

Tesis de Posgrado

Propiedades de una proteínasa de Trypanosoma Cruzi

Bontempi, Esteban José

1990

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bontempi, Esteban José. (1990). Propiedades de una proteínasa de Trypanosoma Cruzi. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2309_Bontempi.pdf

Cita tipo Chicago:

Bontempi, Esteban José. "Propiedades de una proteínasa de Trypanosoma Cruzi". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2309_Bontempi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**PROPIEDADES DE UNA PROTEINASA
DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

Esteban José Bontempi

Director de Tesis
Dr. Juan José Cazzulo

Lugar de Trabajo
**Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la
Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chaben"**

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas

2309
Ej 2

1990

A mis padres

Jorge Luis Bontempi

María Trupía de Bontempi

Agradecimientos.

Al Dr. Juan José Cazzulo, que no sólo me brindó su extenso caudal científico y su ejemplo de capacidad docente, sino también su aliento.

A la Dra. Berta Franke de Cazzulo, eficaz colaboradora en los trabajos de su esposo y en la formación de nuevos investigadores.

A la Dra. Elsa Leonor Segura, directora del Instituto "Dr. Mario Fatala Chaben", sin cuya comprensión y confianza no me podría haber iniciado en este camino.

Al Dr. Andrés Mariano Ruiz, cuya estimulante influencia científica y humana recibí desde que inicié mis actividades en el Inst. "Dr. Mario Fatala Chaben".

A la Dra. Cristina Wisnivesky- Colli, por su aliento para trabajar en el área de la parasitología.

Al Dr. Carlos E. Del Prado, por la elaboración de las fotos de este trabajo y por su constante interés y consejo.

A mis compañeros del Departamento de Investigación, que compartieron mis éxitos y mis fracasos.

A todo el personal que se desempeña en los demás Departamentos del Inst. "Dr. Mario Fatala Chaben", que con su trabajo conjunto brindan el marco imprescindible para una labor sostenida de investigación.

INTRODUCCION.

Generalidades.

El Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas. El área afectada por esta parasitosis coincide con la distribución de la vinchuca, su vector, en el continente americano. Se considera que es desde el paralelo 40° lat N al 45° lat S (211). En 1989, la Organización Mundial de la Salud calculó que 90 millones de habitantes latinoamericanos viven en zonas endémicas y que 18 millones de ellos estarían infectados con T.cruzi (192.b). En nuestro país se calcula en 3 millones el número de chagásicos (10% de la población) (126). En el ciclo domiciliario (vivienda humana y peridomicilio) los triatomíneos domiciliarios transmiten el parásito entre el hombre y los animales domésticos. En Argentina, el Triatoma infestans (vinchuca) es el responsable más frecuente (1). Sistemáticamente el T.infestans pertenece al Orden Hemiptera, Familia Reduviidae, Subfamilia Triatominae (Klug). Todos los estadios ninfales de ambos sexos son hematófagos, y sólo con fuentes sanguíneas de alimentación se cumplen los pasos de la metamorfosis (212).

Sistemática del parásito.

La ubicación sistemática del T.cruzi (104) es:

TIPO: Protozoa (Goldfuss, 1818).

SUBTIPO: Sarcocystidophora (Honigberg y Balamuth, 1963).

SUPERCLASE: Mastigophora (Dresing, 1866).

CLASE: Zoomastigophorea (Calkins, 1909).

ORDEN: Kinetoplastida (Honigberg, 1963).

SUBORDEN: Trypanosomatina (Kent, 1880).

FAMILIA: Trypanosomatidae (Doflein, 1901).

GENERO: Trypanosoma (Gruby, 1843).

SUBGENERO: Schizotrypanum (Chagas, 1909).

ESPECIE: cruzi (Chagas, 1909).

Hoare (104) divide al género en dos secciones: Salivaria y Estercoraria. La primera agrupa a organismos patógenos, transmitidos por inoculación, que se desarrollan en la estación anterior del insecto vector (generalmente la mosca tsé-tsé) y con estadio trypomastigote en el mamífero. Algunas de las especies son el T.brucei rhodesiense y T.b.gambiense (enfermedad del sueño en el hombre), T.b.brucei, congolense y vivax (nagana y otras enfermedades en el ganado). La segunda sección comprende organismos no patógenos (con la excepción del T.cruzi), transmitidos por contaminación, con desarrollo en el intestino posterior del vector, y con formas amastigotes y trypomastigotes en mamíferos. En general se trabaja con "cepas" del parásito, pero debería hablarse de aislamientos. Las cepas presentan variaciones a través del tiempo, por ejemplo: disminución

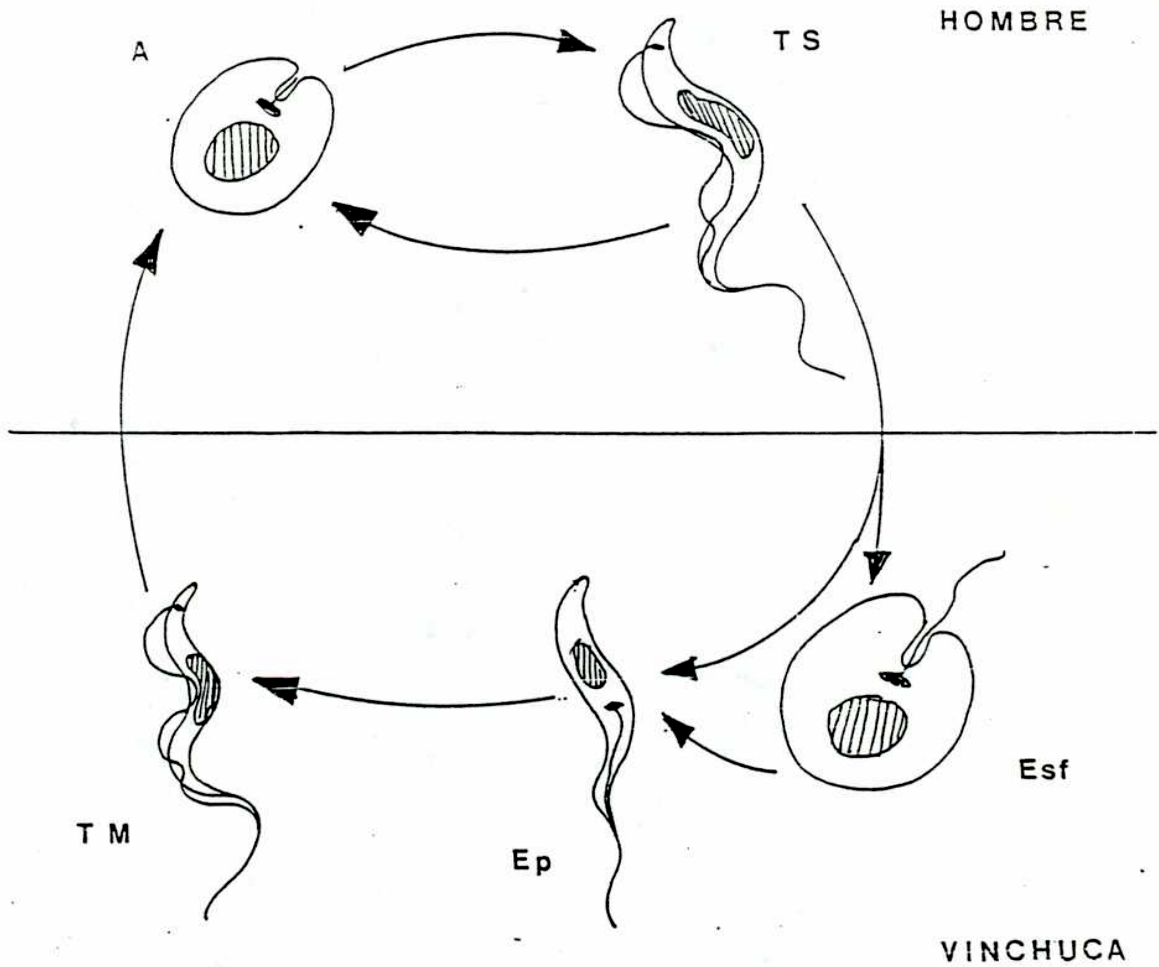
de la capacidad infectante de cepas mantenidas en medio de cultivo (103), variaciones del ciclo intracelular (122), de patrones isoenzimáticos (158), tropismo tisular (185), etc. Para explicar estos cambios se postuló que T.cruzi está compuesto en la naturaleza por poblaciones heterogéneas de organismos. Las condiciones utilizadas en el laboratorio para mantener esas poblaciones ejercerían presión selectiva sobre sub-grupos. En consecuencia, la composición de la "cepa" cambiaría a través del tiempo (114). Engel (76) descartó que estas variaciones puedan deberse a mutación en el medio de mantenimiento. Trabajando con 19 clones (poblaciones genéticamente homogéneas, derivadas de un individuo por división asexual) durante 2 años, no detectó variaciones en sus parámetros biológicos.

Ciclo de vida.

T.cruzi es un parásito digenético, o sea que su ciclo de vida comprende dos huéspedes (Fig.1). Uno es un mamífero y el otro un insecto hematófago que es el huésped intermediario o vector. El parásito presenta varias formas diferentes en su ciclo de vida:

Amastigote (forma intracelular en mamífero): redondeado, división binaria. Presenta un flagelo pequeño (1 μ m de largo), lo que ha originado que algunos autores prefieran llamarlo esferomastigote (37,130).

Figura 1- Ciclo de vida del Trypanosoma cruzi.



ESF: esferomastigote

EP: epimastigote

TM: trypomastigote metacíclico

A: amastigote

TS: trypomastigote sanguíneo

Esferomastigote (intestino del vector): forma semejante al amastigote, pero extracelular, que provendría de los trypomastigotes ingeridos, y se diferenciaría a epimastigote.

Epimastigote (intestino del vector): alargado, flagelo libre, división binaria, kinetoplasto situado anteriormente con respecto al núcleo.

Trypomastigote [ampolla rectal del vector (trypomastigote metacíclico) y en sangre del mamífero (trypomastigote sanguíneo)]: alargado, más delgado y móvil que el epimastigote, membrana ondulante, flagelo libre anterior, kinetoplasto posterior al núcleo, incapaz de dividirse.

Transmisión.

La transmisión natural sigue en general un mismo patrón. El insecto hematófago infectado pica al mamífero para alimentarse y deja en la piel o en las mucosas sus deyecciones. El parásito atraviesa la epidermis por alguna solución de continuidad e invade las células. Los mamíferos son susceptibles a T.cruzi, a diferencia de las aves y animales de sangre fría que son refractarios a la infección. Dentro de las células se diferencia a amastigote y comienza a duplicarse.

Esto se repite por varias generaciones (dependiendo el número de generaciones del clon) y luego se diferencia a

trypomastigote, que por ruptura de la célula pasa al torrente sanguíneo; ésta es la forma que es tomada por la vinchuca cuando pica. Desde la sangre puede invadir células de distintas vísceras. Preferentemente afecta corazón, sistema nervioso, músculos, sistema reticuloendotelial y aparato digestivo; observándose que distintos aislamientos muestran diferentes preferencias (tropismo).

En el tubo digestivo de la vinchuca el trypomastigote se diferencia (esferomastigote-epimastigote). Como epimastigote se divide en el intestino medio. A nivel de la ampolla rectal se diferencia a trypomastigote metacíclico. Tanto las formas reproductivas como las formas infectantes se adhieren por el flagelo al epitelio de la glándula rectal a la salida de los tubos de Malpighi. Al picar la vinchuca defeca, y se reinicia el ciclo.

Además de la transmisión natural se ha demostrado transmisión congénita [alcanza 2-3 % de hijos de madres chagásicas (164)] y transmisión por transfusión de sangre (143). A esto hay que sumar los casos de infección accidental en laboratorio.

Ultraestructura.

El T.cruzi mide entre 5 y 25 μm de largo y 3 a 5 μm de diámetro, según el estadio. Vamos a ver en detalle cada uno de sus componentes a nivel ultraestructural.

Membrana plasmática: de 8 a 10 nm de espesor. Estructura típica bilaminar, con microtúbulos subyacentes que corren longitudinalmente, unidos entre sí por puentes laterales finos, y que sirven para mantener la forma del parásito. El único marcador enzimático adecuado encontrado hasta el presente es la adenilato ciclase (85). Exteriormente a la membrana se observa una cobertura superficial teñible con rojo de rutenio, de un espesor de 5 (epimastigote) o 15 nm (trypomastigote) (142).

Núcleo típico eucariótico, con una membrana bicapa, con poros, con la cromatina dispuesta en forma periférica, con nucleolo. Membrana nuclear externa continua con retículo endoplásmico granular. La división celular mitótica fue estudiada recientemente por Solari (173), quien concluyó que T.cruzi tendría 10 unidades cromosómicas. Estudios más recientes, utilizando la técnica de electroforesis de pulso variable, indican, sin embargo, que el número de cromosomas podría ser considerablemente mayor (78,90). Uno de estos grupos de investigación (78), pero no el otro, fue capaz de detectar "minicromosomas", aunque en número muy inferior al presente en T.b.brucei. El DNA nuclear es lineal (155). El tamaño genómico sería de $2,5 \times 10^8$ pares de nucleótidos. La mayoría de los genes estarían representados con una baja frecuencia (30-40 copias por célula) (115). El DNA nuclear está asociado con proteínas básicas del tipo de las

histonas; la histona H1 se supuso ausente (159), pero estudios más recientes indican su presencia (190).

Citoplasma con muchos ribosomas. Tanowitz aisló ribosomas y sus subunidades de epimastigotes de la cepa Tulahuén (186). Sus coeficientes de sedimentación (46 S y 35 S) fueron significativamente diferentes de los de las células de mamíferos. Lanar (115) extrajo el RNA polisomal de epimastigotes y calculó que habría 12.000 RNAm diferentes. Cerca de 9.000 de ellos estarían poliadenilados.

El flagelo sale de un cuerpo basal que se halla en el fondo de una invaginación con forma de frasco (bolsillo flagelar). Fue observado un citostoma en amastigotes de tejido y epimastigotes de cultivo (131,162). Allí se realizaría la pinocitosis de coloides. Hay un segundo cuerpo basal cerca del primero, ambos con la clásica estructura centriolar. El flagelo está recubierto por una vaina flagelar que es una extensión tubular de la membrana celular. El flagelo posee la clásica estructura 9+2 (9 pares de microtúbulos periféricos y 1 central). Paralela a estos microtúbulos presentan una estructura paracristalina (eje paraxial).

En trypomastigotes el flagelo se halla unido al cuerpo del parásito por una fila de desmosomas. El estiramiento de la membrana plasmática por el movimiento flagelar le confiere el aspecto de una membrana ondulante.

El kinetoplasto está cercano a los cuerpos basales del

flagelo. Es un cuerpo de forma discoide, que en realidad constituye una expansión capsular de la mitocondria. Contiene DNA (que comprende aproximadamente un 20 % del total), y está organizado como maxicírculos y minicírculos. Estos se agrupan en hileras superpuestas, presentando un doble disco los epimastigotes (37,69) y tres o cuatro discos los trypomastigotes (37). Los maxicírculos codifican algunas proteínas mitocondriales, como el apocitocromo b y ciertas subunidades de la citocromo oxidasa y de la ATPasa. La mitocondria es única, y presenta una forma ramificada. Tiene crestas en su membrana interna.

Glicosomas: son organelas que contienen la mayoría de las enzimas de la glucólisis, aunque también contienen algunas enzimas pertenecientes a otras vías metabólicas (139).

Peroxisomas: cuerpos electrónicamente densos, con reacción positiva a la peroxidasa (71).

El Golgi se halla cerca del bolsillo flagelar. Su faz proximal recibe aportes del retículo endoplásmico granular. Su faz distal está rodeada de vesículas y cuerpos multivesiculares.

Reservosomas: vesículas que contienen proteínas endocitadas por el parásito y que pueden presentar inclusiones lipídicas (175,39,172).

Lisosomas: se vio actividad de fosfatasa ácida en bolsillo flagelar y en citoplasma cercano (116,178). Meirelles y De

Souza, por tinción citoquímica y observación al microscopio electrónico, sólo detectaron actividad de fosfatasa ácida en lisosomas cercanos al bolsillo flagelar (129).

Metabolismo de hidratos de carbono.

T.cruzi no almacena polisacáridos (38). Gorin (94) detectó en epimastigotes de la cepa Y un galactomanano y un D-glucano. El nivel de glucosidasas fue bajo, exceptuando la alfa-manosidasa (13).

Biosíntesis de glicoconjugados: Parodí y Quesada-Allue (141) detectaron en epimastigotes de la cepa Tulahuén un lípido (derivado de dolicol) unido a un azúcar (9 unidades de manosa con 2 unidades de N-acetil-D-glucosamina). Este último compuesto sólo puede glucosilarse posteriormente a su transferencia a la proteína (142). Este mecanismo es similar al encontrado en Crithidia fasciculata, un tripanosomátido no patógeno (140) y difiere del de otras células eucarióticas, desde levaduras hasta mamíferos, en los cuales el oligosacárido que se transfiere contiene 3 glucosas, que se eliminan durante el procesado. Recientemente Parodí y sus colaboradores han descrito diferencias en el número de manosas que contiene el oligosacárido que se transfiere en distintas formas del T.cruzi, así como en los que se transfieren en diferentes géneros de Trypanosomatidae. Además, han comprobado que la

falta de glucosilación del oligosacárido transferido se debe a la falta de dolicol-P-glucosa, que es el dador obligado en esa etapa biosintética, y que la velocidad de transferencia del oligosacárido glucosilado o sin glucosilar es idéntica para T.cruzi, en tanto que los mamíferos transfieren con eficiencia mucho mayor el oligosacárido triglucosilado (142).

Catabolismo: el parásito es capaz de catabolizar glucosa y otros azúcares (64,119). El transporte de azúcares al interior de la célula es activo, al menos con galactosa (200,201). El T.cruzi degrada glucosa en anaerobiosis y aerobiosis. En ambos casos produce dióxido de carbono, L-alanina, acetato y succinato, realizando una verdadera "fermentación aeróbica" (160,36,77,56). La producción de lactato es escasa o nula, a pesar de la existencia de una enzima con actividad de lactato dehidrogenasa (89). La mayor parte de la glucosa es metabolizada por la vía glucolítica, siendo además operativa la vía de las pentosas. Casi la totalidad de las enzimas glucolíticas están ubicadas en un organoide, el glicosoma (187), como en el caso de T.brucei (138). En el control de este camino metabólico no intervienen la hexoquinasa ni la fosfofructoquinasa (la primera no es modulada por glucosa-6-P y la segunda es inhibida por una concentración de ATP mayor a la requerida por la enzima de mamíferos). En este proceso de

fermentación aeróbica hay fijación de dióxido de carbono, realizada por la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (49), localizada en los glicosomas (46). La enzima málica presenta dos isoenzimas con distintas propiedades cinéticas y regulatorias (45) y distinta ubicación (53,46). Su función sería decarboxilar los ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos para su catabolismo. La malato dehidrogenasa también presenta dos formas diferentes, una glicosomal y una mitocondrial (47). El malato sería el metabolito fundamental para el transporte de carbono proveniente de la glucosa y de equivalentes de reducción del glicosoma a la mitocondria (47). El ciclo de Krebs es funcional, como se demostró por marcación isotópica (30,74,75). Se ha demostrado la presencia de todas las enzimas del ciclo, menos la alfa-oxoglutarato dehidrogenasa (96). La citrato sintasa presenta peso molecular y propiedades cinéticas y regulatorias similares a los de la enzima de mamíferos (108).

Existe una cadena respiratoria para reoxidar coenzimas reducidas, compuesta por los citocromos b, c558, a+a3 y o. Los dos últimos serían oxidasas terminales alternativas. Las partículas mitocondriales pueden oxidar succinato, alfa-glicerofosfato y NADH (181). En cuanto a la fosforilación asociada a la cadena, había evidencias indirectas de su existencia (180), hasta que recientemente

se la pudo demostrar con partículas submitocondriales aisladas (4). Se detectó una ATPasa mitocondrial sensible a oligomicina, que sería responsable de la fosforilación oxidativa, actuando como ATP sintetasa (163,86). La enzima fue solubilizada (87) y purificada (50).

El metabolismo de peróxido de hidrógeno y peróxidos es deficiente. El parásito no tiene catalasa. La peroxidasa está localizada en microcuerpos (72). El sistema glutatión peroxidasa- glutatión reductasa, vía alternativa para la utilización metabólica del H₂O₂, estaría ausente (34). Esto explicaría la toxicidad de la 0-naftoquinona y el Nifurtimox para T.cruzi, pues el metabolismo de estas sustancias produciría anión superóxido y luego H₂O₂, por acción de la superóxido dismutasa (73,33,75). Sin embargo, el reciente descubrimiento en Trypanosomátidos, entre ellos T.cruzi, de la tripanotiona y enzimas relacionadas con su metabolismo, como la tripanotiona reductasa, indican que esta área del metabolismo es mucho más compleja. En cuanto a los sistemas de detoxificación, se encontró que el sistema monooxigenasa de la fracción microsomal tiene el citocromo P 450 (5,6). Fue hallado también el sistema de la epóxido dehidrasa y la glutatión- S-transferasa (208).

Metabolismo de lípidos.

Los lípidos constituyen el 20% del peso seco de los

epimastigotes de cultivo (195). En cantidad, el colesterol es el principal esteroide, seguido por el ergosterol. Bronia y col. (42) detectaron glicéridos, esteroides, glucolípidos y fosfolípidos. Los ácidos grasos están generalmente no saturados. Posiblemente los triglicéridos sean una reserva energética y, por ende, un responsable del alto metabolismo endógeno (157,97). El parásito puede consumir ácidos grasos exógenos (206,96). En cuanto a la síntesis, Aeberhard y col. (3) demostraron que los epimastigotes de la cepa Tulahuén pueden sintetizar ácidos grasos y lípidos complejos partiendo de acetato-1-¹⁴C.

Metabolismo de los ácidos nucleicos.

T.cruzi no realiza la síntesis del anillo de la purina. Por ello debe tomar del medio las bases libres y los nucleósidos (96,29). En cuanto a las pirimidinas, las puede sintetizar (cuantitativamente lo más importante in vivo) o tomar del medio (96). Las enzimas del camino biosintético fueron detectadas por Hammond y Gutteridge (98). La biosíntesis de ácidos nucleicos fue poco estudiada. Sims y Gutteridge (171) demostraron la presencia de DNA polimerasa y de tres RNA polimerasas.

Metabolismo de proteínas.

El 43 a 53 % del peso del parásito es proteína (196). El

5,2% del nitrógeno proteico está constituido por aminoácidos libres (204). El parásito necesita aminoácidos en el medio para crecer (14), o proteínas de las cuales pueda obtenerlos (15). Von Brand demostró que puede consumirlos, produciendo NH_3 que es liberado como tal al medio. El hecho de ser amoniotélico estricto se debe a su carencia de las enzimas del ciclo de la urea (44). La síntesis de aminoácidos a partir de glucosa fue demostrada en el caso de alanina, aspartato y glutamato (170). Partiendo de serina el parásito puede interconvertirla a alanina, aspartato, glutamato, glicina, cisteína y treonina (100).

Transporte de aminoácidos desde el medio: Hampton demostró la presencia de sitios para lisina y arginina (99) y la inhibición del transporte por otros aminoácidos diaminados. Fernandes y col. informaron los requerimientos para la síntesis de proteínas (83) y demostraron inhibición parcial por mitomicina C (84). Mancilla (123,124) demostró la inhibición de la incorporación de leucina por actinomicina D y puromicina. Roitman y Gutteridge (157) demostraron que agregando treonina marcada al medio se pueden recuperar ácidos grasos marcados, de modo que podría estar operando una vía que conduce de treonina a acetato y a glicina (62), similar a la propuesta para T.brucei (63).

El parásito contiene las poliaminas putrescina y espermidina, que son probablemente obtenidas a partir de la

ornitina (Camargo E.P., citado por 16).

La síntesis de porfirinas, partiendo de glicina y succinil-Co A, no es completa, por carencia de alguna de las enzimas de la vía (161). Esto origina el requerimiento de hemina en el medio de cultivo.

Catabolismo de aminoácidos: Hampton (100), partiendo de serina marcada radiactivamente, encontró incorporación de marca en todas las fracciones metabólicas, menos en ácidos nucleicos. Mancilla (124) observó que marcando la leucina, la mayoría de la radiactividad aparecía en ácidos orgánicos, y algo en lípidos y ácidos nucleicos. Como al agregar glucosa aumentó el catabolismo de la leucina y disminuyó la producción de dióxido de carbono, sugirió que el catabolismo de la leucina es similar al de mamíferos, entrando los productos finales, acetil-Co A y acetoacetato, al ciclo de Krebs. Sylvester y Krassner (184), aplicando la misma metodología, comunicaron que la prolina, aspartato y glutamato seguirían otro camino metabólico. Se basaron en que el consumo de oxígeno agregando prolina y glucosa casi duplicaba al obtenido con cualquiera de ellos sólo. Los mismos autores incubaron los parásitos (epimastigotes de cultivo de la cepa Costa Rica) con prolina, arginina, glutamato y aspartato marcados. Concluyeron que todas las vías catabólicas estudiadas desembocan en el ciclo de Krebs. Algunas de ellas no fueron reversibles, dado que se recuperó

marca en aspartato, cisteína y lisina, pero no en glutamato, prolina y alanina (en este último caso, sí se marcó partiendo de glucosa radiactiva).

