
BSA:	seroalbúmina bovina
C:	subunidad catalitica
Ca <sup>2+</sup> :	calcio
CaM:	calmodulina
CAPP:	2-cloro-10-(3-aminopropil)-fenotiazina clorhidrato
CM-Sephadex:	carboximetil Sephadex:
cpm:	cuentas por minuto
DIF:	factor inductor de diferenciación
D.O.:	densidad óptica
DEAE:	Diethyl-aminoetil
DTT:	ditiotreitól
EDTA:	etilendiamino tetraacetato
EGTA:	etilenglicol-bis ( $\beta$ aminoetil éter) N, N'Tetracético
GMPc=GMP ciclico:	3'-5', guanosina monofosfato ciclico
HIL:	infusión de corazón
hr:	horas
IgG, IgM:	Inmunoglobinas G y M
K=Kd:	kilodalton
Km:	constante de Michaelis de la enzima para el sustrato
LAS:	medio de lacto albúmina y suero

LIT:	infusión de hígado y triptosa
M:	molar
min:	minuto
MIX:	metil-isobutyl-xantina
mM:	milimolar
MOPS:	ácido 3-(N-morfolino)-propano-sulfónico
NAD <sup>+</sup> , NADH:	forma oxidada y reducida de nicotín amida- dinucleótido
ng:	nanogramos
nm:	nanómetro
nM:	nanomolar
nmol:	nanomol
P.S.A.:	persulfato de amonio
PDE:	fosfodiesterasa
PEI:	fosfoetilenimino
PGA:	3-fosfoglicerato
Pi:	ortofosfato libre
PI:	punto isoeléctrico
PK-AMPC:	quinasa de proteínas dependiente de AMPC
PK-GMPC:	quinasa de proteínas dependiente de GMPC
PKII:	quinasa de proteínas II de <i>T. cruzi</i>
pmol:	picomol
PMSF:	fenilmetilsulfonil fluoruro
PPi:	pirofosfato
R:	subunidad regulatoria
RII:	subunidad regulatoria tipo II de la PK AMi de corazón bovino
S <sub>100</sub> :	sobrenadante de 105000 x g
S.A.:	sulfato de amonio
SDS:	dodecilsulfato sódico
SKS:	solución de sacarosa y KCl
TAU:	orina artificial de triatómido
TCA:	ácido tricloroacético

TEMED: N,N,N',N'Tetrametiletildiamina  
TRIS: 2 amino-2(hidroximetil)-1,3 propanodiol  
Tul 2: cepa Tulahuén  
V<sub>máx</sub>=V<sub>m</sub>: velocidad máxima de hidrólisis del sustrato  
por la enzima  
  
µg: microgramos  
µl: microlitros  
µmol: micromol