Transaminasas: Son enzimas que separan los grupos alfa-amino de un aminoácido para transferirlo a un alfa-oxoácido. El resultado final es la formación del alfa-oxoácido correspondiente al aminoácido dador y del alfa-aminoácido correspondiente al cetoácido receptor. En epimastigotes de T.cruzi se detectaron reacciones de transaminasa (24,210). Zeledón encontró que numerosos aminoácidos podían ser donadores del grupo amino, para convertir el alfa-cetoglutarato a L-glutamato, o el piruvato a L-alanina. Se ha demostrado la presencia de aspartato aminotransferasa (51) y de leucina aminotransferasa (133) en epimastigotes de la cepa Tulahuén, y de alanina aminotransferasa en epimastigotes de la cepa Y (23).

Desaminación: Los grupos amino recogidos de los aminoácidos por acción de las transaminasas aparecen en forma de grupos alfa-amino del glutamato. Esta molécula puede experimentar una desaminación oxidativa, catalizada por la glutamato deshidrogenasa. Los grupos NH_4^+ liberados se descargan al medio, alcalinizándolo. En varias cepas del parásito se detectaron dos glutamato deshidrogenasas distintas (52,198,193,43). La diferencia entre ellas es el aceptor de electrones requerido, NAD o NADP. No se conoce bien el

papel que desempeñan ambas enzimas en el metabolismo del parásito; si bien Carneiro y Caldas (48) han propuesto que la enzima NADP dependiente sería catabólica, experimentos más recientes (55) indican que la actividad de la enzima NAD dependiente aumenta considerablemente después de agotarse la glucosa en el medio de cultivo, lo que sugiere que esta enzima sería la principal involucrada en la degradación de aminoácidos. La glutamato dehidrogenasa NADP dependiente ha sido purificada hasta homogeneidad proteica, y se ha determinado tanto su composición en aminoácidos, como la secuencia de 33 aminoácidos del extremo N terminal, que presenta 65% de homología con el de la enzima similar de Escherichia coli (57).

Proteinasas: El interés de su conocimiento radica en que: 1) la degradación proteica intracelular podría ser, junto con el consumo de lípidos, la responsable de la alta tasa de respiración endógena (96); 2) participan en la degradación intracelular de proteínas del medio, así como en el recambio ("turnover") de las proteínas del propio parásito; 3) estas enzimas pueden estar involucradas en la penetración del parásito a la célula de mamífero, sea por ataque proteolítico de la membrana del huésped (31), sea por alteración de moléculas de la propia membrana del parásito (147,11), que harían posible la adhesión parásito- huésped. En este contexto, se podría suponer su presencia en membrana

o en vesículas cercanas a la misma. Si estuviera en membrana, como la principal proteína superficial de promastigotes de Leishmania, una zinc metaloproteínasa (80), podría cumplir también alguna de las funciones que se postularon para ella (degradación extracelular de proteínas del medio, protección del parásito frente a ataque enzimático); 4) podrían participar en mecanismos de escape a la respuesta inmune, sea por internalización y posterior digestión de IgG unida a su membrana (2,174,188), sea por el fenómeno conocido como Fabulación, consistente en la síntesis por trypomastigotes de la cepa CL de proteasas que hidrolizarían la molécula de inmunoglobulina unida a la superficie del parásito (112). Los productos de clivaje (Fab) no producirían aglutinación, no desencadenarían la lisis por complemento ni la fagocitosis por macrófagos, y prevendrían la adhesión de moléculas íntegras de inmunoglobulina (*); 5) durante procesos de aislamiento de

(*)La presencia de proteasas específicas para moléculas de inmunoglobulina ha sido descrita en el caso de IgA. La habilidad para producir proteasa anti-IgA1 está presente en bacterias patógenas (Neisseria gonorrhoeae y meningitidis, Haemophilus influenzae y Streptococcus pneumoniae (135,41), pero no en especies no patogénicas de Neisseria o Haemophilus, o en bacterias oportunistas tales como la mayoría de los aislados clínicos de Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus o Pseudomonas aeruginosa. En un caso se identificó una proteasa extracelular de Clostridium sp que hidrolizó IgA1 y produjo fragmentos Fc y Fab (88), reteniendo este último completa capacidad de anticuerpo (125). La proteasa anti-IgA sería una metalo-enzima con una variable sensibilidad a EDTA (149) y con especificidad por la IgA1 humana.

proteínas enzimáticas o antigénicas, las proteinasas podrían alterar los productos finales obtenidos. En este contexto, se impone en particular conocer las posibilidades de inhibición de las mismas (191).

Las proteasas se pueden clasificar en dos grupos según la ubicación de los enlaces peptídicos hidrolizados: exopeptidasas (cuya acción es dirigida al extremo amino o carboxílico del péptido) y endopeptidasas (enzimas que clivan uniones peptídicas internas de péptidos y que usualmente no pueden ubicar los extremos cargados del sustrato en el sitio activo). Según las características de su sitio activo se puede clasificar a las endopeptidasas (o proteinasas) en cuatro grupos principales: serín, cisteín, aspartil y metalo proteinasas (20).

SERIN PROTEINASAS. Comprende aquellas enzimas que tienen un residuo de serina en el sitio activo y un mecanismo catalítico que involucra la unión covalente del sustrato al grupo OH de ese residuo. El inhibidor específico es el diisopropil fluorofosfato (DIFP), aunque también son sensibles al PMSF, TLCK, TPCK, y a los péptidos de origen microbiano leupeptina, antipaina y quimostatina. Las enzimas "tipo tripsina" son aquéllas que hidrolizan uniones peptídicas donde el grupo carbonilo es aportado por lisina o arginina, mientras que las del "tipo quimotripsina" requieren un aminoácido aromático en esa posición.

CISTEIN PROTEINASAS (o tiol proteinasas).

Poseen un residuo de cisteína en el sitio activo, cuyo grupo SH se une covalentemente al sustrato. E-64 [L-trans-epoxisuccinil- leucilamido (4-guanidino) butano] es el inhibidor más específico, seguido por los organomercuriales como el pCMB, los agentes alquilantes iodoacetamida (IAM), iodoacetato (IAA) y N-etilmaleimida (NEM), y por leupeptina, antipaina y quimostatina. E-64 reacciona con el grupo sulfhidrilo del sitio activo, con el cual forma un tioéster. Los demás reactivos de tiol pueden reaccionar con otros grupos sulfhidrilos, afectando de modo indirecto e inespecífico la actividad enzimática.

La papaína y las catepsinas son integrantes típicos de este grupo.

Propiedades específicas han permitido separar dos nuevos subgrupos: las calpainas y las proteinasas dependientes de ATP.

Calpainas (CALcium-dependent paPAIN-like proteinases): requieren Ca para su actividad. Se encuentran en la mayoría de los tejidos como heterodímeros de 110 kD compuestos de subunidades catalíticas (80 kD) y subunidades de función desconocida (30 kD). Se observaron dos formas (I y II), distinguibles por su diferente requerimiento de concentración de Ca. Presentan alta especificidad de sustrato, por lo que se las ha relacionado con ciertas

respuestas fisiológicas.

Proteinasas dependientes de ATP: presentan dos grupos con distinta ubicación subcelular. Uno se encuentra en citosol (cisteín proteinasas) y el otro en mitocondrias (serín proteinasas). Las características comunes son: enzimas de alto peso molecular, oligoméricas, con pH óptimo alcalino. Las diferencias radican tanto en el requerimiento de Mg como en la necesidad o no de hidrolizar el ATP para expresar completa actividad.

ASPARTIL PROTEINASAS (o proteinasas ácidas).

Tienen dos residuos de ácido aspártico en el sitio activo y se cree que el mecanismo de catálisis es de tipo ácido-base. Pepstatina A es el inhibidor específico de sitio activo. En este grupo se encuentran la pepsina, la quimosina y la renina.

METALOPROTEINASAS.

Presentan un metal en el sitio activo, generalmente zinc. No se conoce exactamente la función de estos iones, pero se ha propuesto que aumentarían la nucleofilidad del agua y polarizarían la unión peptídica a hidrolizar, previo al ataque nucleofílico.

Los agentes quelantes (1,10-fenantrolina, EDTA) ejercen sobre ellas una inhibición específica.

Se pueden distinguir de las proteinasas activadas por

metales por el valor de la constante de asociación para el complejo metal- enzima y por su respuesta a una serie de inhibidores.

La termolisina es una enzima típica de este grupo.

Reuniendo características comunes a varios de los grupos mencionados se halla el grupo de las proteinasas Multicatalíticas.

Está compuesto por enzimas citosólicas de pH óptimo alcalino, sin requerimiento de ATP, de alto peso molecular (600-700 kD), con pequeñas subunidades (21-34 kD). Se caracteriza por presentar varios sitios activos con distinta especificidad de sustrato y sensibilidad a inhibidores. Aún no se ha logrado asignar cada actividad catalítica a cada uno de los componentes del complejo.

El primer informe sobre existencia de proteasas en T.cruzi fue el de Gonçalves (93).

Itow y Camargo (106) analizaron varias enzimas de epimastigotes de la cepa Y. Los sustratos hidrolizados y las propiedades de las enzimas fueron: a) azocaseína (hidrolizada por amplia gama de proteasas): la actividad fue soluble (la mayoría en sobrenadante de 120.000 xg), temperatura óptima 60° C, pH óptimo menor de 5, no inhibible por PMSF; b) aminoacil- beta- naftilamida (sustrato para aminopeptidasas): temperatura óptima de 40° C, pH de 7-8;

c) BAPA y BANA (benzoil- arginil- naftilamida) (sustrato para enzimas parecidas a la tripsina): temperatura óptima de 37° C, pH 8; d) N-carbobenzoxi- L-tirosina- p-nitrofenil éster (sustrato para enzimas parecidas a la quimotripsina): 37°C y pH 7. Esta actividad es particulada.

Bongertz y Hungerer (31) aislaron la enzima que hidrolizaba BAPA de la cepa D1. Su peso molecular fue de 200.000. Otros sustratos que pudo hidrolizar fueron: hemoglobina, BAEE (alfa-N- benzoil-L- arginin etiléster) (actividad de esterasa) y BAA (alfa-N- benzoil-L- arginin amida) (actividad de transamidasa). Un 2% de la molécula es carbohidrato (glucosa, manosa, galactosa, xilosa, glucosamina). EDTA no afectó la actividad. Se obtuvo inhibición con inhibidores de grupos sulfhidrilos. Por oxidación pierde 60% de la actividad, que recupera al ser reducida. Esta enzima está también en trypomastigotes (cepa Brasil).

Avila y col.(13) encontraron en la cepa Y cinco proteinasas. La nomenclatura que propusieron y sus valores de pH óptimo fueron: peptidasa I [4,8], pept. II [6,8], pept. III [6,6], catepsina A [5,2] y cat. D [3,8]. La primera fue activada por cisteína.

Rangel y col. (152) purificaron a partir de epimastigotes de la cepa Y una enzima capaz de hidrolizar caseína a pH 6 y hemoglobina a pH 3. Menos del 2% del peso de la molécula

fue carbohidrato. Su peso molecular fue de 60.000. Fue activable por EDTA y reactivos sulfhidrúlicos, e inhibible por compuestos mercuriales y otros inhibidores de grupos SH. Las inhibiciones fueron reversibles por 2-ME. Ni TLCK ni TPCK alteraron la actividad. Esta enzima fue detectada por inmunofluorescencia y reacción inmunoenzimática (153) en trypomastigotes y amastigotes de varias cepas. Por microscopía electrónica se constató que estaba ubicada en la superficie de los amastigotes.

Torruella y col. (191) estudiaron actividades proteolíticas en 6 cepas de T.cruzi: Tul 0, Tul 0R, Tul 2, CA-1, Sonya e Y. Los pH óptimos con los distintos sustratos usados (caseína, azocaseína, BAPA) fueron respectivamente: 5, 7 y 7,5-8. Detectaron distintos niveles de actividad con azocaseína y caseína en epimastigotes de las 6 cepas estudiadas.

Cazzulo y Franke de Cazzulo (54) estudiaron la actividad proteolítica de la cepa Tul 2 sobre sustrato endógeno (sobrenadantes de parásitos rotos, centrifugados a 1.000 o 105.000 xg). Encontraron una temperatura "óptima" de 65° C a pH 5 y 7,2. En el rango de pH 3-4 se obtuvo la máxima actividad, con un pico menor en pH 6-7 para el sobrenadante de 1.000 xg, correspondiente a una proteinasa particulada. De los inhibidores probados, el TLCK fue el más efectivo, seguido por el PMSF, aunque este último no afectó el pequeño

pico del sobrenadante de 1.000 xg. Los autores concluyeron que la actividad encontrada era atribuible a la enzima previamente estudiada por Itow y Camargo (106) y Torruella y col. (191).

Recover y Piras (154) evidenciaron actividad proteásica de trypomastigotes y epimastigotes enteros, que también se detectó en el medio de incubación de los parásitos. La actividad es estimulada por DTT y EDTA e inhibida por iones metálicos, pCMB, N-etil-maleimida, quimostatina, leupeptina, aprotinina y antipaina, sugiriendo que la enzima es del tipo de las cisteín proteinasas. La enzima puede usar como sustrato albúmina, lactalbúmina, ovoalbúmina, caseína y hemoglobina, siendo el pH óptimo cercano a 7 y presentando otro pico de actividad a pH menor. Los autores sugieren que esta proteinasa (o proteinasas) podría estar involucrada en la adhesión y penetración del parásito.

Objetivos del presente trabajo.

El objetivo del presente trabajo fue purificar la proteinasa de epimastigotes de T.cruzi que usa azocaseína como sustrato y caracterizarla, poniendo énfasis en sus valores de pH óptimo con distintos sustratos, el efecto de diferentes inhibidores y su localización intracelular.

MATERIALES Y METODOS.

Cultivo del T.cruzi.

El aislado Tulahuén se obtuvo de un triatomíneo de Chile en 1945 (148). En el Instituto "Dr. Mario Fatala Chaben" se lo mantuvo en ratón hasta 1979, cuando se lo transfirió a un medio de cultivo bifásico (168,89). La fase líquida contuvo 2,8 g % p/v de infusión cerebro- corazón (Difco) y 1 % p/v de glucosa. La fase sólida contuvo 1,5 % de agar, 1,3 % de agar nutritivo (Difco) y 0,8 % de cloruro de sodio. A los erlenmeyers de cultivo se les agregó 30 ml de fase sólida y se autoclavaron a 1 atmósfera durante 10 min. Luego se mantuvieron 24 hs a 37° C , como prueba de esterilidad. Se les agregó 20 ml de fase líquida con el inóculo de parásitos (0,4-4 x 10E6 parásitos/ ml) y se los dejó crecer a 30° C sin agitación. Se cosecharon en la fase logarítmica tardía de crecimiento (generalmente después de 7 días) centrifugando a 1.000 xg, 15 min, a 4° C.

El cultivo mostró típicamente 99 % de epimastigotes y 1 % de trypomastigotes. Se lavaron las células tres veces con sacarosa 0,25 M- cloruro de potasio 5 mM, por centrifugación (9.000 xg, 15 min, rotor HB 4, centrifuga Sorvall RC 5B) y se suspendieron en la misma solución (10 ml/ g de células, peso húmedo).

Purificación de la enzima.

La suspensión de células (aproximadamente 10^{10} parásitos/g, peso húmedo) fue rota por presión-decompresión a 6° C en un fraccionador de células Sorvall-Ribi (I. Sorvall Inc., Connecticut, USA) (167). Se le aplicó a la suspensión de parásitos una presión de 340 kg/cm^2 . Luego se los sometió a una brusca decompresión ($1,03 \text{ kg/cm}^2$) en atmósfera de nitrógeno. Se controló la ruptura de la totalidad de los parásitos por observación al microscopio óptico. El homogenato fue centrifugado a 1.000 xg , 15 min, a 4° C. El sobrenadante fue fraccionado con sulfato de amonio sólido, manteniendo un pH constante de 6 por la adición de hidróxido de amonio. La fracción de 0-50 %, obtenida centrifugando a 14.000 xg , 15 min, a 4° C, se disolvió en el mínimo volumen de amortiguador A [Tris-HCl 50 mM pH 7,6 con EDTA 1 mM, KCl 0,2 M y glicerol 20 % (v/v)]. La solución turbia fue clarificada centrifugando a 105.000 xg , 1 hora, a 4° C, con un rotor Spinco L 50. El sobrenadante se sembró en una columna de Sephadex G-200 (70 x 3,3 cm) equilibrada en amortiguador A, con el cual también se eluyó. Las muestras fueron recogidas en un colector automático de fracciones Ultrorac 7.000 de LKB. Se determinó actividad enzimática y proteínas (absorbancia a 280 y 260 nm) en todas las fracciones eluidas de la columna. Las de mejor actividad específica se mezclaron y dializaron toda la noche contra

200 volúmenes de amortiguador B (igual composición y pH que amortiguador A pero sin KCl). El material dializado se sembró en una columna de DEAE- celulosa (15 x 1,6 cm) equilibrada en amortiguador B. La elución se realizó por medio de un gradiente lineal de KCl (0- 0,5 M). El pico de actividad enzimática eluyó con 0,12- 0,15 M KCl, como se determinó por fotometría de llama. Las fracciones de mayor actividad específica se mezclaron y se dializaron toda la noche contra 100 volúmenes de amortiguador C [fosfato de potasio 10 mM pH 7, con EDTA 0,1 mM y glicerol 20 % (v/v)]. Esta muestra se sembró en una columna de hidroxilapatita (1,6 x 1,5 cm) preparada según el método de Tiselius y col. (189). En el lavado se usó el amortiguador C y la elución se logró incrementando a 20 mM la concentración del fosfato de potasio. Las fracciones de mayor actividad específica se usaron directamente o se concentraron poniendo la solución en un tubo de diálisis rodeado de Carbowax sólido.

Cromatografía de afinidad.

Se siguió la técnica descrita por Katzin (109) con algunas modificaciones menores. Se pesó 0,3 g de Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia). Se hinchó el gel en HCl 1mM, 15 min (200 ml/ g gel) (1 g de gel seco produce aprox. 3,5 ml de volumen final de gel). Se lavó con solución de acoplamiento (bicarbonato de sodio 0,1 M pH 8,3 y NaCl 0,5 M) en filtro sinterizado (500 ml). Se

resuspendió en la misma solución (5 ml/ g gel). Se agregó la lectina Concanavalina A (Con A) (10 mg/ g gel) y 0,1 M de alfa-D-metil manósido y 0,1 M de alfa-D-metil glucósido (Sigma). Se dejó acoplar 2 hs a temperatura ambiente con agitación suave. Se lavó la suspensión de Sepharosa Con A con solución de acoplamiento en un filtro sinterizado (40 ml/ g gel). Se transfirió el gel a la solución de bloqueo (NaCl 0,5 M, etanolamina 1 M llevada a pH 8 con HCl) por 4 hs a temp.amb. (10 ml/g gel). Este procedimiento bloquea los grupos activos remanentes. Se removi6 la proteína unida no covalentemente primero con amortiguador de lavado (acetato de sodio 0,1 M pH 4,3 y NaCl 0,5 M) y luego con solución de acoplamiento (pH 8,3). Se hicieron varios ciclos de lavado alternando ambas soluciones. El cambio de pH desorbe el material unido sólo i6nicamente. Se resuspendió la Sepharosa Con A en solución de almacenamiento (NaCl 0,15 M pH 6,3) con el agregado de CaCl₂ 1 mM y MnCl₂ 1 mM. El Ca y el Mn mantienen la estructura tetramérica de la lectina, la cual a su vez le confiere sus propiedades de unión. Se arm6 una columna de 0,9 cm de diámetro por 1,5 cm de altura. Se equilibr6 con 20 ml de amortiguador A (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Lubrol PX (Sigma) 2% v/v) a temp.amb. La ventaja del Lubrol sobre el Nonidet P-40 de la técnica original radica en que el primero absorbe mínimamente a 280 y 260 nm, permitiendo el seguimiento

espectrofotométrico del patrón de elución. Se agregó este detergente también a la muestra, para alcanzar una concentración final del 2%. Durante la siembra de la muestra se mantuvo el flujo a 15 seg/ gota. Desde ese momento se colectó el efluente, a razón de 1 ml/tubo. Al finalizar la siembra se cerró la columna durante 1 hora, para permitir el completamiento de la unión proteína-Con A. La elución del material no unido se realizó con 12 ml de amortiguador A, a un flujo de 7 seg/gota. Se eluyó específicamente con 3 ml de amortiguador A más los azúcares competitivos a una concentración de 0,1 M (alfa-D-metil manósido y alfa-D-metil glucósido). El efluente se colectó a razón de 0,5 ml/tubo. En cada tubo colectado y en la siembra se determinaron la concentración de proteína y la actividad enzimática. Por SDS-PAGE y posterior tinción con Coomassie Brilliant Blue se determinó el perfil proteico de la siembra y de los efluentes de la columna durante la siembra, el lavado y la elución específica.

Determinación de actividad de la enzima.

Durante toda la purificación la enzima fue ensayada con azocaseína (sulfanilamida- azocaseína, Sigma) como sustrato (65). Se preparó una solución 2,5 % en bicarbonato de sodio 1%, y se llevó a 60° C con agitación. Luego se ajustó a pH 8,3. La mezcla de reacción contuvo, en un volumen final de 0,2 ml, 1 mg de azocaseína, 10 μ moles de amortiguador

acetato-ácido acético pH 5 , 2 μ moles de 2-mercapto etanol (2-ME) y enzima, la cual se adicionó en último lugar para iniciar la reacción. La incubación fue de 30 min a 35° C. Se detuvo la reacción agregando 0,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5 % p/v. Se centrifugó 10 min a 3.000 rpm en una centrífuga de mesa. Se extrajeron alícuotas de 0,5 ml de cada muestra y se mezclaron con 0,8 ml de OHNa 1 N, para intensificar el color. Se leyó la absorbancia a 440 nm en un espectrofotómetro Beckman 26. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que produjo un incremento en absorbancia de 1,0 por hora.

Inhibidores y activadores.

Las soluciones se prepararon inmediatamente antes de usar. TPCK y PMSF se disolvieron en etanol 90% v/v [el PMSF en agua se degrada rápidamente (50% en 100 minutos) (150)]; TLCK, p-CMPS, antipaína, quimostatina y hemisulfato de leupeptina (acetil-L-leucil-L-leucil-L-argininal, Sigma) en agua destilada; p-CMB, FMA y DTNB en Tris base 0,25 M y se ajustaron a pH 8 con HCl 1N; E-64 :3 mg se disolvieron en 0,1 ml de dimetil sulfóxido, y se llevó con agua destilada hasta 1 mM (3,66 mg/ 10 ml) (20). Los sueros de ratón, conejo y humano se separaron directamente de la sangre. El suero fetal bovino usado fue el de GEN S.A., Argentina. La actividad enzimática en presencia de los inhibidores se determinó usando azocaseína como sustrato. Las pequeñas

cantidades de estas sustancias adicionadas no alteraron el pH de la mezcla. Los activadores usados fueron: EDTA (Carlo Erba), glutatión reducido (Sigma) y 2-ME (Sigma). Para probar reactivación de la inhibición se mezcló enzima purificada (0,08 ml, 60 µg proteína) con el mismo volumen de amortiguador acetato- acético 0,1 M pH 5. Se adicionó 0,02 ml de cada inhibidor para lograr una concentración final de 1,1 mM. Se preincubó 30 min a 0° C. Se extrajeron alícuotas de 0,02 ml cada una, que se usaron para el ensayo de actividad enzimática. El resto de la mezcla recibió 2 µl de 2-ME 1M (concentración final 20 mM) y se preincubó 30 min a 0° C. Al finalizar este lapso se extrajeron alícuotas y se midió la actividad enzimática de las mismas.

Otros sustratos usados.

Caseína: Previamente a la reacción se calentó el sustrato a 35° C, 5 min. La mezcla de reacción (0,2 ml) contuvo Tris HCl 50 mM pH 7,6 , caseína 1 mg y la enzima. Se incubó 30 min a 35° C. Se agregó 0,5 ml de ácido tricloro acético 3%. Se centrifugó 15 min a 5.000 rpm a temperatura ambiente. A 0,5 ml del sobrenadante de cada tubo se le agregó 1 ml de HONa 1 N y 0,25 ml del reactivo de Folin diluido 1/3. Se dejó desarrollar color durante 20 min a temperatura ambiente, y se leyó la absorbancia a 750 nm. La caseína 1% (Fluka A G, Suiza) se disolvió en amortiguador fosfato pH 7,6 y se calentó 15 min en baño María hirviendo (117).

Albúmina de suero bovino, hemoglobina: Se siguió un protocolo similar al de caseína. La albúmina (Sigma) y la hemoglobina (soluble hemoglobin powder, Code L 53, Oxoid, Inglaterra) se disolvieron en agua destilada.

BAPA: La mezcla de reacción (2,5 ml) contenía Tris HCl 100 mM pH 8, BAPA 0,5 mM y la muestra. Se incubó 30 min a 35° C. Se terminó la reacción agregando 0,5 ml de ácido acético 30% v/v. Se dejó 15 min en hielo. Se centrifugó 10 min a 5.000 rpm. Se leyó la absorbancia del sobrenadante a 410 nm, longitud de onda en la cual absorbe la p-nitroanilina. Se preparó una solución 1,25 mM del sustrato disolviéndolo en un pequeño volumen de dimetil sulfóxido, calentándolo en baño María hirviendo, y llevándolo a volumen final con Tris HCl 50 mM pH 8 (79).

IgG, Fab y Fc humanos: se usó IgG humana donada por el Dr. R.A. Margni (Cátedra de Inmunol. e Inmunoq., Fac. de Farmacia y Bioq., UBA). Para obtener los fragmentos Fab y Fc se digirió la IgG con papaína. A la IgG (15 mg/ml), previamente dializada contra amortiguador fosfato 7,5 mM, NaCl 7,5 mM, se le añadió cisteína (10 mM final), EDTA (2 mM final), y papaína (en una relación enzima:anticuerpo 1:100 p/p). Se incubó 4 hs a 37 °C y se frenó la digestión con N-etilmaleimida (8,33 µg/mg de enzima). Se dializó la muestra contra solución fisiológica. Por inmunoelectroforesis se controló el grado de digestión. El

segundo pico al filtrar la muestra por una columna de Sephadex G-100 consistió en una mezcla de Fab y Fc. Una segunda separación cromatográfica, esta vez por DEAE-celulosa equilibrada con amortiguador fosfato 5 mM pH8, permitió obtener un pico proteico correspondiente al fragmento Fab. Un salto de molaridad (10 mM) desorbió una mezcla de Fab y Fc. Cuando se aplicó amortiguador fosfato 100 mM, se obtuvo el fragmento Fc puro. La identidad de los productos obtenidos se controló por inmunolectroforesis (con anticuerpo anti-humano).

Para el ensayo de digestión de la IgG entera y de ambos fragmentos por la proteinasa se usó la siguiente mezcla de reacción: proteinasa y sustratos (IgG, Fab o Fc) en las concentraciones indicadas en las leyendas de las figuras 11 y 12; 100 mM de amortiguador acetato-ácido acético pH 5,0; en un volumen final que varió de 70 μ l a 0,5 ml. La proteinasa fue activada preincubándola 30 min a 0°C en presencia de 10 mM 2-ME. Después de la incubación (37°C, 24 hs) se corrieron las muestras en SDS-PAGE (10 o 15% acrilamida), incluyendo controles apropiados (enzima sola; cada fragmento solo, incubado y sin incubar) y marcadores de PM. Los geles se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue G-250.

Para el análisis de los productos de degradación por FPLC se cromatografiaron independientemente las muestras, los

controles (sustratos incubados sin proteínasa) y los marcadores de peso molecular (inhibidor de la tripsina de porotos de soja, 20,1 kDa; malato dehidrogenasa, 55 kDa; lactato dehidrogenasa, 140 kDa) por una columna de Superosa 12 en un FPLC System, Pharmacia-LKB, a un flujo de 0,5 ml/min, usando un amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7,6, 0,2 M NaCl. Se detectó la proteína eluida por absorbancia a 280 nm, en el caso del inhibidor de la tripsina, la IgG y sus fragmentos, y por actividad enzimática en los demás casos.

Sustrato endógeno: se preparó proteína soluble de T.cruzi del siguiente modo: se incubó sobrenadante de 105.000 xg con TLCK 1,5 mM toda la noche a 4° C. De esta manera se inactivó irreversiblemente la actividad enzimática. Luego se efectuó diálisis exhaustiva contra agua destilada para eliminar el exceso de inhibidor.

Determinación de pH óptimo con distintos sustratos.

Las mezclas de reacción (0,2 ml de volumen final) contuvieron: uno de los diferentes sustratos (2 mg de proteína soluble de T.cruzi o 1 mg de cada uno de los demás sustratos), 0,09 ml (9 μ moles) del amortiguador apropiado (acetato-acético para el rango de pH 3,0-5,6; Tris-acetato en el rango 6,1-7,2; y Tris-HCl en el rango 7,6-9,0), y proteasa cruda o purificada. La cantidad de enzima usada fue: 0,01 ml (8 μ g) de proteasa purificada, 0,1 ml (0,5 mg) de sobrenadante de 105.000 xg (cuando el sustrato fue la

proteína soluble de T.cruzi) o 0,01 ml (50 µg) de sobrenadante de 105.000 xg (con cada uno de los demás sustratos).

Determinación de estabilidad térmica.

El sobrenadante de 105.000 xg (2,5 mg proteína/ml) se mezcló con el mismo volumen (0,5 ml) de amortiguador acetato-ácido acético 0,1 M pH 5. Cuando se usó proteasa purificada (0,2 ml, 37,5 µg proteína/ml) la mezcla de reacción contuvo además 2-ME 10 mM y glicerol 2,5%. Las muestras se calentaron 10 min a cada una de las temperaturas que figuran en la abcisa de la Figura 13a. Luego se enfriaron en hielo, y la actividad remanente se determinó con azocaseína como sustrato.

Determinación de temperatura "óptima".

Se determinó la actividad de la enzima purificada (7,5 µg) con azocaseína como sustrato, a las distintas temperaturas que figuran en la abcisa de la Figura 13b. La actividad proteolítica del sobrenadante de 105.000 x g, sobre sustrato endógeno, se determinó del siguiente modo: la mezcla de reacción (0,4 ml) contuvo 0,2 ml de sobrenadante de 105.000 xg y 0,2 ml de amortiguador acetato- acético 0,1 M pH 5. Posteriormente a una incubación de 10 min, se detuvo la reacción por la adición de 1 ml de TCA al 3%. Los péptidos liberados solubles en TCA fueron determinados por

la reacción del reactivo de fenoles de Folin- Ciocalteu (121). A los valores obtenidos se les sustrajo el valor obtenido con el control de tiempo cero (donde el TCA se adicionó a la mezcla de reacción en forma previa al sobrenadante). Se expresó la actividad como el incremento de absorbancia a 750 nm por hora y por mg de proteína.

Determinación de actividad de otras enzimas.

a) Experimentos de determinación del peso molecular por filtración en gel.

Malato dehidrogenasa (MDH) (EC 1.1.1.37): Mezcla de reacción: 1 ml de volumen final, conformado por amortiguador Tris HCl 50 mM pH 7,6; NADH 0,15 mM; oxalacetato 0,2 mM y la muestra. Se registró la disminución de la absorbancia a 340 nm, que mide la desaparición de NADH. La actividad específica se definió como los μ moles de NADH oxidados por minuto por mg de proteína. El oxalacetato se disuelve en amortiguador Tris HCl 0,2 M pH 8 en el momento de usar. El NADH se disuelve en Tris HCl 50 mM pH 8 (47).

Lactato dehidrogenasa (LDH) (EC 1.1.1.27): La mezcla de reacción (1 ml de volumen final) contuvo Tris HCl 50 mM pH 7,6; NADH 0,15 mM; piruvato 1 mM y la muestra. Se registró la disminución de la absorbancia a 340 nm. La actividad específica fue definida como en el caso de la MDH. El

piruvato se disolvió en agua destilada (111).

Citrato sintasa (CS) (EC 4.1.3.7): La mezcla de reacción (1 ml) contuvo Tris HCl 50 mM pH 7,6; 5,5'-ditio bis(2-nitrobenzoato) (DTNB) 0,1 mM; acetil CoA 0,1 mM; oxalacetato 0,5 mM y la muestra. Se registró el aumento de la absorbancia a 412 nm. En el medio de reacción, el CoASH liberado reacciona con el DTNB, éste se escinde y el 5-tio 2-nitro benzoato absorbe a 412 nm. La actividad específica se definió como los μ moles de CoASH producido por minuto por mg de proteína (108,177). El DTNB se disolvió en Tris base 0,25 M y se ajustó a pH 8 con HCl 1N.

b) Experimentos sobre efectos de digitonina en células enteras.

Citrato sintasa (CS): se utilizó un protocolo similar al descrito anteriormente, pero antes de agregar el oxalacetato se registró el aumento de absorbancia a 412 nm, el cual se debe a actividad de acetil CoA deacilasa. Luego se agregó oxalacetato 2,5 mM, y se volvió a registrar el aumento de absorbancia. La actividad de la citrato sintasa del parásito se obtuvo restando las dos pendientes.

Enzima málica (EM) (EC 1.1.1.40): la mezcla de reacción usada contuvo (en 1 ml) Tris HCl 50 mM pH 7,6; L-malato 0,1 mM; MnCl₂ 1mM; NADP 0,15 mM y la muestra. Se registró el aumento de absorbancia a 340 nm, debido a la formación de NADPH, causada por acción de las enzimas málicas I y II

(45). Luego se agregó L-aspartato (3 mM) y se siguió registrando la absorbancia a 340 nm. Ahora la mayor contribución a la lectura espectrofotométrica es debida a la enzima málica II, de localización citosólica, que es activada de 6 a 10 veces por L-aspartato (53). Por esta razón se restan las pendientes de las curvas con y sin aspartato. La actividad específica fue definida como el número de μ moles de NADPH formados por minuto por mg de proteína (51).

Hexoquinasa (HK) (EC 2.7.1.2): La mezcla de reacción (1 ml de volumen final) consistió en Tris Acetato 50 mM pH 8, NADP 0,3 mM, $MgCl_2$ 10 mM, ATP 10 mM, glucosa 50 mM, la muestra y glucosa-6-P-dehidrogenasa (Sigma, 0,3 unidades), que se agregó en último término para comenzar la reacción. Se registró el aumento de absorbancia a 340 nm (107).

alfa-Manosidasa (Man)(EC 3.2.1.24): la mezcla de reacción contuvo (en 0,5 ml) amortiguador acetato-ácido acético 50 mM pH4, p-nitrofenil alfa-D-manopiranosido 2,5 mM y la muestra. Se incubó 1 hora a 30° C, con agitación intermitente. Se detuvo la reacción con 1,5 ml de glicina 133 mM, cloruro de sodio 67 mM y carbonato de sodio 83 mM, pH 10,7. Se leyó inmediatamente a 400 nm. El sustrato se disolvió en etanol/agua 1:1 (145).

Fosfatasa ácida (FA)(EC 3.1.3.2): los 0,5 ml de la mezcla de reacción contuvieron: amortiguador Tris-acetato 50mM pH 5,8,

p-nitrofenil fosfato 2 mM y la muestra. El sustrato se disolvió en agua. El resto del protocolo fue similar al de la alfa-manosidasa (13).

Determinación de proteínas.

Se usó el método de Lowry y colaboradores (121), usando albúmina de suero bovino como standard. Con muestras muy turbias, se usó el método de Bensadoun y Weinstein (28) que consistió en un Lowry normal precedido por precipitación de la proteína con ácido tricloroacético y deoxicolato de sodio, centrifugación, y resuspensión de la misma en el reactivo C de Lowry. El color resultante se midió a 660 nm. En las fracciones eluidas de columnas se midió absorbancia a 280 y 260 nm y se calculó la concentración de proteínas según Warburg y Christian (199).

Determinación de peso molecular por filtración en gel.

El peso molecular de la enzima nativa se determinó por filtración en gel (9) en una columna de Sephadex G-200 (33 x 1,6 cm) equilibrada con amortiguador A. La corrida cromatográfica se realizó a 6° C y a presión hidrostática constante. Junto con la proteasa (1,96 mg; fracción eluida de la columna de DEAE celulosa del método de purificación) se sembraron lactato dehidrogenasa (músculo de conejo, PM: 135.000) (0,05 mg), citrato sintasa (corazón de cerdo, tipo III, Sigma, PM: 100.000) (0,02 mg), malato dehidrogenasa

(corazón de cerdo, PM:55.000) (0,05 mg) y tripsinógeno (PM:24.000)(5 mg) en un volumen final de 1 ml. Se eluyó con el mismo amortiguador. El volumen de elución (Ve) de cada enzima se determinó con su ensayo específico. El del tripsinógeno se determinó midiendo absorbancia a 280 y 260 nm. El volumen vacío (Vo) se determinó con Blue Dextran (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Esta sustancia, de peso molecular 2.000.000, es excluida totalmente de las partículas del gel. Se sembró 1 ml, con una concentración de 0,2 %. Se determinó su presencia en las fracciones eluidas midiendo absorbancia a 625 nm. En todos los casos se consideró el pico de elución de cada sustancia en el diagrama de elución (unidades de actividad enzimática o mg proteína/ ml o absorbancia a 625 nm, en función del volumen de elución) a la intersección de las rectas correspondientes a ambas pendientes del pico del soluto. Luego se graficó el volumen de elución de las sustancias patrones versus el logaritmo de su peso molecular, y se determinó el peso molecular de la proteinasa nativa en base a su Ve.

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se siguió el método de Laemmli (113) con pequeñas variaciones. El gel separador fue de 15% o 10% p/v de acrilamida y 0,40% o 0,27% de metilen-bis-acrilamida en amortiguador Tris-HCl 0,36 M pH 8,8 , SDS 0,1 % p/v. El gel concentrador fue de 5% p/v de acrilamida y 0,13% de

comonómero, en amortiguador Tris-HCl 0,12 M pH 6,8, SDS 0,1% p/v. El amortiguador de la corrida electroforética contuvo Tris (Sigma) 25 mM pH 7,2, glicina 192 mM, SDS 0,1% p/v. La polimerización fue química, utilizando N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina (TEMED) (Merck) como iniciador de la reacción y persulfato de amonio (Mallinckrodt) como catalizador. Se usaron dos placas de vidrio de 8,5 cm x 6 cm x 1 mm, y una cuba Aquebogue para electroforesis vertical (Model 50, USA). La fuente de poder era de LKB (Power Supply 2103). A las muestras y al standard de peso molecular se les agregó SDS 0,7% p/v (solubiliza a las proteínas, dándoles la carga negativa y la conformación adecuada para migrar), 2-ME 1% v/v (ruptura de enlaces disulfuro), amortiguador Tris-HCl pH 6,8 0,12M final, y azul de bromofenol 1% v/v como indicador del frente de corrida. Se agregó glicerol 5% v/v cuando la muestra no lo tenía, para lograr que por densidad la muestra descendiera al fondo del carril. Luego fueron sometidos a calentamiento (95°C) por 2 min para lograr su desnaturalización. Tiempos mayores (5 min) originan rupturas de las moléculas proteicas y en consecuencia patrones electroforéticos alterados (105). Cuando se quiso correr la proteína sin reducir los puentes disulfuro no se agregó 2-ME a las muestras. Las corridas se realizaron a 9 mA constantes, durante 2 hs, a 4° C. En estas condiciones, el frente de corrida azul del colorante (ver adelante) llegó

aproximadamente a 2 mm de la terminación del gel.

Determinación de peso molecular por SDS-PAGE.

Se sembró 54 µg de proteinasa (último paso de la purificación) en un carril del gel. En otro carril se sembró el patrón de peso molecular (100 µg del Dalton Mark VI MW SDS 70 kit, Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA), cuyos componentes tienen los siguientes PM aproximados: lisozima: 14.300, β-lactoglobulina: 18.400, tripsinógeno: 24.000, pepsina: 34.700, albúmina de huevo: 45.000 y albúmina de plasma bovino: 66.000. Se usó un aparato de electroforesis vertical en placa marca BRL (Bethesda Research Laboratories, Bethesda, MD, USA). Las dimensiones de la placa fueron: 16 cm x 19,6 cm x 2 mm. En un lapso de 7 hs a 13 mA el frente de corrida llegó a 2 mm del fin del gel. Se calculó la movilidad relativa de las proteínas del standard de peso molecular y de la proteinasa (R_f), o sea la relación entre la distancia recorrida por cada proteína y la distancia recorrida por el frente de corrida. La distancia recorrida por las proteínas se midió entre el límite de separación del gel 10% y el gel 5%, y la mitad de las bandas teñidas con Coomassie. El azul de bromofenol, en gel de 10% acrilamida, forma dos frentes: uno azul, posterior, y uno rojo, anterior (207). La distancia recorrida por el frente de corrida se midió entre el límite de separación del gel 10% y el gel 5%, y el frente

azul del colorante. Luego se graficó la movilidad relativa de las proteínas del standard (R_f) versus el logaritmo de su peso molecular (202). El peso molecular de la proteinasa se obtuvo del gráfico, en base a su R_f .

Determinación de punto isoeléctrico. Se armó un gel de 90x100x2 mm, conteniendo: 4,85% acrilamida, 0,15% bis-acrilamida, glicerol 12%, anfólitos Ampholine LKB 1,8% (en el rango 3,5-9,5) y 0,2% (en el rango 5-8). Se polimerizó el gel químicamente (TEMED, persulfato de amonio). Se usó una cuba de electroforesis horizontal Multiphor 2117 LKB. La placa refrigerante se termostató a 4°C con un circulador Multitemp 2209 LKB. Se usó hexano para favorecer la conducción del calor entre la placa refrigerada y el papel reticulado sobre el que se colocó el vidrio con el gel. Las soluciones para los electrodos fueron: ácido fosfórico 1M para el ánodo, hidróxido de sodio 1M para el cátodo. Se realizó un preenfocado de 15 min a 10 mA constantes. Se sembraron 15 μ l de la muestra sobre papel de filtro Whatman de 1x0,5 cm, a mitad de distancia entre ambos electrodos. La muestra fue proteinasa purificada y concentrada 7 veces en celdas verticales Amicon (20 min, 4°C), hasta una concentración de 3 mg/ml.

Para la corrida (2,5 horas) se fijaron valores máximos para el voltaje (900 v) y la potencia (7 w), variando la intensidad de 15 mA iniciales hasta 2 mA finales. Al

finalizar el isoelectroenfocado se cortaron fragmentos de 1x1 cm a lo largo del gradiente para determinar el pH. Se dejó eluir cada fragmento en 2 ml de KCl 10 mM, a temperatura ambiente, por 3 horas. Luego se midió el pH de cada tubo. El resto del gel se tiñó con nitrato de plata. Se midió la distancia desde el cátodo para cada banda. Se graficó pI versus distancia desde el cátodo. Luego se halló el pI de la proteinasa en base a su distancia al cátodo.

Tinción para proteínas.

Se usó la siguiente solución de tinte: Coomassie Brilliant Blue G-250 0,05 % p/v, ácido tricloroacético 10 %, metanol 40 %. La utilización del colorante G-250 en vez del R-250 fue introducida por Diezel (70). Como el primero es menos soluble en ácido tricloroacético, su penetración en el gel es menor. De este modo se evita un fuerte color de fondo, permitiendo visualizar en poco tiempo de lavado las bandas más débiles. El tiempo de tinción fue de treinta minutos a temperatura ambiente. Para acelerar el proceso se puso en estufa a 60°C. La solución de destintado consistió en ácido acético glacial 5%, metanol 20%. Se hicieron varios cambios hasta llegar a un color de fondo aceptable. Las bandas proteicas se tiñen de un color azulado.

Para teñir con plata geles de isoelectroenfoco se usó un equipo comercial para tinción con nitrato de plata (Bio Rad). Se los fijó previamente durante toda la noche en 30%

metanol, 10% ácido tricloroacético, 3,5% ácido sulfosalicílico, y luego se los lavó durante 2 horas con varios cambios de 30% metanol, 12% tricloroacético, para conseguir la remoción completa de los anfolitos. Se siguieron las recomendaciones del fabricante para el revelado.

Tinción para hidratos de carbono.

Se usó el método de Fairbanks (81) con algunas modificaciones. Consistió en los siguientes pasos:

- 1.Fijación: metanol/ acético/ agua (40:7:53), 4 hs.
- 2.Periodato de sodio: 0,7% en acético 5%, 2 hs.
- 3.Arsenito de sodio: 0,5% en acético 5%, 30 min.
- 4.Arsenito de sodio: 0,1% en acético 5%, 20 min (2 veces).
- 5.Acido acético: 5%, 10 min.
- 6.Reactivo de Schiff: 2 hs.
- 7.Metabisulfito de potasio: 0,5% en HCl 10 mM (varias veces).

Se guardó el gel en ácido acético 5%. Los azúcares se tiñen de color rosado.

Preparación del reactivo de Schiff: se preparó una solución 0,5% de fucsina básica en agua destilada. Se calentó. Se dejó enfriar y se añadió HCl concentrado 1% v/v y metabisulfito de sodio 0,8% p/v. Se decoloró con carbón activado. Se filtró. Se guardó a 4° C, en oscuridad.

Localización intracelular.a) Tratamiento de células enteras con digitonina.

Se basa en el método de Zuurendonk y Tager (213), aplicado a T.cruzi por Cazzulo y colaboradores (53). La digitonina forma un complejo insoluble con los 3- β hidroxisteroides de las membranas (colesterol), alterando su permeabilidad. La membrana plasmática y las de las diversas organelas son permeabilizadas gradualmente, a medida que se aumenta la concentración de digitonina, dependiendo de su composición química. Dado que la membrana plasmática es más rica en colesterol que las membranas de las organelas, es la primera en ser afectada (60). Los parásitos se cosecharon como se explicó previamente, y se lavaron una vez con sacarosa-KCl y dos veces con MSE (amortiguador morfolino propano sulfonato 20 mM pH 7, sacarosa 0,25 M, EDTA 3 mM) por centrifugación (4.000 xg, 15 min). Se suspendieron en MSE para lograr una concentración de 500 mg de peso húmedo/ ml. Se guardó una alícuota para determinar proteínas según el método de Bensadoun y Weinstein (28). Se pusieron 0,25 ml en tubos Eppendorf (125 mg de peso húmedo/ tubo) y se adicionó MSE con distintas concentraciones de digitonina, siendo el volumen final de 1 ml. La digitonina (Sigma) se disolvió en el momento de usar en dimetilformamida, y luego se agregó al MSE. Se incubó 5 min a 25° C, con agitación ocasional. Se centrifugó 2 min en una microcentrífuga Eppendorf. Los

sobrenadantes se guardaron a -70°C . Los precipitados se resuspendieron en amortiguador fosfato de sodio 20 mM pH 7, con EDTA 3 mM y digitonina 2 mg/ml, y se sometieron a sonicación 10 segundos a 40 watts de potencia (sonicador Branson, Danbury, Connecticut, USA). Se centrifugaron los tubos y los sobrenadantes se congelaron. Este último tratamiento de los precipitados con alta concentración de digitonina y sonicación libera la totalidad de la actividad enzimática al sobrenadante. El 100 % de actividad enzimática en cada concentración de digitonina es la actividad liberada al sobrenadante por esa concentración de digitonina sumada a la actividad retenida en las organelas, y liberada por el tratamiento final con ultrasonido. Las enzimas determinadas fueron las nombradas previamente.

b) Centrifugación diferencial y latencia.

Se usó el método descrito por Cannata y col. (1982) (46). Los epimastigotes se cosecharon y lavaron como se describió previamente, salvo que se hicieron dos lavados con amortiguador Tris HCl 25 mM pH 7,6, EDTA 1 mM, KCl 4 mM, sacarosa 0,32 M. Se molieron con carburo de silicio (Crystalon) en un mortero (1,5 g por g de células), por 1 min, a 4°C , logrando la ruptura de prácticamente la totalidad de las células, como se observó al microscopio óptico. La pasta resultante fue resuspendida en el amortiguador nombrado, a razón de 12 ml por g de células

(peso húmedo). Luego se centrifugó a 800xg, 5 min, 4° C, para eliminar el carburo de silicio. Al precipitado se lo resuspendió con 1/5 del volumen total, y se volvió a centrifugar. Los dos sobrenadantes obtenidos se juntaron. Luego se llevó a cabo la centrifugación diferencial, repitiendo dos veces cada centrifugación para optimizar la cantidad y calidad del material obtenido en cada fracción. La primera centrifugación (1.000 xg, 10 min) permitió precipitar núcleos, kinetoplastos, flagelos y parásitos enteros que hubieran sobrevivido a la molienda. Se la llamó fracción nuclear (N).

Las siguientes centrifugaciones (5.000 xg, 10 min; 14.500 xg, 10 min; 105.000 xg, 1 h) precipitaron las fracciones de gránulos grandes (GG), gránulos pequeños (GP) y microsomal (M), representando el sobrenadante final la fracción citosólica (S).

En cada una de las fracciones obtenidas se determinaron las actividades de la proteinasa y de las enzimas marcadoras. Las actividades medidas en ausencia y en presencia de Triton X-100 0,1% se designaron respectivamente actividad libre y actividad total. Se calculó la latencia usando la siguiente fórmula (194):

$$\text{latencia} = \frac{(\text{act. total} - \text{act. libre}) \times 100}{\text{act. total}}$$

act. total

c) Ultracentrifugación en gradiente isopícnico de sacarosa.

Las fracciones de gránulos grandes y pequeños (GG y GP) (138) se obtuvieron conjuntamente por centrifugación (14.500 xg, 10 min) del sobrenadante de 1.000 xg, y se resuspendieron en 4 veces su volumen. Una alícuota (0,4 ml) se sembró en la parte superior de un gradiente lineal de sacarosa (0,4 a 2 M)(11,4 ml) con EDTA 1 mM y amortiguador Tris HCl 25 mM pH 7,4 , armado sobre una fracción de 0,6 ml de solución de sacarosa 2,5 M. Después de ultracentrifugar a 30.000 rpm, 13 hs, a 6° C, con un rotor SW 40 en una ultracentrífuga Beckman L2-65B, se colectaron fracciones de aproximadamente 0,4 ml, introduciendo una aguja hasta el fondo del tubo y usando una bomba peristáltica. Se separó una alícuota de cada tubo (20 µl) que se llevó a 0,2 ml con agua destilada, y que se utilizó para, midiendo el índice de refracción, hallar la concentración de sacarosa y, a partir de ella, la densidad promedio de cada fracción. Al resto se le agregó 1,4 ml de amortiguador Tris HCl 20 mM pH 7,6 , EDTA 1 mM. Se sonicó (3 pulsos de 15 seg) y se guardó a -70°C para la determinación de actividad de las distintas enzimas. Para el cálculo y presentación de los resultados se usaron los métodos descriptos por de Duve y col. (26,35), normalizando el rango de densidad de cada fracción (35). La frecuencia, que corresponde a la actividad relativa de la enzima en cada fracción normalizando por el

rango de densidad, se calculó usando la fórmula $\Delta Q / \Sigma Q \cdot \Delta \delta$, donde ΔQ es la actividad enzimática presente en cada fracción, ΣQ la suma de las actividades de todas las fracciones, y $\Delta \delta$ el rango de densidad cubierto por cada fracción. El % de recuperación se consideró como la suma de las actividades de todas las fracciones con respecto a la actividad de la muestra sembrada.

RESULTADOS Y DISCUSION.

Purificación.

La Tabla I muestra los pasos de purificación de la enzima en un experimento representativo. El rendimiento se calculó tomando como 100% la actividad enzimática total del sobrenadante de 105.000 xg, y la purificación se calculó en base a la actividad específica del mismo sobrenadante, tomada como unidad. El rendimiento fue de aproximadamente 7%, y la enzima se purificó 34 veces.

En la Fig.2 se muestra un perfil característico de la filtración en gel (Sephadex G-200), al sembrar el precipitado del corte 0-50% con sulfato de amonio. La enzima se ubicó en el segundo pico proteico. En la Fig. 3 se ve el perfil obtenido al eluir la columna de intercambiador aniónico DEAE-celulosa. La enzima se localizó en el segundo pico. La Fig. 4 muestra la elución de una columna de hidroxilapatita. La enzima de mayor pureza se eluyó con 20 mM del amortiguador fosfato de potasio. Por SDS-PAGE en condiciones reductoras se vio que la enzima purificada presentaba una única banda, al teñir con Coomassie Blue (Fig. 5b). El límite de detección con este colorante es de 0,5-2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (70).

Peso Molecular.

El peso molecular de subunidad se estableció por SDS-PAGE en

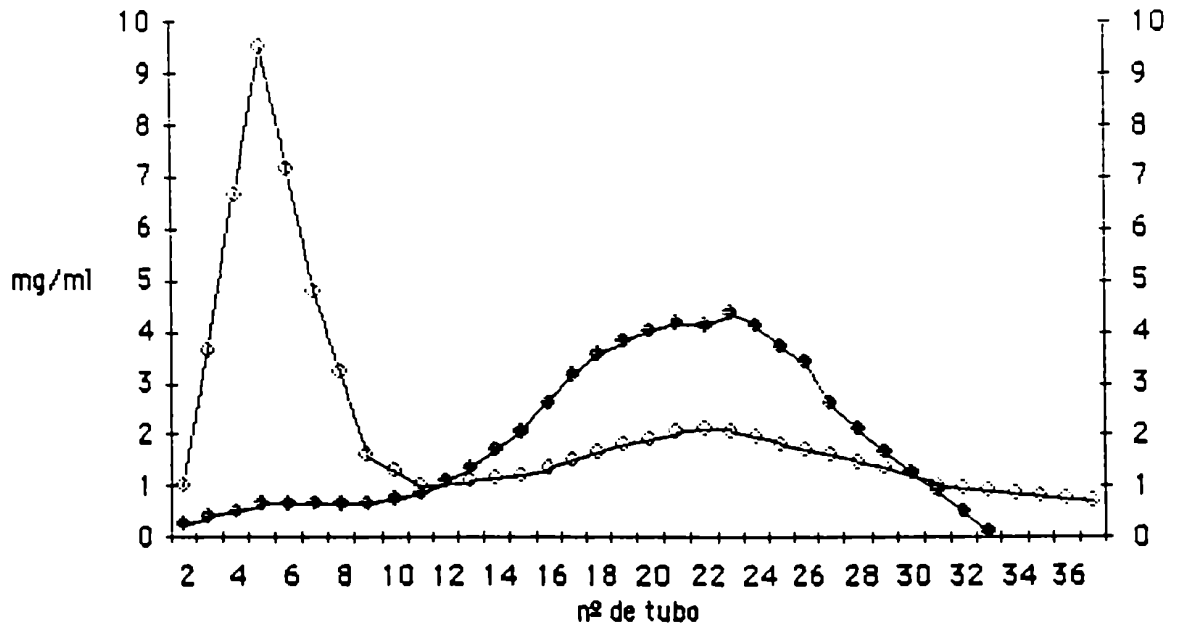
TABLA I. Purificación de la proteinasa

Paso de purificación	Vol. (ml)	Proteína (mg)	Act. Enzim. Total (u)	Act. Enzim. Esp. (u/mg)	Rend. (%)	Purif. (veces)
1. Sob. 105000xg	299	1.495	4.306	2,88	100	1
2. Sulf. amonio 0-50%	8,8	370	2.534	6,86	59	2,4
3. Sephadex G-200	82	116	2.022	17,48	47	6
4. DEAE-celulosa	22	17,8	795	44,50	18	15,4
5. Hidroxilapatita	17,2	2,9	285	97,0	6,6	33,7

La enzima fue purificada a partir de 34 g (peso húmedo) de epimastigotes.

Resultados y Discusión

Figura 2- Filtración en gel Sephadex G-200.



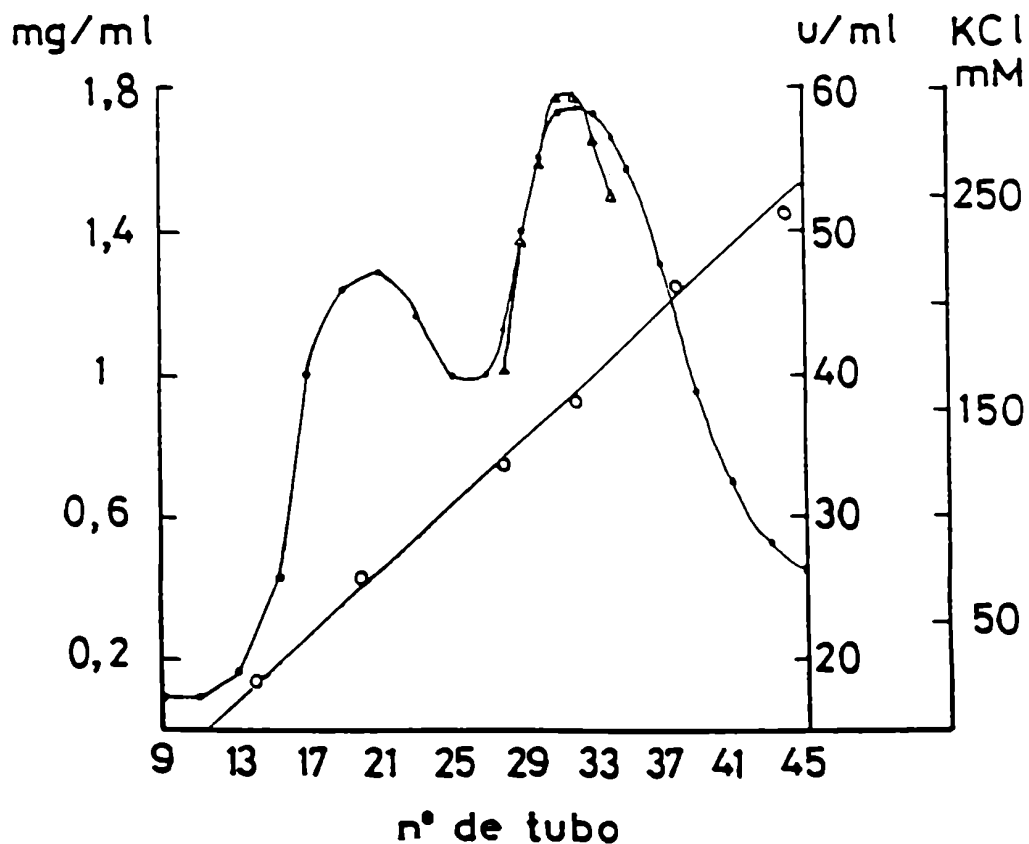
Las condiciones experimentales fueron las descritas en Materiales y Métodos.

(o) Proteínas.

(●) Actividad Enzimática.

Resultados y Discusión

Figura 3- Columna de intercambio aniónico de DEAE-celulosa.



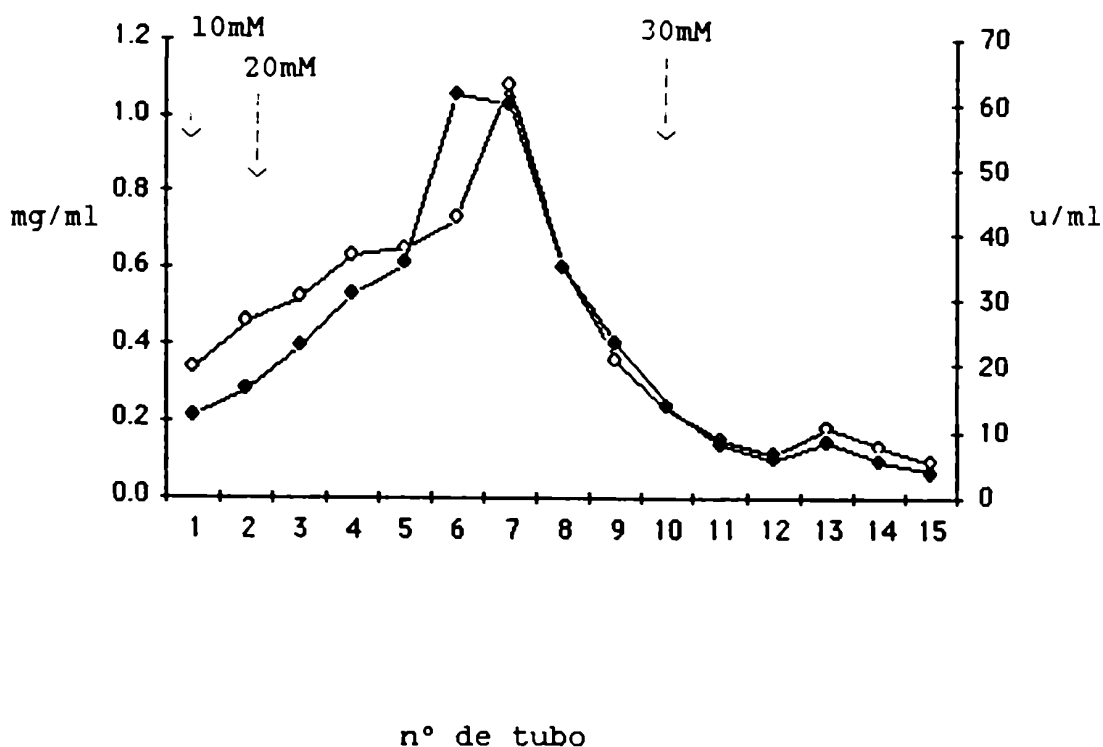
Las condiciones experimentales fueron las descritas en Materiales y Métodos.

(●) Proteína.

(Δ) Actividad Enzimática.

(o) Concentración de KCl.

Figura 4- Columna de hidroxilapatita.



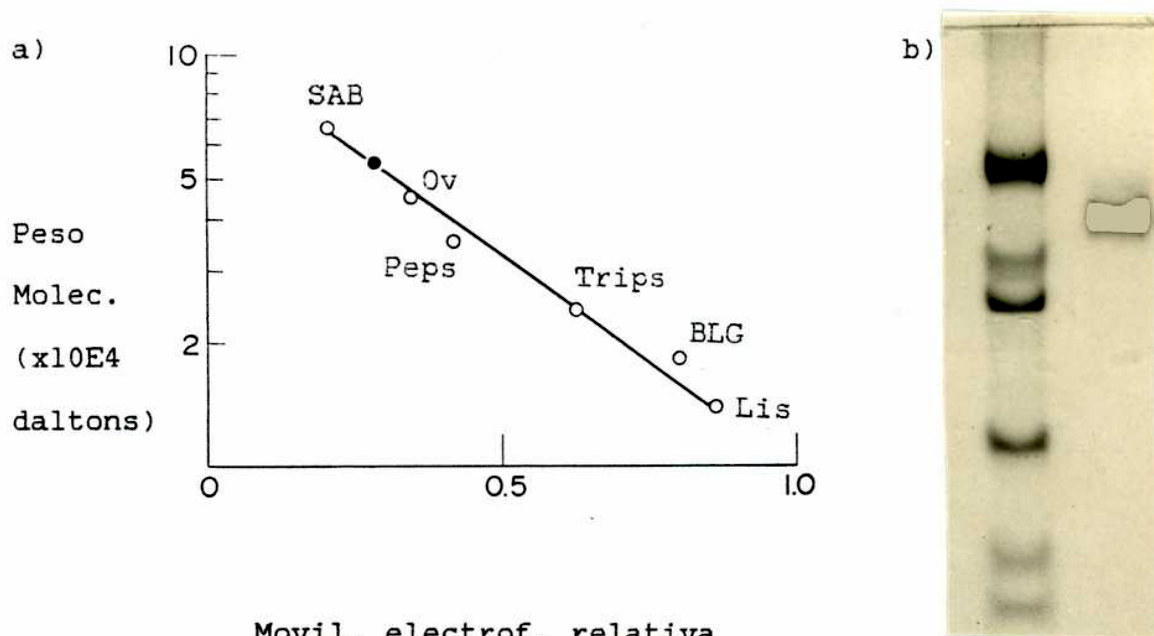
Las condiciones experimentales fueron las descritas en Materiales y Métodos.

(o) Proteína.

(●) Actividad Enzimática.

Las flechas indican la adición de soluciones de amortiguador de fosfato monopotásico de molaridad creciente.

Figura 5- Estimación del Peso Molecular de la proteinasa por SDS-PAGE.



a) Gráfico del peso molecular en función de la movilidad electroforética. El círculo negro representa la proteinasa.

SAB: seroalbúmina bovina, Ov: albúmina de huevo, Peps: pepsina, Trips: tripsinógeno, BLG: β -lactoglobulina, Lis: lisozima.

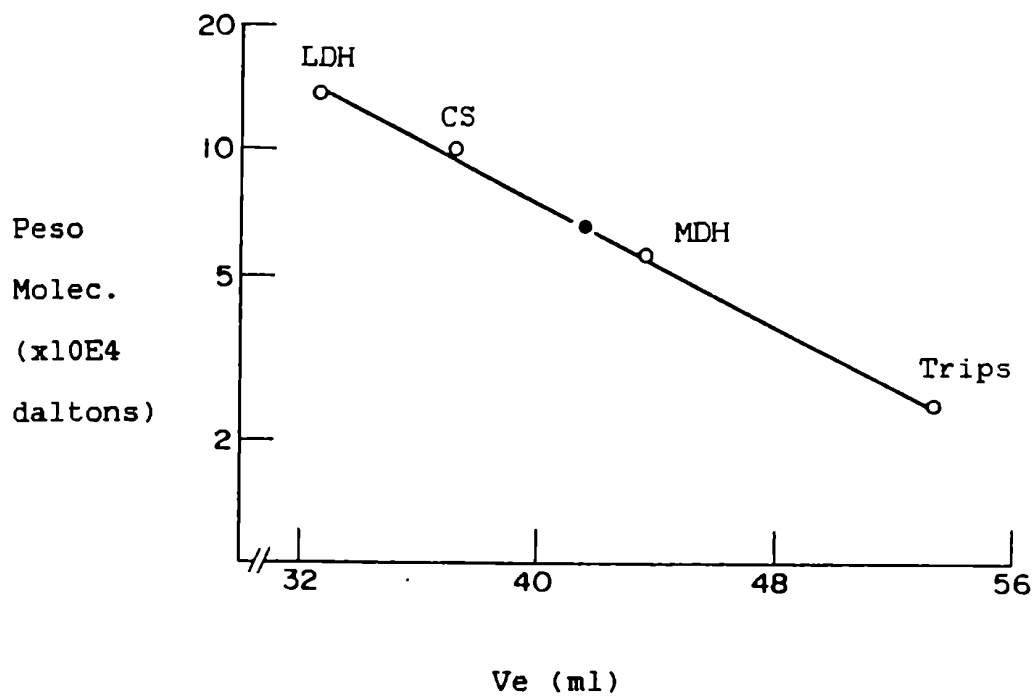
b) Gel del cual se obtuvieron los datos de (a). Carril izquierdo: standard de peso molecular. Carril derecho: proteinasa purificada.

condiciones reductoras (Fig. 5a). El peso molecular obtenido de la recta standard fue de 55.000 ± 5.500 . El peso molecular de la enzima nativa, por filtración en gel (Sephadex G-200), fue de 65.000 ± 6.500 (Fig. 6). En consecuencia, la enzima nativa es monomérica, con un peso molecular aproximado de 60.000.

Naturaleza glicoproteica.

Por SDS-PAGE en condiciones reductoras y posterior tinción con el reactivo de Schiff la proteinasa se tiñó, comportándose como una glicoproteína (Fig. 7). Este resultado se consideró con prudencia. Algunas proteínas sin hidratos de carbono a veces dan tinción de Schiff positiva, por razones que incluyen la unión del colorante a SDS o a una proteína no oxidada (25,92,146), la reacción del reactivo de Schiff con proteína oxidada por periodato (25) o la unión y posterior tinción de fragmentos de carbohidratos oxidados (formados durante la oxidación periódica) a bandas de proteínas (132). Al sembrar la proteinasa en columna de Sepharosa Con A (Fig. 8a) se observó retención de la misma, y posterior elución específica con los azúcares competitivos. La recuperación fue del 79%. Al analizar los eluidos por SDS-PAGE en condiciones reductoras se confirmaron los resultados anteriores. La siembra presentó la banda correspondiente a la proteinasa y otras bandas (impurezas proteicas). Durante la siembra estas últimas

Figura 6- Estimación del Peso Molecular de la proteinasa por filtración en gel (Sephadex G-200).



El círculo negro representa la proteinasa.

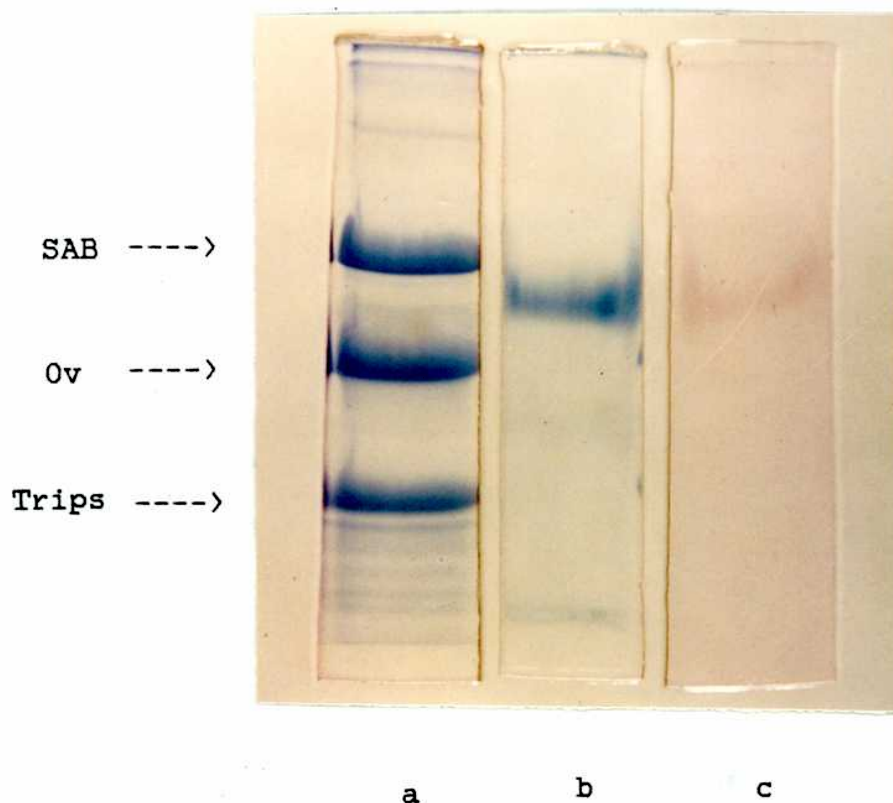
LDH: lactato dehidrogenasa.

CS: citrato sintasa.

MDH: malato dehidrogenasa.

Trips: tripsinógeno.

Figura 7- Naturaleza glicoproteica de la proteinasa (SDS-PAGE y tinción de Schiff).



a) Standard de peso molecular teñido con CBB G-250.

SAB: seroalbúmina bovina.

Ov: albúmina de huevo.

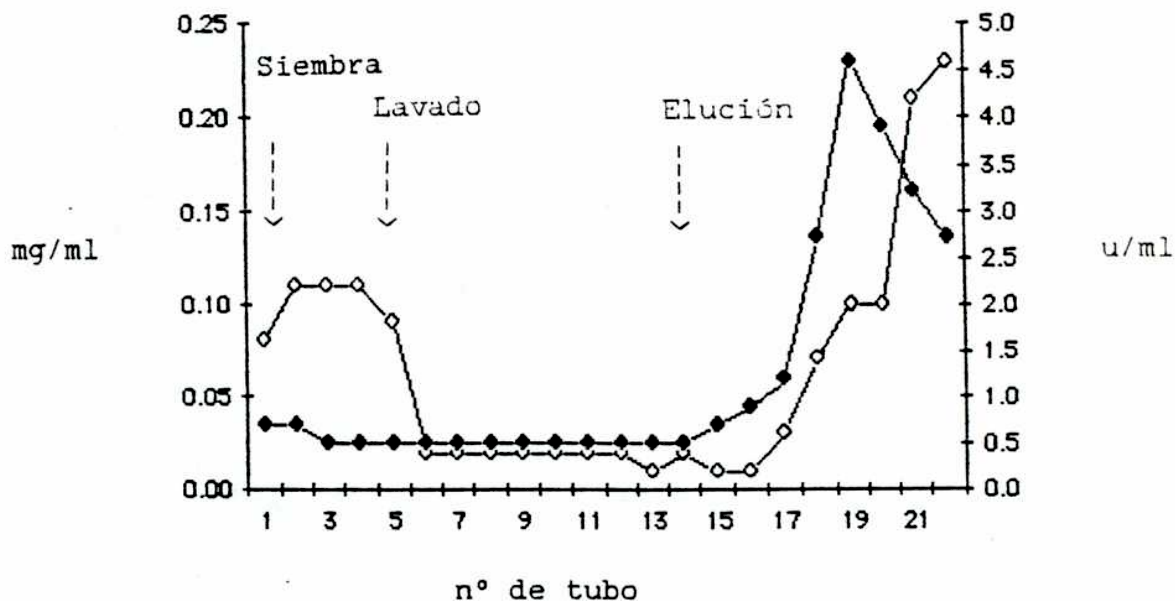
Trips: tripsinógeno.

b) Proteinasa teñida con CBB G-250.

c) Proteinasa teñida con el reactivo de Schiff.

Figura 8- Naturaleza glicoproteica de la proteinasa.

a) Elución de la columna de Sepharosa-ConA.

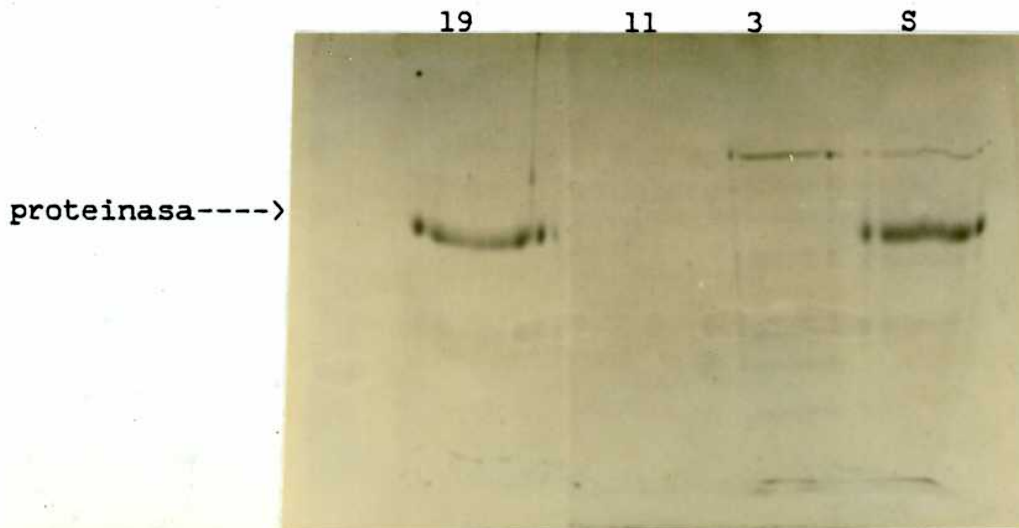


Las condiciones experimentales fueron las descritas en Materiales y Métodos.

(o) Proteína.

(●) Actividad Enzimática.

b) SDS-PAGE en condiciones reductoras de la siembra (S) y de los tubos 3, 11 y 19.



proteínas atravesaron la columna sin ser retenidas, y terminaron de salir durante el lavado. La unión Sepharosa Con A-proteinasa fue estable en estas condiciones. Cuando se introdujeron en el líquido de elución los azúcares competitivos, la enzima se recuperó en el eluido. La Con A, lectina de origen vegetal (*Canavalia ensiformis*), interactúa a través de uniones hidrógeno con determinantes específicos de carbohidratos (151). Se une primariamente al grupo trimanosil externo (tipo híbrido y alta manosa) o al central (tipo complejo) de cadenas de azúcares unidas a asparagina (40). Por su unión a Con A, la proteinasa poseería una secuencia receptora para el precursor oligosacárido, del tipo Asn-X-Thr/Ser, donde X representa cualquier aminoácido (182). Analizando conjuntamente los resultados de ambas técnicas se puede afirmar que la proteinasa es una glicoproteína. Estudios recientes (59) demostraron que la proteinasa es deglicosilada por tratamiento con la endo N-acetil glucosaminidasa H (endo H), con aumento de su movilidad electroforética; el peso molecular de la proteinasa decreció de aproximadamente 60.000 a aproximadamente 55.000, por SDS-PAGE. Se sabe que la glicosilación altera la movilidad y la definición de las bandas en SDS-PAGE (118). Esto puede explicar el aspecto difuso de la banda de la proteinasa en nuestros electroforetogramas.

pI de la proteinasa.

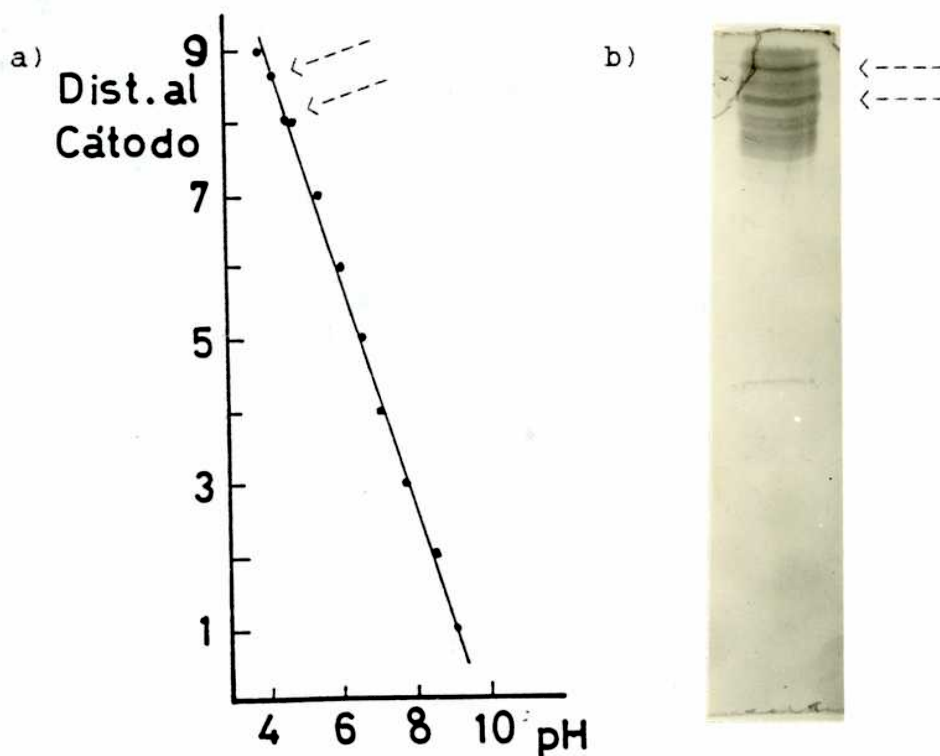
En la Fig. 9 se observa el resultado obtenido al sembrar 45 μg de la proteinasa en un gel de isoelectroenfoque. La enzima presenta varias bandas en la región acídica del gel, siendo las más importantes las de pI 4,75 y 4,35. Este dato concuerda con el hecho que la proteinasa presentara carga negativa a pH 7,6, haciendo posible su retención en columna de DEAE-celulosa. La presencia de varias bandas puede atribuirse, al menos en parte, a autoproteólisis de la proteinasa, hecho demostrado recientemente (59). En preparaciones enzimáticas que presentaban en SDS-PAGE varias bandas adicionales en la zona de 25 a 35 kDa, se demostró que dos de ellas tenían la misma secuencia N-terminal de la enzima original. No pueden descartarse, por otra parte, modificaciones menores post-traduccionales capaces de modificar el pI.

pH óptimo con distintos sustratos.

La enzima purificada usó caseína, azocaseína, seroalbúmina bovina y hemoglobina como sustratos. La azocaseína es un sustrato típico para endoproteinasas. No hidrolizó BAPA ni otras p-nitroanilidas, como los derivados leucil-, lisil-, y glicil-. En el rango de pH 5 a 7,6 la mayor actividad fue con caseína (Fig. 10a). A pH 4 los mayores valores se obtuvieron con seroalbúmina bovina.

Para todos los sustratos las mayores actividades se

Fig. 9- Determinación del pI de la proteinasa en gel de isoelectroenfoque.

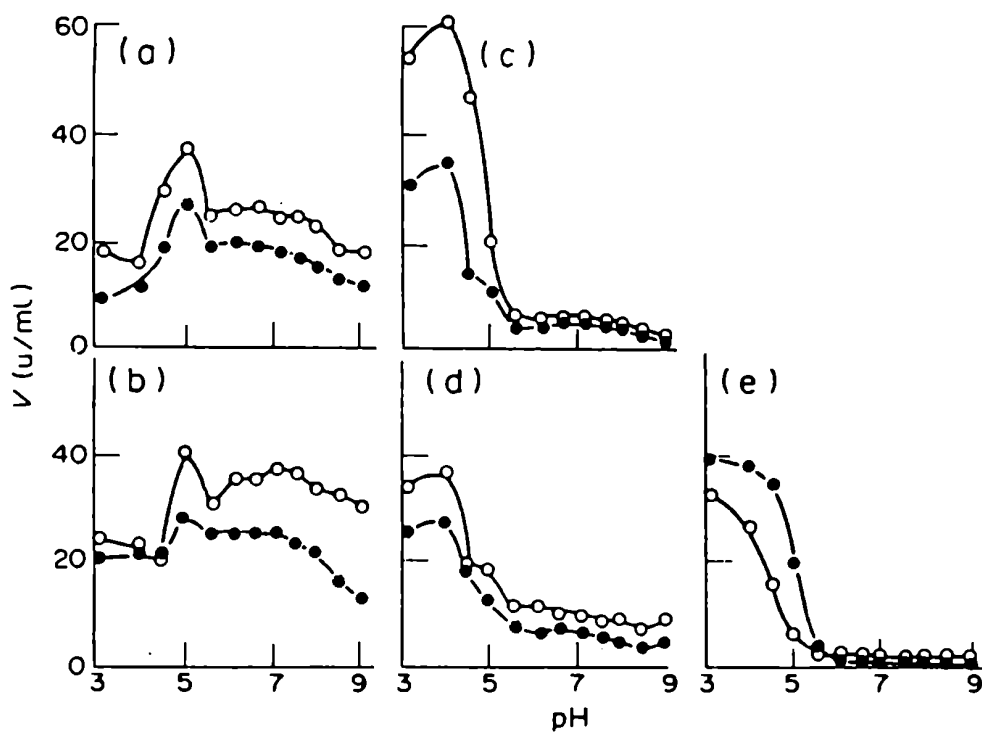


a) Calibración del gradiente de pH. Se grafica la distancia de las diferentes fracciones del gel con respecto al cátodo, en función del pH del líquido eluido de las mismas.

b) Tinción con nitrato de plata del gel de IEF.

En a) y b) las flechas señalan las bandas principales, que eran las únicas visibles al comienzo del revelado de la tinción con nitrato de plata.

Figura 10- Actividad de la proteinasa cruda y purificada sobre distintos sustratos en función del pH.



● Sobrenadante de 105.000 xg.

○ Proteinasa purificada.

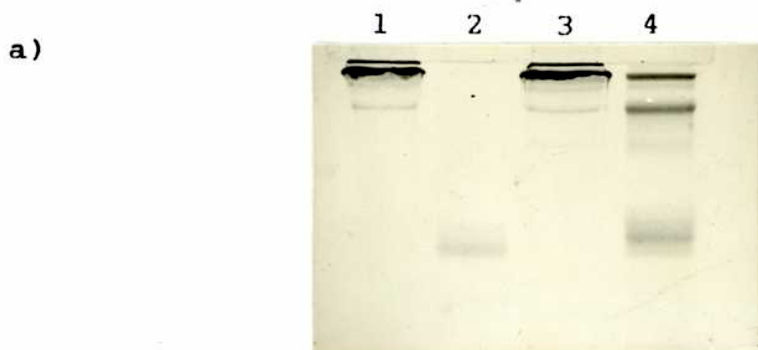
Sustratos: a) azocaseína, b) caseína. c) seroalbúmina

bovina, d) hemoglobina, e) proteína soluble de *T. cruzi*.

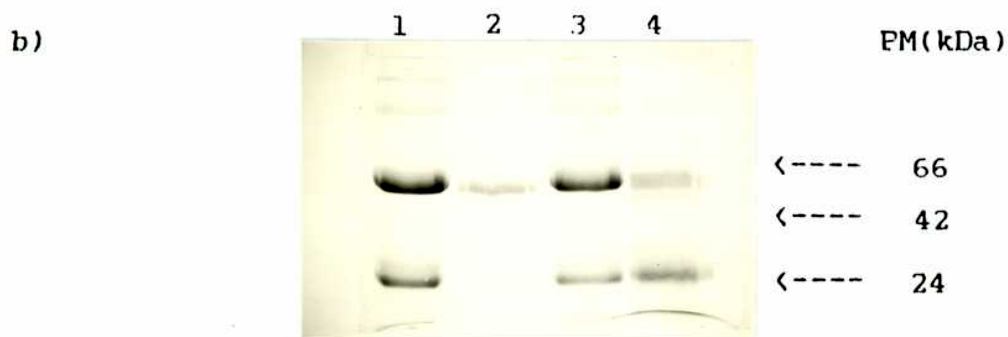
obtuvieron en la zona de pH ácido. Con seroalbúmina bovina la actividad (máxima a pH 4) bajó abruptamente a valores mayores, y fue muy reducida a pH 5,5- 9. Con hemoglobina (Fig. 10d) el perfil fue similar, pero se retuvo del 20 al 30% de la actividad en el rango 5,5- 9. La actividad caseinolítica presentó un máximo en pH 5, pero entre pH 6 y 8 presentó valores altos, poco inferiores a la actividad a pH 5. Cuando se repitieron estos ensayos usando el sobrenadante de 105.000 xg como fuente de enzima se obtuvieron perfiles muy similares. Esto implica que la proteinasa aislada es la principal responsable de la hidrólisis de estos sustratos por epimastigotes de T.cruzi. En la Figura 10e también se grafica la actividad con sustrato endógeno, tanto del sobrenadante de 105.000 xg como de la enzima purificada. El pH óptimo con estos sustratos fue de 3- 4. Debe tenerse en cuenta que los diferentes perfiles de pH también están en relación con la conformación físico- química del sustrato en esos diferentes pHs (197), lo que altera sus propiedades, especialmente la solubilidad. Esto es particularmente importante en el caso de la caseína, cuya solubilidad disminuye abruptamente a valores de pH inferiores a 5.

En la Figura 11 se observa la acción de la proteinasa sobre la Ig G humana. En condiciones no reductoras (11a) se observa que la Ig G nativa (PM aprox. 150.000) es

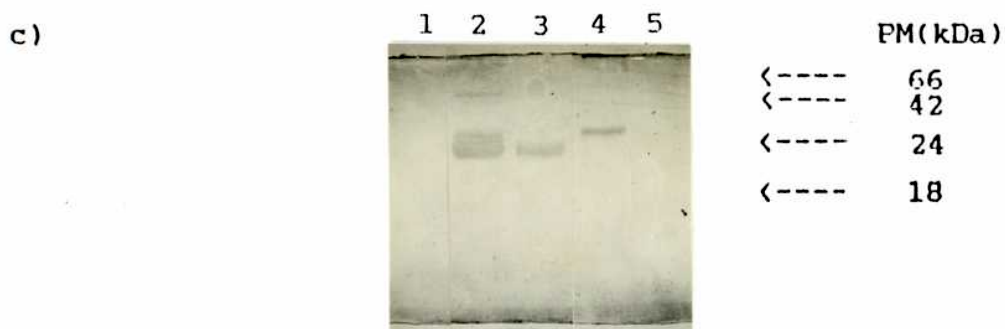
Fig. 11- Digestión de IgG humana. Análisis por SDS-PAGE.



Gel 10%, sin 2-ME. 1: IgG sin incubar, 2: proteinasa, 3: IgG incubada, 4: IgG incubada con la proteinasa.



Gel 10%, con 2-ME. 1: IgG sin incubar, 2: proteinasa, 3: IgG incubada, 4: IgG incubada con proteinasa.



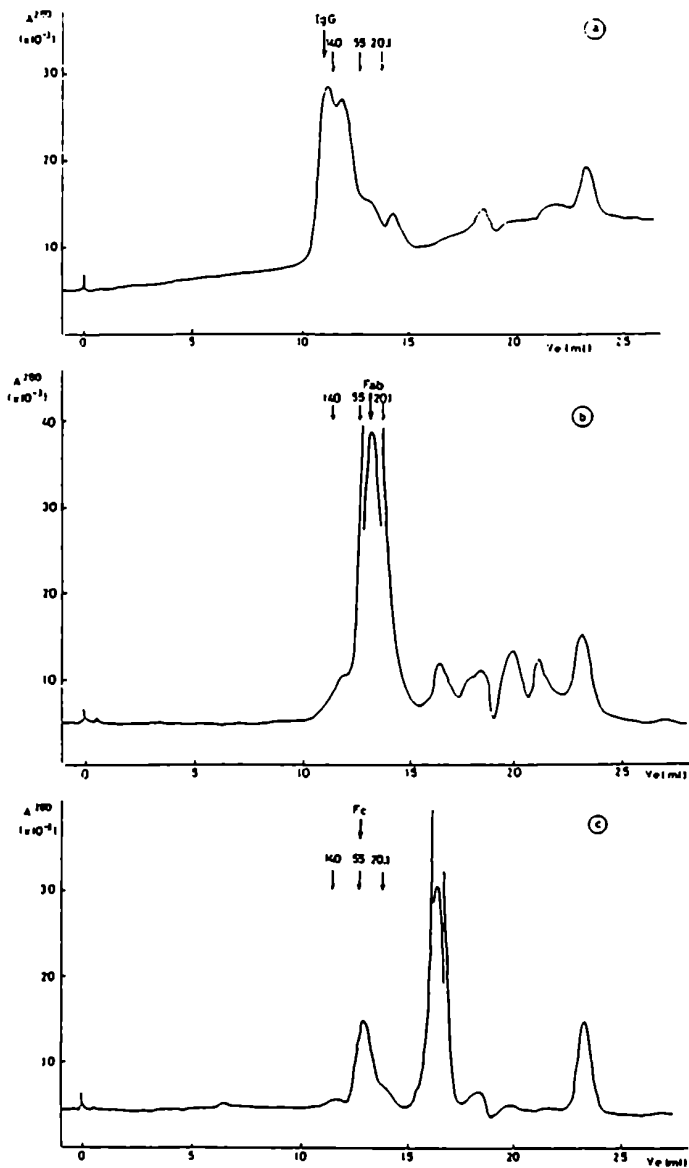
Gel 15%, con 2-ME. 1: proteinasa, 2: Fab incubado, 3: Fab incubado con proteinasa, 4: Fc incubado, 5: Fc incubado con proteinasa.

hidrolizada y origina bandas de menor PM, las dos más importantes en la vecindad de 100 y 50 kDa. No se intentó determinar exactamente su PM dado que su movilidad no sólo es influenciada por su tamaño sino también por el número de puentes disulfuro presentes (102). En condiciones reductoras (11b) se observa que la cadena pesada (H) de la Ig G (PM aprox. 50.000) pierde intensidad y origina otras bandas. En el sector de la cadena liviana (L) (PM aprox. 25.000) la imagen no es tan clara, debido a la superposición con productos de hidrólisis de la cadena H.

Al digerir el fragmento Fab (11c) se observa una disminución de la intensidad de la banda, indicando una proteólisis limitada. El fragmento Fc (11c), en cambio, sufre una proteólisis extensiva, claramente visible por la virtual desaparición de la banda de proteína original. Los productos de digestión parecen ser de bajo PM, dado que no se observan bandas definidas en el gel. Comparando con los standard de PM, se observa que el Fc migra más lento que el Fab, a pesar de tener PM muy similares, hecho ya descrito en la literatura (101).

Cuando muestras similares se separan por FPLC usando una columna para filtración por gel, se observa que la IgG nativa (Fig. 12a) corre como un dímero de 300 kDa. Después de la digestión, parte del sustrato se desdobra en un pico de aproximadamente 100 kDa, con un hombro de 50 kDa, y

Fig. 12- Digestión de IgG humana. Análisis por FPLC.



Patrón de elución de las muestras digeridas, al filtrar por una columna de Superosa 12. a) IgG , b) Fab, c) Fc. Flechas gruesas: ubicación de la molécula sin digerir. Flechas finas: ubicación de los marcadores de PM. Datos expresados en kDa. Volumen de exclusión total: 23,3 ml.

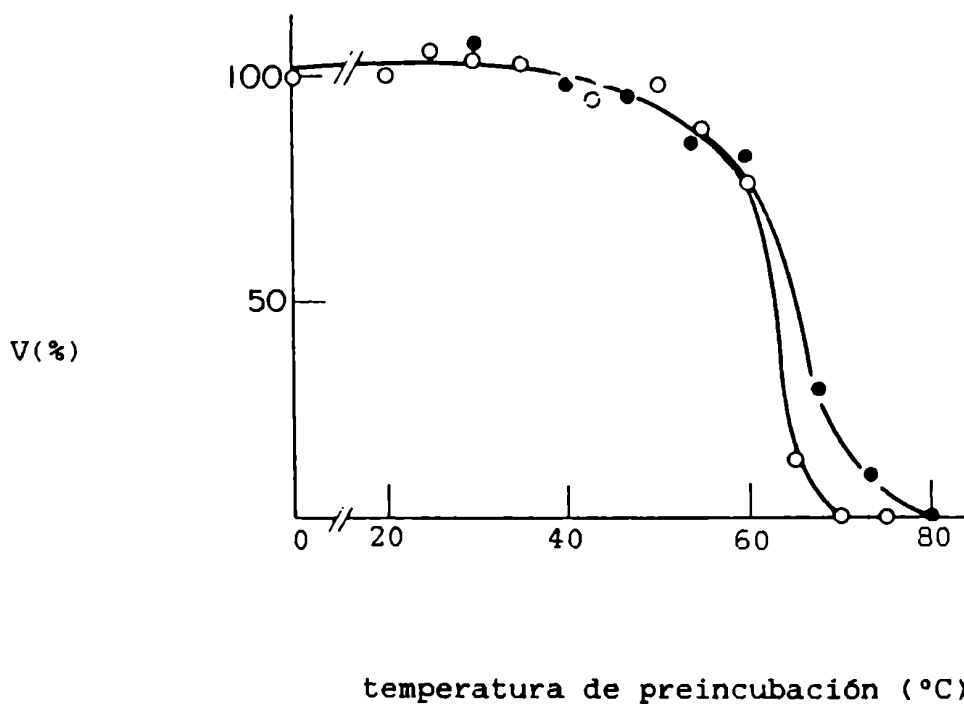
productos de degradación de bajo PM. Una proteólisis parcial se detecta en el caso del fragmento Fab (12b), comportándose la mayor parte de la proteína, en estas condiciones de corrida, como el fragmento inalterado. Debe destacarse que los picos correspondientes a péptidos de bajo PM se encuentran también en el material sin digerir. Confirmando los resultados en SDS-PAGE, el fragmento Fc (12c) es fuertemente degradado, observándose un pico pequeño de Fc no digerido, y un pico principal de PM mucho menor a 20,1 kDa.

De los datos anteriores se deduce que la IgG humana posee varios sitios hidrolizables por la proteínasa. Aunque no se han hecho intentos para identificar las uniones peptídicas hidrolizadas, el patrón general de proteólisis se parece más al de la pepsina que al de la papaína. El presente estudio se realizó a pH 5,0, dado que experimentos preliminares indicaron que la actividad degradativa sobre IgG nativa a pH 7,0 era mucho menor.

Estabilidad térmica y temperatura óptima.

La estabilidad térmica de la proteasa fue bastante alta (Fig. 13a), pues el 50% de la actividad se perdió por preincubación por 10 min a 62°C. La repetición del ensayo con sobrenadante de 105.000 xg como fuente de enzima, dio resultados muy similares, pues el 50% de la actividad se perdió a 64°C. Esta concordancia nuevamente sugiere que en

Figura 13a- Estabilidad térmica de la proteinasa cruda y purificada.



(o) Proteinasa purificada.

(●) Sobrenadante de 105.000 xg.

Las muestras fueron calentadas por 10 min a las temperaturas especificadas en la abcisa. Luego se enfriaron en hielo y se determinó la actividad remanente con azocaseína como sustrato, como se describió en Materiales y Métodos.

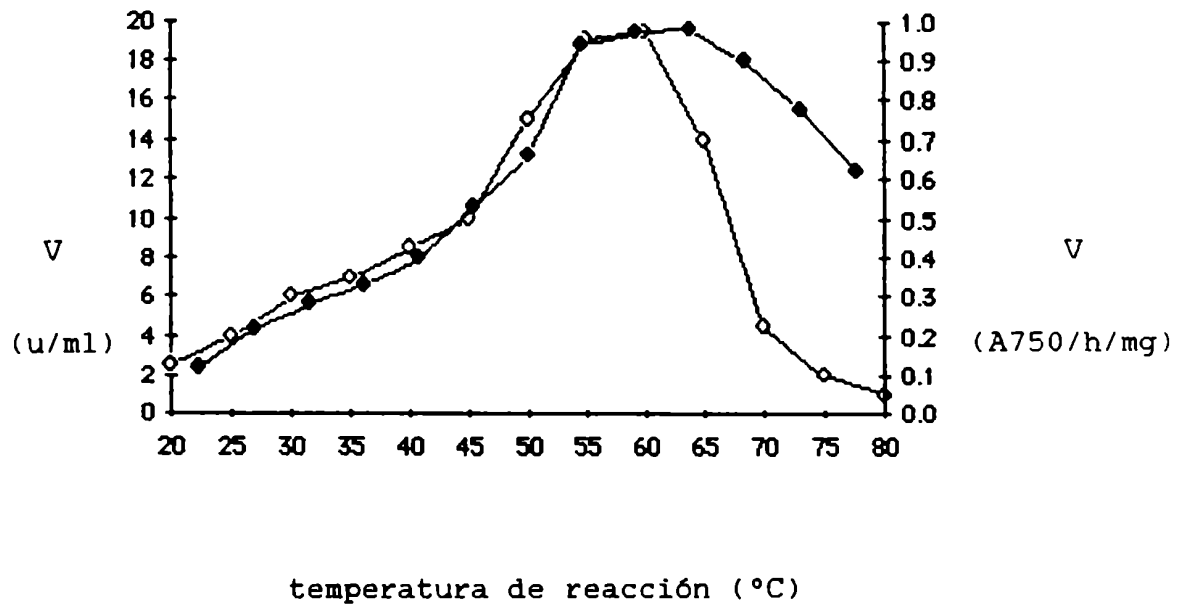
el sobrenadante hay una sola enzima responsable de la actividad con azocaseína. La temperatura "óptima" de la enzima tiene en consideración tanto el aumento de la velocidad de reacción como la desnaturalización térmica de la enzima. Dada la alta estabilidad de la enzima, no fue extraño encontrar una temperatura "óptima" de 60°C (Fig. 13b), muy similar a la detectada en extractos crudos por Itow y Camargo (106).

Inhibidores y activadores.

Se definió I50 como la concentración de inhibidor que logra disminuir 50% la actividad enzimática con azocaseína como sustrato. En la Tabla II figuran los inhibidores más potentes de la proteasa.

El E-64 fue el inhibidor más potente; el valor de I50 presentado (0,07 μM) se obtuvo a tiempos cortos de reacción (15 min) y sin preincubar la enzima con el inhibidor. Este dato tiene sólo valor indicativo, pues el E-64 es un inhibidor irreversible con alta afinidad hacia el SH del sitio activo, y por lo tanto cantidades estequiométricas con la enzima serían capaces de inhibirla completamente. La leupeptina [inhibidor peptídico de origen microbiano (10)] y los compuestos mercuriales (p-CMB, FMA, p-CMPS) son inhibidores característicos de cisteín proteinasas [los últimos forman mercaptidas con los grupos sulfhidrúlicos libres en forma reversible o irreversible (27)], aunque la

Figura 13.b- Temperatura "óptima" de la proteinasa.



Las condiciones experimentales fueron las descritas en Materiales y Métodos.

(o) Proteinasa purificada.

(●) Sobrenadante de 105.000 xg.

Se usaron distintas escalas (izquierda= proteinasa, derecha= sobrenadante) para poder superponer las curvas y facilitar la comparación.

TABLA II. Inhibidores.

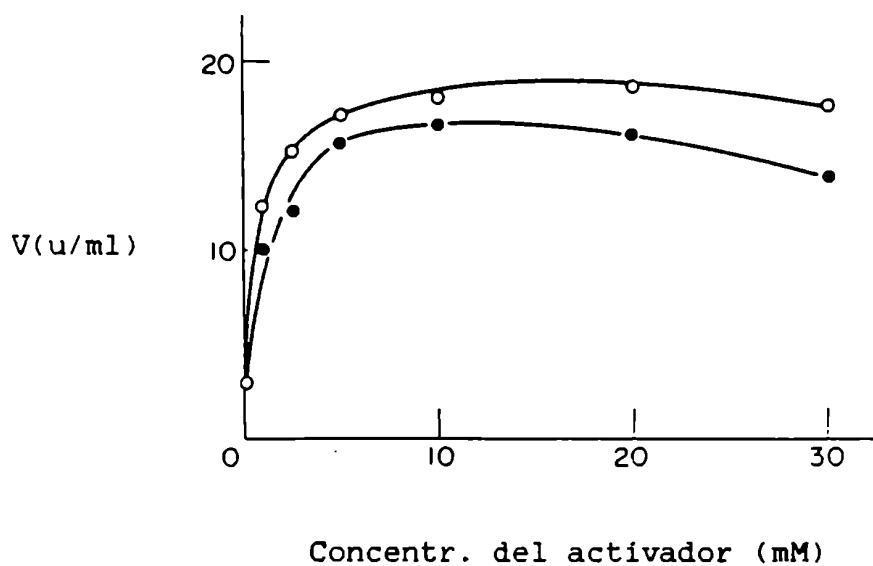
Inhibidor	I ₅₀ (μ M)
E-64	0,07
Leupeptina	0,25
Antipaina	0,75
Quimostatina	1,0
p-CMB	1,0
FMA	1,2
TLCK	1,2
pCMPS	3,0
TPCK	17,0
NEM	300,0

La proteinasa demostró ser poco sensible a DTNB y elastatinal e insensible a Pepstatina A, EDTA y PMSF.

leupeptina no es específica. La sensibilidad de la enzima a la leupeptina fue alta (50% de inhibición con 250 nM). Esto se puede apreciar al comparar con otros organismos: 0,3 mM de leupeptina inhibió 80% de la degradación lisosomal en hepatocitos de rata (95), 0,42 μ M redujo la actividad de las proteinasas de amastigotes de Leishmania m.mexicana al 19% (61), 0,5 μ M inhibió completamente la cisteín proteínasa de PM 30.000 de trypanosomas africanos (120). En un principio se había considerado que la leupeptina afectaba sólo la degradación lisosomal de las proteínas, pero Seglen y col. (165) encontraron que también afectaba la no-lisosomal. El TLCK y el TPCK inhiben tanto a las serín proteinasas (del tipo de la tripsina el primero, y de la quimotripsina el segundo, bloqueando el aminoácido His del sitio activo e impidiendo la fijación del sustrato) como a las cisteín proteinasas [alquilando el grupo tiol activo (209)]. El DTNB, que también puede actuar sobre las cisteín proteinasas, inhibió sólo un 25% a una concentración de 0,5 mM. El HgCl₂ (5 mM) abolió totalmente la actividad enzimática. El PMSF (con especificidad para las serín proteinasas, aunque también capaz de inhibir algunas cisteín proteinasas) apenas inhibió un 10% en una concentración de 10 mM, lo que puede considerarse despreciable, y coincide también con los datos de Itow y Camargo obtenidos con extractos crudos. Estos resultados indican que la enzima

pertenecería al grupo de las cisteín proteinasas, con grupo SH activo. Como consecuencia, sustancias reductoras activarían la enzima. Eso fue lo obtenido (Fig. 14) al tratar la proteinasa con 2-ME y glutatión reducido; la máxima activación se logró en ambos casos con 10 mM. También se probó si 2-ME podía revertir el efecto de alguno de los inhibidores. En la Tabla III se observan los resultados. La actividad enzimática sin 2-ME fue nula debido a la alta concentración de los inhibidores (1,1 mM); sólo se notó actividad remanente al tratar con TPCK. Con 2-ME (20 mM) la actividad fue mayor: el control cuadruplicó su valor y la enzima inhibida por los compuestos mercuriales recuperó, según los casos, entre el 75 y el 97% de su actividad. La enzima tratada con TLCK y TPCK no mostró recuperación de su actividad (salvo la actividad remanente con TPCK, que aumentó menos de 3 veces). Las dos últimas sustancias nombradas efectúan una inhibición de tipo irreversible. El agente quelante de metales EDTA activó 40% la enzima en el rango de concentraciones 1-10 mM. Esta particularidad ya fue registrada en cisteín proteinasas del tipo de la catepsina B (19), y se debería simplemente a la quelación de metales pesados inhibidores. El hecho de que no se produzca inhibición excluye que pueda tratarse de una metaloproteinasa. Estudios recientes (58) indican que la enzima no es inhibida por pepstatina A, inhibidor específico

Figura 14- Activación de la proteinasa por compuestos sulfhidrúlicos.



(○) 2-mercaptoetanol.

(●) glutatión reducido.

La actividad enzimática se determinó en la mezcla de reacción descrita en Materiales y Métodos, excepto por el agregado de 2-ME o glutatión reducido, en las concentraciones que se indican en la abcisa. Se utilizaron 6 μg de proteinasa purificada por determinación.

Resultados y Discusión

TABLA III. Reversión del efecto de inhibidores por 2-mercaptoetanol

Inhibidor	Actividad Enzimática (u/ml)	
	sin 2-ME	con 2-ME
----	0,016	0,063
p-CMB	0	0,048
p-CMPS	0	0,061
FMA	0	0,047
TLCK	0	0
TPCK	0,006	0,016

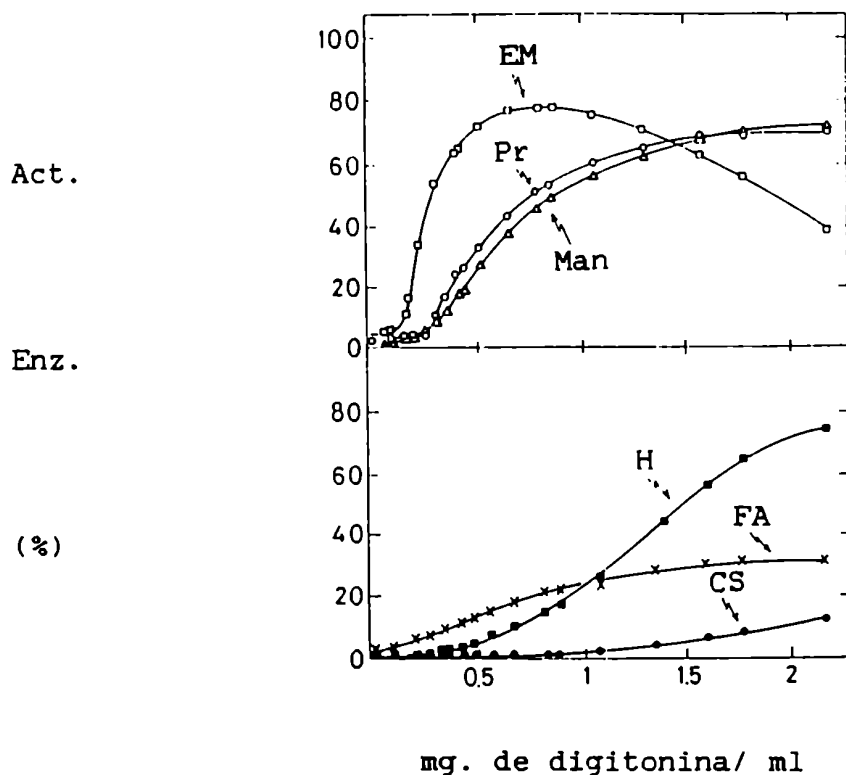
de las aspartil proteinasas como la pepsina. La proteínasa fue bastante susceptible a la inhibición por sueros. Los obtenidos de ratón, conejo y humano inhibieron más del 96% en concentraciones del 42%. El suero fetal bovino al 6% inhibió el 93 % de la actividad. Es conocido que en suero existen distintos factores capaces de inhibir proteinasas: alfa 1-inhibidor de proteinasas, antiquimotripsina, antitrombina III, alfa 2-macroglobulina (192,82).

Localización intracelular.

a) Tratamiento de células enteras con digitonina.

Los resultados de un experimento representativo se presentan en la Fig. 15. La CS, marcador de mitocondrias, se liberó con altas concentraciones de digitonina, y en el último punto del experimento sólo el 12% de la actividad total se recuperó en el sobrenadante. La EM II activable por aspartato, de ubicación citosólica, es la primera en alcanzar altos valores en el sobrenadante. Luego el porcentaje de actividad enzimática en el sobrenadante desciende, pese a que con concentraciones de digitonina crecientes el sobrenadante recibiría el aporte de la EM I, liberada de mitocondrias (ver curva de CS). El hecho de que esta última enzima no sea activable por aspartato sólo reduciría su contribución a la sumatoria final. La caída de la curva a concentraciones de digitonina crecientes se puede

Figura 15- Ubicación subcelular. Tratamiento con digitonina.



Actividad de diferentes enzimas en sobrenadantes de epimastigotes enteros tratados con digitonina como se describió en Materiales y Métodos.

(o) cisteín proteínasa, (Δ) alfa-manosidasa, (\square) enzima mállica activada por L-aspartato, (\bullet) citrato sintasa, (\blacksquare) hexoquinasa, (x) fosfatasa ácida. En cada determinación se usaron 125 mg de células (peso húmedo) /ml (equivalente a 10,5 mg de proteína/ ml).

atribuir al efecto inhibitor que esta sustancia tiene sobre la enzima (47). La fosfatasa ácida (bolsillo flagelar) comenzó a ser extraída a concentraciones bajas de digitonina (0,1-0,25 mg de digitonina/ml), pero aún a las mayores concentraciones probadas presentó la mayoría de su actividad en el precipitado. Las curvas de HK (glicosoma), Man (lisosomas) y proteinasa están ubicadas entre las de las enzimas nombradas. Las tres curvas llegan a un 72% de su actividad enzimática con la máxima concentración de digitonina probada. Pero la diferencia principal es que la HK alcanza el 60% a una concentración mayor de 1,5 mg de digitonina/ml, mientras que la Man y la proteinasa alcanzan ese porcentaje con 1,1 mg digitonina/ml. De estos datos se deduce que la proteinasa se encuentra ubicada, con la alfa manosidasa, en una organela cuya membrana es más sensible a la digitonina que las membranas glicosomal y mitocondrial.

b) Centrifugación diferencial y latencia.

En la Tabla IV se observa la distribución de la proteína total y de las distintas enzimas en las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial. Las actividades enzimáticas en la fracción S reflejan la fragilidad de las distintas partículas a las condiciones de ruptura y fraccionamiento. Como era de esperarse, la enzima málica activable por aspartato, de ubicación citosólica, se halla en su casi totalidad en el sobrenadante. Las partículas que engloban a

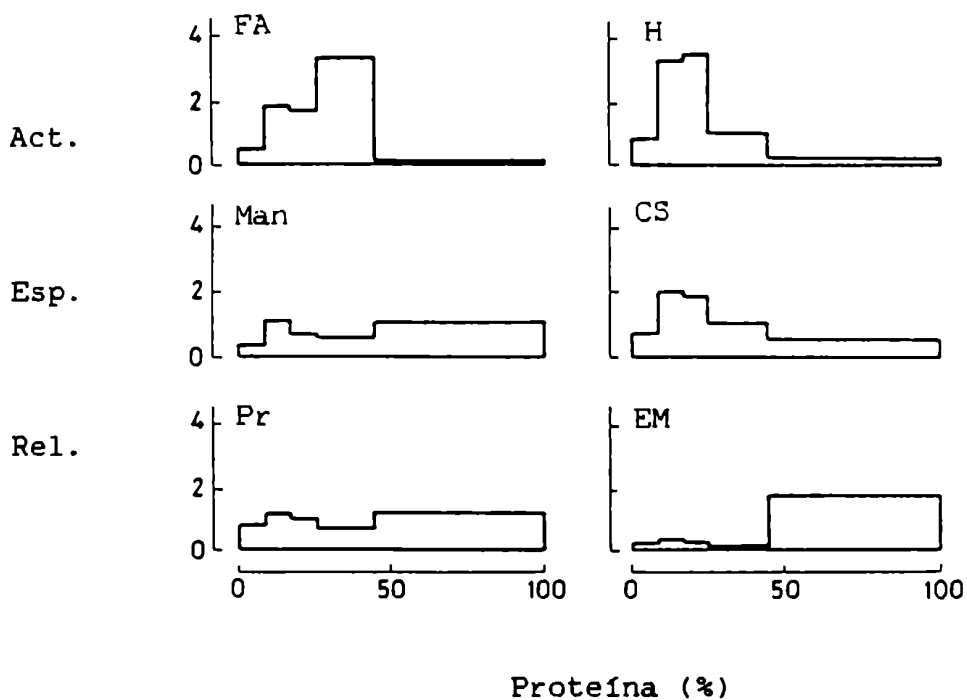
TABLA IV. Distribución de proteínas y enzimas en fracciones de epimastigotes de T.cruzi obtenidas por centrifugación diferencial

Enzima	Distribución en las fracciones (%)					Recuper. (%)
	N	GG	GP	M	S	
Proteína	9,0	7,3	8,4	19,3	55,9	96
Proteinasa	6,3	7,8	7,1	11,5	67,3	104
α -manosidasa	4,1	8,2	6,4	13,2	68,1	74
Fosfatasa ácida	4,1	12,3	14,1	64,7	5,0	80
Hexoquinasa	7,7	24,8	29,4	20,4	17,7	115
Citrato sintasa	7,4	15,6	17,5	22,6	36,8	73
EM (act. por aspartato)	1,8	2,0	1,8	1,9	92,4	90

Las distribuciones están expresadas como el porcentaje de la suma de las cinco fracciones. La recuperación representa la suma de las actividades (o cantidad de proteína) en las cinco fracciones como porcentaje de la actividad (o cantidad de proteína) inicial en el homogenato original, que se toma como 100%.

la fosfatasa ácida, al contrario, fueron bastante resistentes a las condiciones de ruptura y centrifugación (apenas 5% de la actividad total en el sobrenadante). Los glicosomas (hexoquinasa) y las vesículas mitocondriales reselladas (citrato sintasa) demuestran ser un poco más sensibles (17,7 y 36,8%, respectivamente). La proteinasa y la alfa-manosidasa se encuentran en organelas más frágiles aún, pues más de los 2/3 de la actividad total es liberada al sobrenadante. Las actividades enzimáticas en el resto de las fracciones reflejan actividades particuladas. Debido a la heterogénea distribución de la proteína en las mismas, las solas medidas de actividad enzimática en la Tabla IV no expresa fielmente el enriquecimiento de cada fracción en una determinada clase de partícula. Por esa razón, se decidió recurrir a la Actividad Específica Relativa de cada fracción, que se define como la relación entre el porcentaje de actividad enzimática en esa fracción y el porcentaje de la proteína total que se halla en la misma fracción. Una actividad específica relativa de 1 implica una relación de enzima a proteína similar a la existente en el material de partida de la centrifugación diferencial (homogenato total). En la Fig. 16 se grafica actividad específica relativa de cada fracción versus el porcentaje de proteína acumulada. El área de cada fracción es la representación gráfica del porcentaje de actividad que ya se presentó en la Tabla IV.

Figura 16- Distribución de distintas enzimas de epimastigotes de T.cruzi en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial.



Las fracciones están graficadas de izquierda a derecha según su orden de obtención: nuclear (N), gránulos grandes (GG), gránulos pequeños (GP), microsomal (M) y sobrenadante final (S). La ordenada representa la actividad específica relativa (porcentaje de actividad total/ porcentaje de proteína total). La abcisa indica el porcentaje de proteína total acumulado.

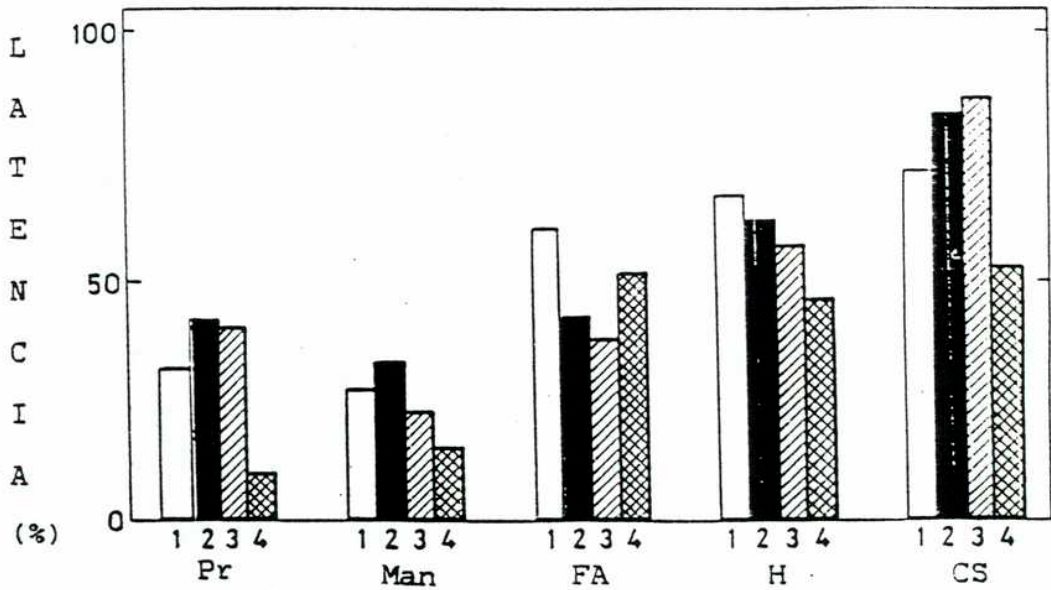
Se observa que la proteinasa, la hexoquinasa, la citrato sintasa y la alfa-manosidasa tienen un comportamiento similar: la mayor actividad específica particulada está en las fracciones GG y GP. El pico para la enzima málica está en la fracción S, mientras que la fracción M es la más enriquecida en fosfatasa ácida.

En la Fig. 17 se grafica la latencia estructural de las enzimas en las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial. Se observa que tanto la proteinasa como la alfa manosidasa presentaron latencia, siendo mayor en la fracción de gránulos grandes. Las máximas latencias (42 y 33%, respectivamente) fueron menores que las obtenidas con la fosfatasa ácida (38-60 %), hexoquinasa (47-67 %) o citrato sintasa (53-88 %).

c) Ultracentrifugación en gradiente isopícnico de sacarosa.

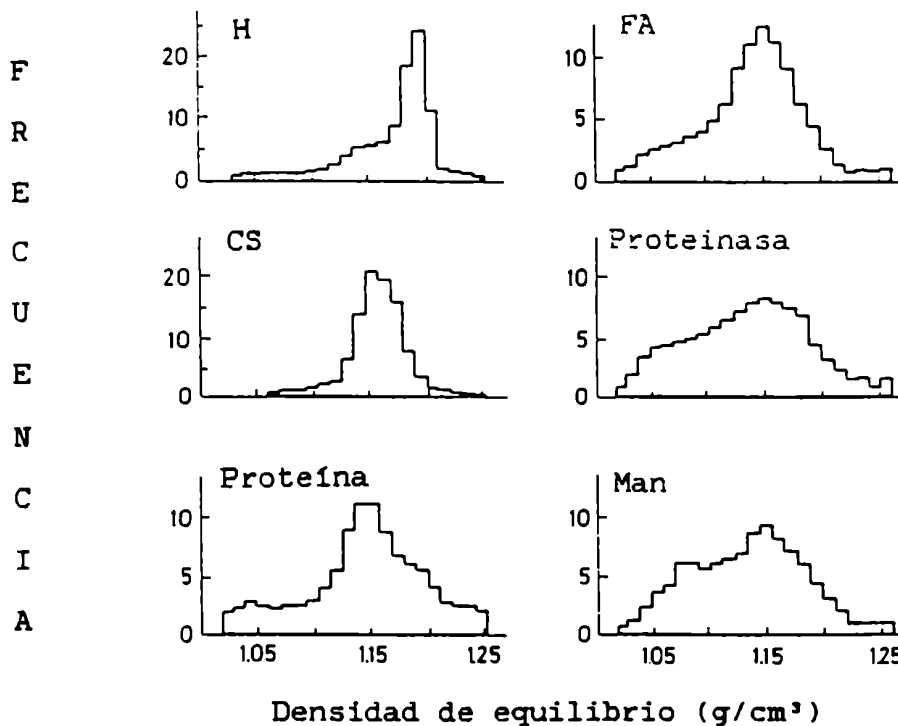
La Fig. 18 presenta los resultados de un experimento representativo en el que la fracción de "gránulos grandes y pequeños", obtenida por molienda de epimastigotes con Crystalon, fue sometida a ultracentrifugación en un gradiente isopícnico de sacarosa. Se observa que tanto la proteinasa como la alfa manosidasa tienen perfiles similares, bandeando a una densidad de equilibrio de 1,16 g/cm³, con un hombro ancho hasta 1,07. El marcador mitocondrial, citrato sintasa, tuvo su pico también a 1,16 g/cm³. Debe tenerse en cuenta que la mitocondria única de

Figura 17- Latencia estructural de diferentes enzimas de epimastigotes de T.cruzi en fracciones obtenidas por centrifugación diferencial.



1, 2, 3, y 4 corresponden respectivamente a las fracciones N, GG, GP y M. La latencia fue determinada como se describió en Materiales y Métodos.

Figura 18- Centrifugación isopícnica en gradiente de sacarosa de las fracciones de gránulos grandes y pequeños de epimastigotes de T.cruzi rotos por molienda con carburo de silicio.



El % de recuperación (suma de las determinaciones de actividad o de contenido proteico en todas las fracciones, referido a la determinación en la muestra sembrada, tomada como 100%) fue de 140% (proteína), 120% (proteínasa), 97% (alfa-manosidasa), 93% (fosf. ácida), 141% (citrato sintasa) y 71% (hexoquinasa).

los trypanosomas se fragmenta durante la molienda, y las partículas que bandean en el gradiente son vesículas reselladas que mantuvieron en su interior las enzimas mitocondriales (46). La fosfatasa ácida, enzima marcadora del bolsillo flagelar, presenta un pico de actividad muy cercano a los dos anteriores ($1,15 \text{ g/cm}^3$), pero la curva cae más abruptamente a densidades menores. El pico del marcador glicosomal hexoquinasa se ubicó en una densidad de $1,20$. Estos datos concuerdan con los de trabajos anteriores (46). Los porcentajes de recuperación indicados en la leyenda de la Fig. 18 fueron también similares a los obtenidos en otros trabajos para este tipo de experimento (46,47,179). Los resultados sugieren que la ubicación de la cisteín proteinasa y la alfa manosidasa es lisosomal. La densidad de equilibrio del pico principal ($1,16 \text{ g/cm}^3$) es igual a la encontrada por Opperdoes y Steiger (138) para los lisosomas de T.b.brucei.

Discusión General.

1) Ubicación de la enzima en estudio entre las peptidasas.

Por actuar sobre sustratos como azocaseína, seroalbúmina, hemoglobina, fibrinógeno, e Ig G, la enzima en estudio se puede incluir dentro de las endopeptidasas o proteinasas, según la nomenclatura propuesta por Barrett (21). El patrón de inhibidores y activadores, indica que pertenece al grupo

de las cisteín proteinasas (EC 3.4.22) (128). En este grupo se hallan las enzimas papaína, bromelaína, ficina y las catepsinas, así como el grupo de cisteín proteinasas trypanosomales recientemente llamadas "trypanopainas" por Lonsdale-Eccles y Mpimbaza (120). Estas enzimas presentan un peso molecular en el rango 20-30 kDa. El peso molecular de la enzima en estudio, 60 kDa, es apreciablemente mayor, pero es similar al de la "catepsina B" de Artemia (144). La papaína es el prototipo de las cisteín proteinasas. En su molécula, Cys-25, nucleofílico, está en una grieta cerca de His-159. Estos dos aminoácidos actúan concertadamente para atacar uniones susceptibles. Estudios recientes (58) demostraron que comparando la secuencia de 32 aminoácidos del extremo N terminal (que contiene a Cys-25) y 14 de un péptido tríptico interno de la proteínasa de T.cruzi, con las secuencias correspondientes de la papaína y la catepsina L de mamíferos, se observa un 65% de identidad. Estos datos demuestran sin lugar a dudas que la enzima en estudio pertenece a la superfamilia de la papaína, y presenta rasgos en común con algunas catepsinas. Está de acuerdo con esta comparación su naturaleza glicoproteica, su ubicación lisosomal y su respuesta a inhibidores y activadores. Los primeros informes sobre catepsinas dan cuenta de una pérdida parcial de actividad a pH mayor de 7,5 y total a pH 8 (18,83). Sin embargo, posteriores estudios demostraron que

las catepsinas B y H pueden exhibir considerable actividad a un pH tan alto como 8 (203). Este es también el caso de las "trypanopainas" de trypanosomas africanos, actuando con fibrinógeno como sustrato (120).

2) Comparación con otras proteinasas de T.cruzi

-Comparando con el trabajo de Itow y Camargo de 1977 (106) encontramos coincidencias con una de las cuatro enzimas estudiadas. El pH óptimo es ácido, su temperatura óptima es 60°C, es inhibida por TLCK, y el PMSF no altera su actividad. Estos autores no profundizaron más en su estudio.

-El trabajo de Bongertz y Hungerer de 1978 (31) informa de la purificación y estudio de una enzima que hidroliza BAPA. Itow y Camargo ya habían atribuido a enzimas diferentes las actividades sobre azocaseína y sobre BAPA. Confirmando lo precedente, la proteinasa en estudio purificada no hidrolizó BAPA ni otras p-nitroanilidas no substituídas en el grupo -NH₂ del aminoácido, aunque sí es capaz de hidrolizar CBZ-Arg-Arg-O Me-β-naftilamida, Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanilida y Bz-Pro-Phe-Arg-p-nitroanilida (J. Martínez, M.C. Cazzulo Franke y J.J. Cazzulo, resultados no publicados).

-De las cinco proteasas descritas por Avila y col. en 1979 (13) sólo la peptidasa II hidrolizó un sustrato usado para caracterizar las catepsinas B (17). De todos modos, al no ser

activada por cisteína ni 2-ME, no puede ser considerada una cisteín proteínasa.

-Rangel y col., en 1981, (153) caracterizaron una proteínasa con varios puntos en común con la estudiada por nosotros: tiene pH óptimo 3 con hemoglobina como sustrato, su peso molecular es 60.000, es clasificable como cisteín proteínasa (activación por 2-ME, inhibición por mercuriales, reversión de la inhibición por 2-ME). Las diferencias entre ambas enzimas también son importantes: la estudiada por Rangel no utilizó seroalbúmina como sustrato, y no fue inhibida por TLCK ni TPCK (frente a inhibición irreversible del 50% con concentraciones de 1,2 y 17 μ M, respectivamente, en nuestro caso). Esta enzima está localizada en superficie, según se determinó por microscopía óptica y electrónica, no habiéndose presentado evidencias de una localización lisosomal, como en nuestro caso. -Recover y Piras, en 1983 (154), detectaron actividad proteásica en trypomastigotes y epimastigotes enteros con características muy similares a la descrita en este trabajo, en cuanto a rango de inhibidores y activadores y sustratos hidrolizados, pero difiere en su pH óptimo. Los autores no purificaron la proteínasa o proteínasas responsables de esa actividad. La enzima estudiada en este trabajo sería la previamente descrita en extractos crudos por Itow y Camargo (106), Torruella y col. (191) y Cazzulo y Franke de Cazzulo (54).

3) Posibles funciones de la proteinasa.

Uno de los aspectos más importantes de esta proteinasa resta por ser investigado: el de su función dentro del metabolismo celular. Como se comentó en Metabolismo de Proteínas, puede participar en la digestión de proteínas endógenas (a), exógenas (b), en la penetración- adhesión (c) o en el escape a la respuesta inmune (d).

(a) En el caso que la proteinasa en estudio cumpliera esta función, no sería la única enzima involucrada, porque hay evidencia de una baja actividad a pH 6,5- 7, que se registra en sobrenadante de 1.000 xg y no en sobrenadante de 105.000 xg (54). En célula de mamífero hay dos rutas principales de degradación de proteínas: el camino lisosomal, responsable de una degradación en masa, no selectiva; y el camino no-lisosomal, que degrada proteínas en forma preferencial, por ejemplo, proteínas anormales o de vida corta (165,91,134,110). El primero es sensible a inhibidores (136,166), al contrario del segundo. En el primer caso, el citoplasma entraría al aparato vacuolar al menos por dos rutas. La macroautofagia (66) consistiría en la segregación de porciones discretas del citoplasma, incluyendo organelas enteras, dentro de una estructura limitada por membrana (la vacuola autofágica). Esta adquiriría enzimas hidrolíticas por fusión con cuerpos densos. La microautofagia (137,127,7) procedería a través de invaginaciones de la

membrana lisosomal, la consiguiente formación de vesículas intralisosomales y su digestión.

(b) Otra posible función de la proteinasa es la de aprovechar el sustrato exógeno. En ese sentido el bolsillo flagelar podría jugar un papel clave. Como se mencionó en Ultraestructura, en esa zona podría producirse la entrada a la célula de proteínas del medio. Aunque el parásito no parece secretar cantidades importantes de nuestra proteinasa al medio, el bolsillo flagelar podría ser por su relativo aislamiento un lugar propicio para la digestión previa de sustancias.

Por su ubicación lisosomal, la proteinasa estaría en óptimas condiciones para aprovechar inmunoglobulinas del medio internalizadas por endocitosis mediada por receptor (176).

(c) Andrews y Colli (8) demostraron inhibición de la adhesión e internalización de T.cruzi al preincubar con suero fetal bovino. Piras y col. (147) sugirieron que enzimas proteolíticas jugarían un papel fundamental en el proceso de adhesión parásito- huésped. Entre los inhibidores que lograron disminuir la adhesión figuran PMSF, leupeptina y TLCK. Varias proteasas de otros orígenes pudieron simular el efecto de la proteasa endógena. Araujo-Jorge y col. (11) demostraron inhibición de la penetración de trypomastigotes a fibroblastos y macrófagos por alfa-2-macroglobulina e inhibidores de tripsina de

poroto de soja. La proteasa (o proteasas) involucrada debería ser fácilmente secretable al medio, o directamente estar en la superficie del parásito. Hasta el momento hay dos informes sobre existencia de proteasas en la membrana del T.cruzi (153,154). La proteinasa debería ejercer su acción de forma rápida y directa, dada la presencia de los factores inhibitorios del suero. La proteinasa en estudio es sensible a leupeptina, TLCK y suero humano. Queda por saber si la enzima, que ha sido detectada recientemente en trypomastigotes, tanto por determinación de actividad en geles de poliacrilamida conteniendo fibrinógeno, como por detección inmunológica en "Western blots" de extractos totales del parásito (O. Campetella, J. Martínez y J.J. Cazzulo, FEMS Microbiol. Lett., en prensa), está involucrada de alguna manera en la invasión de las células del huésped.

(d) Si se demostrara el mecanismo de Fabulación en trypomastigotes de la cepa Tul 2, la proteinasa en estudio podría jugar un papel, dado que hidroliza Ig G humana preferencialmente en la zona del fragmento Fc.

CONCLUSIONES.

Se purificó hasta homogeneidad proteica una proteinasa a partir de epimastigotes de la cepa Tul 2 de Trypanosoma cruzi, y se determinaron sus principales propiedades:

- es una enzima monomérica de peso molecular aproximado de 60.000.
- es una glicoproteína, con una porción glucídica probablemente considerable, pues da positiva la reacción con reactivo de Schiff.
- es capaz de actuar sobre diversos sustratos, como caseína, seroalbúmina bovina, hemoglobina, inmunoglobulina humana, y proteína soluble del propio parásito, con pH óptimo ácido.
- tiene una estabilidad térmica considerable y, en consecuencia, una alta temperatura "óptima".
- por la sensibilidad a distintos inhibidores, por sus activadores, y por la reversión de la inhibición que efectúan algunos activadores, es una cisteín proteinasa.
- está localizada en los lisosomas del parásito.

Se puede concluir por los datos anteriores que estamos en presencia de una enzima perteneciente a la superfamilia de la papaína y con características comunes con algunas catepsinas, como la catepsina L de mamíferos.

BIBLIOGRAFIA.

- 1-Abalos J.W. (1972) Distribución de vectores en Argentina. Simposio Internac. Enf. de Chagas. 347.
- 2-Abelha J., Azevedo M.O., Teixeira A.R. (1981) Trypanosoma cruzi: antigen- receptor mediated endocytosis of antibody. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 76,213-225.
- 3-Aeberhard E.E., Moretti E.R., Basso B., Lema M.G., Bronia D.I.H. (1980) Biosíntesis de lípidos en T.cruzi. Medicina (Bs. As.) 40 (Supl.1), 165-170.
- 4-Affranchino J.L., de Tarlovsky M.N.S., Stoppani A.O.M. (1985) Respiratory control in mitochondria from T.cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. 16,289-298.
- 5-Agosin M., Náquira C., Capdevila J., Paulin J. (1976 a) Hemoproteins in T.cruzi with emphasis on microsomal pigments. Int. J. Biochem. 7,585-594.
- 6-Agosin M., Náquira C., Paulin J., Capdevila J. (1976 b) Cytochrome P-450 and drug metabolism in T.cruzi: effects of phenolbarbitol. Science 194,195-197.
- 7-Ahlberg J., Henell F., Glaumann H. (1982) Exp. Cell Res. 142,373-383.
- 8-Andrews N.W., Colli W. (1982) Adhesion and interiorization of T.cruzi in mammalian cells. J. Protozool. 29,264-269.
- 9-Andrews P. (1965) The gel filtration behaviour of

proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem. J. 96,595-606.

10-Aoyagi T.A., Umezawa H. (1975) Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin. En 'Proteases and Biological Control'. Ed. E. Reich, D.B. Rifkin, E. Shaw. New York. Cold Spring Harbor Lab. 429-454.

11-Araujo-Jorge T.C.de, Sampaio E.P., de Souza W. (1986) T.cruzi: Inhibition of host cell uptake of infective bloodstream forms by alpha-2-macroglobulin. Z. Parasitenkd 72,323-329.

12-Avila J.L., Bretaña A., Casanova M.A., Avila A., Rodríguez F. (1979 a) T.cruzi: defined medium for continuous cultivation of virulent parasites. Exp. Parasitol. 48,27-35.

13-Avila J.L., Casanova M.A., Avila A., Bretaña A. (1979b) Acid and neutral hydrolases in T.cruzi. Characterization and assay. J. Protozool. 26 (2),304-311.

14-Azevedo H.P. de, Roitman I. (1977) Growth of the Y strain of T.cruzi in an HX25- modified defined medium. J. Parasitol. 63,485.

15-Azevedo H.P., Roitman I. (1980) Requirements of amino acids and vitamins by T.cruzi. VII. Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambú, M.G., Brazil.

16-Bacchi C.J. (1981) Content, synthesis and function of polyamines in trypanosomatids: relationship to

- chemotherapy. J. Protozool. 28,20-27.
- 17-Barrett A.J. (1969) Properties of lysosomal enzymes, in Dingle J.T., Fell H.B., eds., Lysosomes in Biology and Pathology, North Holland Publ. Co., Amsterdam, 2,245-312.
- 18-Barrett A.J. (1972) A new assay for cathepsin B1 and other thiol proteinases. Anal. Biochem. 47,280-293.
- 19-Barrett A.J. (1973) Human cathepsin B1. Purification and some properties of the enzyme. Biochem. J. 131,809-822.
- 20-Barrett A.J. (1977) Proteinases in mammalian cells and tissues. Elsevier. Amsterdam.
- 21-Barrett A.J. (1980) The classification of proteinases. In Protein Degradation in health and disease (Ciba Foundation Symposium 75)(edited by Evered D. and Whelan J.) 1-13, Amsterdam: Excerpta Medica.
- 22-Barrett A.J., Kirschke H. (1981) Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L. Meth. Enzymol. 80,535-561.
- 23-Barros E.G., Caldas R.A. (1983) Partial purification and characterization of glutamic- piruvic transaminase from T.cruzi. Comp. Biochem. Physiol. 74 B,449-452.
- 24-Bash-Lewinson D., Grossowicz N. (1957) Transaminases of T.cruzi. Bull. Res. Counc. Israel. 6E,91-92.
- 25-Baumstark J.S. (1981) in Electrophoresis' 81: Advanced Methods, Biochem. and Clinical Applications (Allen R.C. and Arnaud P., eds.) 685-691, de Gruyter, Berlin.

- 26-Beaufay H., Jacques S.P., Baudhuin P., Sellinger O.Z., Berthet J., de Duve C. (1964) Tissue fractionation studies. 18. Resolution of mitochondrial fractions from rat liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of density equilibration in various gradients. *Biochem. J.* 92,184-201.
- 27-Benesch R., Benesch R.E. (1962) Determination of -SH groups in proteins. *Methods Biochem. Anal.* 10,43-70.
- 28-Bensadoun A., Weinstein D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* 70,241-250.
- 29-Berens R.L., Marr J.J., La Fon S.W., Nelson D.J. (1981) Purine metabolism in T.cruzi. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3,187-196.
- 30-Boiso J.F.de, Stoppani A.O.M. (1973) The mechanism of acetate and pyruvate oxidation by T.cruzi. *J. Protozool.* 20,673-678.
- 31-Bongertz V., Hungerer K.D. (1978) T.cruzi: isolation and characterization of a protease. *Exp. Parasitol.* 45,8-18.
- 32-Bosch M., Trombetta S., Parodi A.J. (1988) Synthesis of dolichol derivatives and protein glycosylation in trypanosomatids. *Bioch. Soc. Trans.* 16(3),268-271.
- 33-Boveris A., Docampo R., Turrens J.F., Stoppani A.O.M. (1978) Effect of beta-lapachone on superoxide anion and

- hydrogen peroxide production in T.cruzi. Biochem. J. 175,431-439.
- 34-Boveris A., Sies H., Martino E.E., Docampo R., Turrens J.F., Stoppani A.O.M. (1980) Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in T.cruzi. Biochem. J. 188,643-648.
- 35-Bowers W.E., de Duve C. (1967) Lysosomes in lymphoid tissue. II. Intracellular distribution of acid hydrolases. J. Cell Biol. 32,339-348.
- 36-Bowman I.B.R., Tobie E.J., von Brand Th. (1963) CO₂ fixation studies with the culture form of T.cruzi. Comp. Biochem. Physiol. 9,105-112.
- 37-Brack C. (1968) Elektron mikroskopische untersuchungen zum Lebenszyklus von T.cruzi. Unter besonderes Berücksichtigung der etwicklungsformen im Überträger Rhodnius prolixus. Acta Tropica (Basel) 25,289-356.
- 38-Brener Z. (1973) Biology of T.cruzi. Annu. Rev. Microbiol. 27,347-382.
- 39-Bretaña A., O'Daly J.A. (1976) Uptake of fetal proteins by T.cruzi. Immunofluorescence and ultrastructural studies. Int. J. Parasitol. 6,379-386.
- 40-Brewer F., Bhattacharyya L., Brown R.D., Koenig S.H. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 127,1066-1071.
- 41-Bricker J., Mulks M.H., Plaut A.G., Moxan E.R., Wright A. (1983) IgA1 proteases of Haemophilus influenzae: cloning

- and characterization in Escherichia coli K12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80,2681-2685.
- 42-Bronia D.I.H., Montamat E.E., Aeberhard E.E., Segura E.L. (1978) Fosfolípidos y otros componentes lipídicos de T.cruzi. Estudio comparativo en cepas Tulahuén, E.S. y Brasil. Medicina (Bs. As.) 38,255-258.
- 43-Caldas R.A., Araujo E.F., Felix C.R., Roitman I. (1980) Incorporation of ammonium in aminoacids by T.cruzi. J. Parasitol. 66,213-216.
- 44-Camargo E.P., Coelho J.A., Moraes G., Figueiredo E.N. (1978) Trypanosoma spp., Leishmania spp. and Leptomonas spp.: enzymes of ornithine- arginine metabolism. Exp. Parasitol. 46,141-144.
- 45-Cannata J.B., Frasch A.C.C., Cataldi de Flombaum M.A., Segura E.L., Cazzulo J.J. (1979) Two forms of 'malic' enzyme with different regulatory properties in T.cruzi. Biochem. J. 184,409-419.
- 46-Cannata J.J.B., Valle E., Docampo R., Cazzulo J.J. (1982) Subcellular localization of phosphoenol pyruvate carboxykinase in the trypanosomatids T.cruzi and Crithidia fasciculata. Mol. Biochem. Parasitol. 6,151-160.
- 47-Cannata J.J.B., Cazzulo J.J. (1984) Glycosomal and mitochondrial malate dehydrogenases in epimastigotes of T.cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. 11,37-49.
- 48-Carneiro V.T.C., Caldas R.A. (1983) Regulatory studies

- of L-glutamate dehydrogenase from T.cruzi epimastigotes. Comp. Biochem. Physiol. 75B,61-64.
- 49-Cataldi de Flombaum M.A., Cannata J.J.B., Cazzulo J.J., Segura E.L. (1977) Carbon- dioxide- fixing enzymes in T.cruzi. Comp. Biochem. Physiol. 58B,67-70.
- 50-Cataldi de Flombaum M.A., Frasc A.C.C., Stoppani A.O.M. (1980) Adenosine triphosphatase from T.cruzi: purification and properties. Comp. Biochem. Physiol. 65B,103-110.
- 51-Cazzulo J.J., Juan S.M., Segura E.L. (1977) Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in T.cruzi. Comp. Biochem. Physiol. 56B,301-303.
- 52-Cazzulo J.J., Franke de Cazzulo B.M., Higa A.I., Segura E.L. (1979) NAD- linked glutamate dehydrogenase in T.cruzi. Comp. Biochem. Physiol. 64B,129-133.
- 53-Cazzulo J.J., Valle E., Docampo R., Cannata J.J.B. (1980) Intracellular distribution of carbon dioxide- fixing enzymes in T.cruzi and Crithidia fasciculata. J. of Gen. Microbiol. 117,271-274.
- 54-Cazzulo J.J., Franke de Cazzulo B.M. (1982) Proteolytic activity on endogenous substrates in cell-free extracts of T.cruzi. Experientia 38,1.335-1.337.
- 55-Cazzulo J.J., Franke de Cazzulo B.M., Engel J.C., Cannata J.J.B. (1985) End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. Mol. and Biochem. Parasitol. 16,329-343.

- 56-Cazzulo J.J., Arauzo S., Franke de Cazzulo B.M., Cannata J.J.B. (1988) On the production of glycerol and L-alanine during the aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FEMS Microbiol. Lett.* 51,187-192.
- 57-Cazzulo J.J., Nowicki C., Santome J.A., Wernstedt Ch., Hellman U. (1988) Amino acid composition and N-terminal sequence of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from T.cruzi. *FEMS Microb. Lett.* 56,215-220.
- 58-Cazzulo J.J., Couso R., Raimondi A., Wernstedt Ch., Hellman U. (1989) Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from T.cruzi. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33,33-42.
- 59-Cazzulo J.J., Hellman U., Couso R., Parodi A.J.A. (1990) Amino acid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from T.cruzi. Absence of phosphorylated mannose residues. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 38,41-48.
- 60-Colbeau A., Nachbaur J., Vignais P.M. (1971) Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 249,462-492.
- 61-Coombs G.H., Hart D.T., Capaldo J. (1982) Proteinase inhibitors as antileishmanial agents. *Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg.* Vol. 76 (5),660-662.
- 62-Cross G.A.M., Klein R.A., Baker J.R. (1975 a) T.cruzi: growth, amino acid utilization and drug action in a defined

medium. Ann. Trop. Med. Parasit. 69,513-514.

63-Cross G.A.M., Klein R.A., Linstead D.J. (1975 b) Utilization of amino acids by T.brucei in culture: L-threonine as a precursor for acetate. Parasitology 71, 311-326.

64-Chang S.L. (1948) Studies on hemoflagellates. IV. Observation concerning some biochemical activities in culture, and respiration in three species of Leishmania and T.cruzi. J. Infect. Dis. 82,109-118.

65-Charney J., Tomarelli R.M. (1947) A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. J. Biol. Chem. 171,501-505.

66-de Duve C., Wattiaux R. (1966) Functions of lysosomes. Annu. Rev. Physiol. 28,435-492.

67-De Souza W., Carvalho T.U., Benchimol M., Chiari E. (1978) T.cruzi: ultrastructural, cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake. Exp. Parasitol. 45,101-115.

68-De Souza W. (1984) Cell biology of T.cruzi. Int. Rev. Cytol. 86,197-283.

69-Delain E., Riou G. (1969) Ultrastructure de DNA du kinetoplaste de T.cruzi cultivé in vitro. Compt. Rend. Acad. Sc. Paris 268,1225-1227.

70-Diezel W., Kopperschlager G., Hofmann E. (1972) An improved procedure for protein staining in polyacrylamide

- gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue. Anal. Biochem. 48,617-620.
- 71-Docampo R., Boiso J.F.de, Boveris A., Stoppani A.O.M. (1976) Localization of peroxidase activity in T.cruzi microbodies. Experientia (Basel) 32,972-975.
- 72-Docampo R., Boiso J.F.de, Boveris A., Stoppani A.O.M. (1976 a) Localization of peroxidase activity in T.cruzi microbodies. Experientia (Basel) 32,972-975.
- 73-Docampo R., Cruz F.S., Boveris A., Muñiz P.R.A., Esquivel D.M.S. (1978 a) Lipid peroxidation and the generation of free radicals, superoxide anion and hydrogen peroxide in beta- lapachone- treated T.cruzi epimastigotes. Arch. Biochem. Biophys. 186,292-297.
- 74-Docampo R., Boiso J.F.de, Stoppani A.O.M. (1978 b) Tricarboxylic acid cycle operation at the kinetoplast-mitochondrion complex of T.cruzi. Biochim. Biophys. Acta. 502,466-476.
- 75-Docampo R., Stoppani A.O.M. (1979) Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by Nifurtimox in T.cruzi. Arch. Biochem. Biophys. 197,317-331.
- 76-Engel J.C. (1983) Caracterización de clones de T.cruzi: Un nuevo enfoque en la investigación básica de la enfermedad de Chagas. Tesis presentada para optar al Título de Doctor en Ciencias Biológicas.UBA.Vol. 1, pág. 70.
- 77-Engel J.C., Franke de Cazzulo B.M., Stoppani A.O.M.,

- Cannata J.J.B., Cazzulo J.J. (1987) Aerobic glucose fermentation by T.cruzi axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 26,1-10.
- 78-Engman D.M., Reddy L.V., Donelson J.E., Kirchhoff (1987) T.cruzi exhibits inter- and intra-strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. Mol. Biochem. Parasitol. 22(2-3),115-123.
- 79-Erlanger B., Kokowsky N., Cohen N. (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys. 95,271-278.
- 80-Etges R., Bouvier J., Bordier C. (1986) The major surface protein of Leishmania promastigotes is a protease. The J. of Biol. Chem. 261 (20) 9098-9101.
- 81-Fairbanks G., Steck T.E., Wallach D.F.H. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochem. 10 (13) 2606-2617.
- 82-Feinman R.D., ed. (1983) Chemistry and biology of alfa 2-macroglobulin. New York: New York Academy of Sciences. 1-478.
- 83-Fernandes J.F., Castellani O. (1966 a) Growth characteristics and chemical composition of T.cruzi. Exp. Parasit. 18,195-202.
- 84-Fernandes J.F., Halsman M., Castellani O. (1966 b) Effect of mitomycin C, actinomycin D and pyrimidine analogs

on the growth rate, protein and nucleic acid synthesis, and on the viability of T.cruzi. Exp. Parasit. 18,203-210.

85-Franco da Silveira J., Zingales B., Colli W. (1977) Characterization of an adenylyl ciclase activity in particulate preparations from epimastigote forms of T.cruzi. Biochem. Biophys. Acta 481,722-733.

86-Frasch A.C.C., Cazzulo J.J., Stoppani A.O.M. (1978a) Solubilization and some properties of the Mg²⁺ -activated adenosine triphosphatase from T.cruzi. Comp. Biochem. Physiol. 61B,207-212.

87-Frasch A.C.C., Segura E.L., Cazzulo J.J., Stoppani A.O.M. (1978 b) Adenosine triphosphatase activities in T.cruzi. Comp. Biochem. Physiol. 60B,271-275.

88-Fujiyama Y., Kobayashi K., Senda S., Benno T., Bamba T., Hosoda S. (1985) A novel IgA protease from Clostridium sp capable of cleaving IgA1 and IgA2 A2 m(1) allotype, but not IgA2 A2 m(2) allotype paraproteins. J. Immun. 134,573-576.

89-Gerez de Burgos N.M., Burgos C., Blanco A., Paulone I., Segura E.L. (1976) Actividad alfa- hidroxíácido dehidrogenasa en T.cruzi. Acta Physiol. Latinoamer. 26,10-17.

90-Gibson W.C., Miles M.M. (1986) The karyotype and ploidy of T.cruzi. EMBO J. 5(6),1299-1305.

91-Glaumann H., Ericsson J.L.E., Marzella L. (1981)

Mechanisms of intralysosomal degradation with special reference to autophagocytosis and heterophagocytosis of cell organelles. *Inter. Rev. Cytol.* 73,149-182.

92-Glossmann H., Neville D.M.Jr. (1971) Glycoproteins of cell surfaces. *J. Biol. Chem.* 246 (20),6339-6346.

93-Gonçalves N.B., Carmo E.S., Tavares B.M. (1958) 6th International Congress on Tropical Medicine and Malaria. *Inst. de Med. Trop., Lisboa* (citado por 25).

94-Gorin P.A.J., Barreto Bergter E.M., da Cruz F.S. (1981) The chemical structure of the D- galacto- D- mannan component of T.cruzi: C13- N.M.R. shift dependence on structure of D- galactose to D- mannose linkage. *Carbohydr. Res.* 88,177-188.

95-Grinde B., Seglen P.O. (1980) Differential effects of proteinase inhibitors and amines on the lysosomal and non-lysosomal pathways of protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Bioch. et Biophysica Acta.* 632,73-86.

96-Gutteridge W.E., Rogerson G.W. (1979) Biochemical aspects of the biology of T.cruzi. In: *Biology of the Kinetoplastida.* Vol. 2. 619-642. Edited by Lumsden W.H.R., Evans D.A. Academic Press, London.

97-Gutteridge W.E. (1981) T.cruzi: recent biochemical advances. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75,484-492.

98-Hammond D.J., Gutteridge W.E. (1980) Enzymes of

- pyrimidine biosynthesis in T.cruzi. FEBS Lett. 118,259-262.
- 99-Hampton H.R. (1970) Lysine transport in the culture form of T.cruzi: kinetics and inhibition of uptake by structural analogues. Int. J. Biochem. 1,706-714.
- 100-Hampton J.R. (1971) Serine metabolism in the culture form of T.cruzi: synthesis of other amino acids. Comp. Biochem. Physiol. 39B,999-1003.
- 101-Harlow E., Lane D. (1988) Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. Capítulo 15, pág. 628.
- 102-Hausmann J., Horackova J., Deyl Z. (1986) Effect of intramolecular S-S bond cleavage upon the mobility of proteins in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. J. of Chromatogr. 377,361-367.
- 103-Hoare C.A., Wallace F.G. (1966) Developmental stages of Trypanosomatid Flagellates: a new terminology. Nature. 212,1385-1389.
- 104-Hoare C.A. (1979) The trypanosomes of mammals. A zoological monographs. Blackwell Scientific Publications. ed. 60-80. Oxford and Edinburg.
- 105-Hodges S.C., Hirata A.A. (1984) Effect of heat and SDS on solubilization of proteins before two- dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Clinical Chemistry 30 (12),2003-2007.
- 106-Itow S., Camargo E.P. (1977) Proteolytic activities in

- cells extracts of T.cruzi. J. Protozool. 24(4),591-595.
- 107-Joshi M.D., Jayannathan V. (1966) Hexokinase.I. Brain. Methods Enzymol. 9,371-375.
- 108-Juan S.M., Cazzulo J.J., Segura E.L. (1977) The citrate synthase from T.cruzi. J. Parasitol. 65,921-922.
- 109-Katzin A.M., Zingales B., Colli W. (1984) Genes and antigens of parasites. C.M. Morel, editor. 2nd edition. 339-346.
- 110-Knowles S.E., Ballard F.J. (1976) Selective control of the degradation of normal and aberrant proteins in Reuber H35 hepatoma cells. Biochem. J. 156,609-617.
- 111-Kornberg A. (1955) In Methods in Enzymology. vol.1,441. Ed. by Colowick S.P., Kaplan N.O. New York. Academic Press.
- 112-Krettli A., Thomas N., Eisen H. (1980) Escape mechanisms of T.cruzi from the host immune system. Les Colloques de l'INSERM- Cancer Immunology and Parasite Immunology. Israel L., Lagraner P., Salomon J.C. Eds. INSERM. 97,553-8.
- 113-Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227,680-685.
- 114-Lambrecht F.L. (1965) Biological variations in Trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas' Disease. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.

7,346-352.

115-Lanar D.R., Silven Levy L., Manning J.E. (1981) Complexity and content of the DNA and RNA in T.cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. 3,327-341.

116-Langreth S.G., Balber A.E. (1975) Protein uptake and digestion in bloodstream and culture forms of Trypanosoma brucei. J. Protozool. 22,40-53.

117-Laskowski M. (1955) Trypsinogen and trypsin. In Methods in Enzymology (Edited by Colowick S.P., Kaplan N.O.), vol. 2,26-36. Academic Press. New York.

118-Leavitt R., Schlesinger S.S., Kornfeld S. (1977) Tunicamycin inhibits glycosylation and multiplication of sindbis and vesicular stomatitis viruses. J. Virol. 21,375-385.

119-Lehmann D.L. (1963) Comparative utilization of carbohydrates by culture forms of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi and T.ranarum. Ann. Trop. Med. Parasitol. 57,232-234.

120-Lonsdale-Eccles J.D., Mpimbaza G.W.N. (1986) Thiol-dependent proteases of African trypanosomes. Eur. J. Biochem. 155,469-473.

121-Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193,265-275.

122-Luban N.A., Dvorak J.A. (1974) T.cruzi: interaction

with vertebrate cells in vitro.III. Selection for biological characteristics following intracellular passage. Exp. Parasitol. 36,143-149.

123-Mancilla R., Náquira C., Lanas C. (1966) Protein biosynthesis in Trypanosomatidae. I. In vivo incorporation of leucine- 1- 14C into the proteins of T.cruzi. Comp. Biochem. Physiol. 18,241-248.

124-Mancilla R., Náquira C., Lanas C. (1967) Protein biosynthesis in Trypanosomidae. II. The metabolic fate of DL- leucine- 1- 14C in T.cruzi. Exp. Parasit. 21,154-159.

125-Mansa B., Kilian M. (1986) Retained antigen-binding activity of Fab alfa fragments of human monoclonal immunoglobulin A1 (IgA1) cleaved by IgA1 protease. Infect. Immun. 52,171-174.

126-Manzullo E., Darraidou M., Libonatti O., Rozlosnik J. (1981) Estudio longitudinal de la cardiopatía chagásica crónica. Presentado al premio Cordic.

127-Marzella L., Ahlberg J., Glaumann H. (1980) In vitro uptake of particles by lysosomes. Exp. Cell Res. 129,460-467.

128-Mc Donald J.K. (1985) An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. Histochemical Journal. 17,773-785.

129-Meirelles M.N.L., De Souza W. (1984) Localization of a

- Mg²⁺ -activated ATPase in the plasma membrane of T.cruzi.
The J. of Protozool. 31(1),135-140.
- 130-Meyer H., De Souza W. (1976) Electronmicroscopic study of T.cruzi periplast in tissue cultures.I. Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms of the parasite's life cycle. J. Protozool. 23,385-390.
- 131-Milder R., Deane M.P. (1969) The cytostome of T.cruzi and T.conorhini. J. Protozool. 16,730-737.
- 132-Miller A.W., Robyt J.F. (1986) Detection of dextransucrase and levansucrase on polyacrylamide gels by the periodic acid- Schiff stain: staining artifacts and their prevention. Anal. Biochem. 156,357-363.
- 133-Montamat E.E., Moreno J., Blanco A. (1978) Actividad leucina aminotransferasa en T.cruzi. Medicina (Buenos Aires) 38,67-71.
- 134-Mortimore G.E. (1983) Nutr. Rev. 40,1-12. Citado por Glaumann H. y col. (1985) Protein degradation in the lysosome. Biochem. Soc. Trans. 13,1010-1012.
- 135-Mulks M.H., Plaut A.G. (1978) IgA protease production as a characteristic distinguishing pathogenic from harmless Neisseriaceae. N. England J. Med. 299,973-976.
- 136-Neff N.T., De Martino G.N., Goldberg A.L. (1979) The effect of protease inhibitors and decreased temperature on the degradation of different classes of proteins in cultured

hepatocytes. J. Cell Physiol. 101 (3),439-458.

137-Novikoff A.B., Shin W-Y. (1978) Endoplasmic reticulum and autophagy in rat hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75 (10),5039-5042.

138-Opperdoes F.R., Steiger R.F. (1981) Localization of hydrolases in cultured procyclic trypomastigotes of T.brucei. Mol. and Biochem. Parasitol. 4,311-323.

139-Opperdoes F.R. (1987) Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. Ann. Rev. Microbiol. 41,127-151.

140-Parodi A.J., Quesada-Allue L.A., Cazzulo J.J. (1981) Pathway of protein glycosylation in the trypanosomatid Crithidia fasciculata. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78,6201-6205.

141-Parodi A.J., Quesada-Allue L.A. (1982) Protein glycosylation in T.cruzi. I. Characterization of dolichol-bound monosaccharides and oligosaccharides synthesized "in vivo". J. Biol. Chem. 257,7637-7640.

142-Parodi A.J., Cazzulo J.J. (1982) Protein glycosylation in T.cruzi. II. Partial characterization of protein-bound oligosaccharides labeled "in vivo". J. Biol. Chem. 257,7641-7645.

143-Pellegrini J. (1949) O perigo de transmissao da doença de Chagas pela transfusao de sangue. Primeiras comprovações sorologicas de esquizotripanose em doadores e em candidatos

a doadores de sangue. Brasil.Med. 63,63-68.

144-Perona R., Vallejo C.G. (1982) The lysosomal proteinase of Artemia. Purification and characterization. Eur. J. Biochem. 124,357-362.

145-Peters T.J., Muller M., De Duve C. (1972) Lysosomes of the arterial wall.I. Isolation and subcellular fractionation of cells from normal rabbit aorta. J. Exp. Med. 136(5),1117-1139.

146-Phillips H.M. (1981) Method for rapid removal of sodium dodecyl sulfate from polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 117,398-401.

147-Piras M.M., Henriquez D., Piras R. (1985) The effect of proteolytic enzymes and protease inhibitors on the interaction T.cruzi- fibroblasts. Mol. and Biochem. Parasitol. 14,151-163.

148-Pizzi T. (1957) Inmunología de la enfermedad de Chagas. Monografía Biológica, 71:39. Universidad de Santiago, Chile.

149-Plaut A.G., Gilbert J.V., Artenstein M.S., Capra D. (1975) Neisseria gonorrhoeae and Neisseria meningitidis: extracellular enzyme cleaves human immunoglobulin A. Science 190,1103-1105.

150-Pringle J.R. (1975) Methods for avoiding proteolytic artifacts in studies of enzymes and other proteins from yeasts. Methods Cell Biol. 12,149-184.

- 151-Quiocho F.A. (1986) Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions. *Annu. Rev. Biochem.* 55,287-315.
- 152-Rangel H.A., Araújo P.M.F., Repka D., Costa M.G. (1981 a) T.cruzi: isolation and characterization of a proteinase. *Exp. Parasit.* 52,199-209.
- 153-Rangel H.A., Araújo P.M.F., Camargo I.J.B., Bonfitto M., Repka D., Sakurada J.K., Atta A.M. (1981 b) Detection of a proteinase common to epimastigote, trypomastigote and amastigote of different strains of T.cruzi. 32,87-92.
- 154-Recover P., Piras R. (1983) Actividad proteásica frente a 125I- caseína de trypomastigotes enteros de T.cruzi. *Acta Científica Venezolana.* 34 (Supl. 1),39.
- 155-Riou G.F., Pautrizel R. (1969) Nuclear and kinetoplast DNA from Trypanosomes. *J. Protozool.* 16,509-513.
- 156-Robinson D., Willcox P. (1969) 4-Methyl umbelliferyl phosphate as a substrate for lysosomal acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 191,183-186.
- 157-Roitman I., Gutteridge W.E. (1978) Synthesis of lipids in T.cruzi. Abstract No A-28. V Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambú, Brazil.
- 158-Romanha A.J., da Silva Pereira A.A., Chiari E., Kilgour U. (1979) Isoenzymes patterns of cultured T.cruzi: changes after prolonged subculture. *Comp. Biochem. Physiol.* 62,139-142.

- 159-Rubio J., Rosado Y., Castañeda M. (1980) Subunit structure of T.cruzi chromatin. Can. J. Biochem. 58,1247-1251.
- 160-Ryley J.F. (1956) Studies on the metabolism of the protozoa. 7. Comparative metabolism of eleven species of trypanosomes. Biochem. J. 62,215-228.
- 161-Salzman T.A., Stella A.M., Wider de Xifra E.A., Batlle A.M. del C., Docampo R., Stoppani A.O.M. (1982) Porphyrin biosynthesis in parasitic hemoflagellates: functional and defective enzymes in T.cruzi. Comp. Biochem. Physiol. 72 B,663-667.
- 162-Sanabria A. (1970) Nuevos estudios acerca de la ultraestructura del T.cruzi en el miocardio del ratón. Acta Científica Venezolana. 21,107-118.
- 163-Sastre M.B.R. de, Stoppani A.O.M. (1973) Demonstration of Mg²⁺ -activated adenosine triphosphatase in T.cruzi. FEBS Lett. 31,137-142.
- 164-Schmuñis G.A., Szarfman A. (1977) La enfermedad de Chagas congénita. Medicina (Bs As) 37,47-53.
- 165-Seglen P.O., Grinde B., Solheim A.E. (1979) Inhibition of the lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes by ammonia, methyl amine, chloroquine and leupeptin. Eur. J. Biochem. 95,215-225.
- 166-Seglen P.O., Solheim A.E., Grinde B., Gordon P.B., Schwarz P.E., Gjessing R., Poli A. (1980) Aminoacid control

- of protein synthesis and degradation in isolated rat hepatocytes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 349,1-17.
- 167-Segura E.L., Cura E.N., Paulone V.C., Cerisola J.L. (1974) Antigenic makeup of subcellular fractions of T.cruzi. J. Protozool. 21,571-574.
- 168-Segura E.L., Engel J.C., Katzin V.J., Subías E., Isola E.D.de, Esteva M., Lammel E., De Rissio A.M., González Cappa S.M. (1980) Variación en la capacidad infectante de formas de cultivo del T.cruzi. Medicina (Bs As) 40,256-257.
- 169-Segura E.L., Subias E., Esteva M., Cabeza Meckert P., Bronzina A., Laguens R.P. (1980) Características de infectividad de tres poblaciones de cultivo de T.cruzi. Medicina (Bs As) 40 (Supl. 1), 97-102.
- 170-Shaw J.J., Voller A., Bryant C. (1964) Intermediary carbohydrate metabolism in four species of Trypanosomatidae. Ann. Trop. Med. Parasit. 58,17-24.
- 171-Sims P., Gutteridge W.E. (1978) Inhibitory action of a 5- nitrofurán (SQ 18506) against nucleic acid synthesis in T.cruzi. Biochem. Pharmacol. 27,2815-2820.
- 172-Soares M.J., De Souza W. (1988) Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 20,349-363.
- 173-Solari A.J. (1980) The 3- dimensional fine structure of the mitotic spindle in T.cruzi. Chromosoma (Berl.) 78,239-255.

- 174-Soulsby E.J.L., ed. (1987) Immune responses in parasitic infections: immunology, immunopathology, and immunoprophylaxis. Boca Raton, Fl:CRC Press, 25-118.
- 175-Souza W. de, Martínez-Palomo A., González- Robles A. (1978) The cell surface of T.cruzi: cytochemistry and freeze-fracture. J. Cell. Sci. 33,285-299.
- 176-Souza W. de (1984) Cell biology of Trypanosoma cruzi. Int. Rev. Cytol. 86,197-283.
- 177-Srere P.A. (1969) Citrate synthase. Methods in Enzymology. 13,3-11.
- 178-Steiger R.F. (1973) On the ultrastructure of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei in the course of its life cycle and some related aspects. Acta Tropica 30,63-168.
- 179-Steiger R.F., Opperdoes F.R., Bontemps J. (1980) Subcellular fractionation of T.brucei bloodstream forms with special reference to hydrolases. Eur. J. Biochem. 105,163-175.
- 180-Stoppani A.O.M., Boiso J.F.de (1973) Oxidative phosphorylation in T.cruzi. Experientia (Basel) 29,1494-1496.
- 181-Stoppani A.O.M., Docampo R., Boiso J.F.de, Frasch A.C.C. (1980) Effect of inhibitors of electron transport and oxidative phosphorylation on T.cruzi respiration and growth. Mol. Biochem. Parasitol. 2,3-22.
- 182-Struck D.K., Lennarz W.J. (1980) "The biochemistry of

- glycoproteins and proteoglycans" p. 35. Ed. W.J. Lennarz. Plenum Press. New York.
- 183-Suhar A., Marks N. (1979) Purification and properties of brain cathepsin B. Evidence for cleavage of pituitary lipotropins. Eur. J. Biochem. 101,23-30.
- 184-Sylvester D., Krassner S.M. (1976) Proline metabolism in T.cruzi epimastigotes. Comp. Biochem. Physiol. 55 B,443-447.
- 185-Taliaferro W.H., Pizzi T. (1955) Conective tissue reactions in normal and immunized mice to reticulotropic strain of T.cruzi. J. Infect. Dis. 96,199-227.
- 186-Tanowitz H., Wittner M., Sveda M., Soeiro R. (1975) Studies on ribosomal RNA of T.cruzi. J. Parasitol. 61,1065-1069.
- 187-Taylor M.B., Berghausen H., Heyworth P., Messenger N., Rees L.J., Gutteridge W.E. (1980) Subcellular localization of some glycolytic enzymes in parasitic flagellated protozoa. Int. J. Biochem. 11,117-120.
- 188-Teixeira A.R.L., Santana J.M. (1989) Trypanosoma cruzi: endocytosis and degradation of specific antibodies by parasite forms. Am.J. Trop. Med. Hyg. 40(2),165-170.
- 189-Tiselius A., Hjerten S., Levin O. (1956) Protein chromatography on calcium phosphate columns. Archs. Biochem. Biophys. 65,132-155.
- 190-Toro G.C., Galanti N. (1988) H1 histone and histone

- variants in T.cruzi. Exp. Cell Res. 174,16-24.
- 191-Torruella M., Franke de Cazzulo B.M., Engel J.C., Ruiz A.M., Segura E.L., Cazzulo J.J. (1981) T.cruzi and T.rangeli: glutamate dehydrogenases and proteolytic activities. Comp. Biochem. Physiol. 70B,463-468.
- 192-Travis J., Salvesen G.S. (1983) Human plasma proteinase inhibitors. Annu. Rev. Biochem. 52,655-709.
- 192.b- Tropical Diseases. Progress in International Research. 1987-1988. Ninth Programme Report. TDR, UNDP/WORLD BANK/WHO.
- 193-Urbina J.A., Azavache V. (1984) Regulation of energy metabolism in T.(Schizotrypanum)cruzi epimastigotes. II.NAD+ dependent glutamate dehydrogenase. Mol. Biochem. Parasitol. 11,241-255.
- 194-Visser N., Opperdoes F.R. (1980) Glycolysis in T.brucei. Eur. J. Biochem. 103,623-632.
- 195-von Brand Th. (1973) Biochemistry of Parasites. 2nd Ed. Academic Press, New York and London.
- 196-von Brand Th. (1979) Biochem. and Physiol. of Endoparasites. Elsevier/ North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- 197-Walsh K.A., Wilcox O.E. (1970) Serine proteases. In Methods in Enzymol. 19,31-41. Academic Press. New York.
- 198-Walter R.D., Ebert F. (1979) Evidence for NADH- and NADPH- linked glutamate dehydrogenases in T.cruzi

- epimastigotes. J. Protozool. 26,653-656.
- 199-Warburg, Christian (1942) Extinction coefficients for enolase and nucleic acid. Biochem. Z. 310,384.
- 200-Warren L.G., Kitzman W.B. (1963) Metabolism of Schizotrypanum cruzi Chagas. II. Galactose utilization. J. Parasitol. 49,808-813.
- 201-Warren L.G., Patrzek D. (1963) Metabolismo del Schizotrypanum cruzi Chagas. III. Evidencia en favor de un mecanismo de transporte activo de la galactosa y la fructosa. Acta Cient. Venezolana suppl. 1,127-134.
- 202-Weber K., Osborn M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The J. of Biol. Chemistry. 244 (16),4406-4412.
- 203-Willenbrock F., Brocklehurst K. (1985) A general framework of cysteine-proteinase mechanism deduced from studies on enzymes with structurally different analogous catalytic-site residues Asp-158 and -161 (papain and actinidin), Gly-196 (cathepsin B) and Asn-165 (cathepsin H). Biochem. J. 227,521-528.
- 204-Williamson J., Desowitz R.S. (1961) The chemical composition of trypanosomes. I. Protein, amino acid and sugar analysis. Exp. Parasitol. 11,161-175.
- 205-Wood D.E., Pipkin A.C. (1969) Multiplication and differentiation of T.cruzi in an insect cell culture system.

Exp. Parasitol. 24,176-183.

206-Wood D.E. (1975) T.cruzi: fatty acids metabolism in vitro. Exp. Parasitol. 37,60-66.

207-Wyckoff M., Rodbard D., Chrambach A. (1977) Polyacrylamide gel electrophoresis in SDS-containing buffers using multiphasic buffer systems: properties of the stack, valid Rf measurement, and optimized procedure. Anal. Biochem. 78,459-482.

208-Yawetz A., Agosin M. (1981) Purification of the glutathione-S-transferase of T.cruzi. Comp. Biochem. Physiol. 68B,237-243.

209-Yokosawa H., Ojima S., Ishii S. (1977) Thioltrypsin. Chemical transformation of the active-site serine residue of Streptomyces griseus trypsin to a cysteine residue. J. Biochem. 82,869-876.

210-Zeledón R. (1960) Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. V. Transaminases. Rev. Brasil. Biol. 20,409-414.

211-Zeledon R. (1972) Los vectores de la enfermedad de Chagas en América. Simp. Internac. Enf. de Chagas. 327.UNDP/ World Bank/ Who (Oficina Panamericana de la Salud) (1982) Special programme for research and training in tropical diseases. VI Programme Reports. 31-12.

212-Zeledon R., Bolaños R., Rojas M. (1984) Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of

T.cruzi in the insect vector. Act. Trop. 41,39.

213-Zuurendonk P.F., Tager J.M. (1974) Rapid separation of particulate components and soluble cytoplasm of isolated rat-liver cells. Biochimica et Biophysica Acta. 333,393-399.

ABREVIATURAS.

BAPA: alfa-L-benzoil-D-L-arginina-p-nitroanilida

Con A: Concanavalina A

CS: citrato sintasa

DTNB: ácido 5,5'-ditio bis(2- nitrobenzoico)

E-64: trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino)-butano

EDTA: ácido etilen diamino tetraacético (sal bisódica)

EM: enzima málica

FMA: acetato mercúrico de fluoresceína

HK: hexoquinasa

Ig G: inmunoglobulina G

LDH: lactato dehidrogenasa

Man: manosidasa

MDH: malato dehidrogenasa

2-ME: 2-mercaptoetanol

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

p-CMB: ácido p-cloro mercuri benzoico

p-CMPS: ácido p-cloro mercuri fenil sulfónico

Pepstatina A: isovalina-valina-valina-statina-alanina-statina [statina= ácido (3S,4S)4-amino-3-hidroxi-6-metil heptanoico]

PM: peso molecular

PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro

SDS: dodecil sulfato de sodio

TCA: ácido tricloroacético

TLCK: N-alfa-p-tosil-L-lisil clorometil cetona

TPCK: N-alfa-p-tosil-L-fenilalanil clorometil cetona

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

INDICE.

INTRODUCCION

Generalidades.....	1
Sistemática del parásito.....	1
Ciclo de vida.....	3
Transmisión.....	5
Ultraestructura.....	6
Metabolismo: Hidratos de Carbono.....	10
Lípidos.....	13
Acidos nucleicos.....	14
Proteínas.....	14
Objetivos del presente trabajo.....	26

MATERIALES Y METODOS

Cultivo del <u>T.cruzi</u>	27
Purificación de la enzima.....	28
Cromatografía de afinidad.....	29
Determinación de actividad de la enzima.....	31
Inhibidores y activadores.....	32
Otros sustratos usados.....	33
Determinación del pH óptimo con distintos sustratos.....	36
Determinación de estabilidad térmica.....	37
Determinación de temperatura óptima.....	37
Determinación de actividad de otras enzimas:	
a) Determinación del PM por filtración en gel.....	38

Indice	129
b) Efectos de digitonina en células enteras.....	39
Determinación de proteínas.....	41
Determinación del PM por filtración en gel.....	41
Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	42
Determinación del PM por SDS-PAGE	44
Determinación del pI.....	45
Tinción para proteínas.....	46
Tinción para hidratos de carbono.....	47
Localización intracelular:	
(A) Tratamiento de células enteras con digitonina.....	48
(B) Centrifugación diferencial y latencia.....	49
(C) Ultracentrifugación en gradiente isopícnico.....	51
 RESULTADOS Y DISCUSION	
Purificación.....	53
Peso molecular	53
Naturaleza glicoproteica.....	59
punto isoeléctrico.....	64
pH óptimo con distintos sustratos.....	64
Estabilidad térmica y temperatura óptima.....	71
Inhibidores y activadores.....	73
Localización intracelular:	
(A) Tratamiento de células enteras con digitonina.....	80
(B) Centrifugación diferencial y latencia.....	82
(C) Ultracentrifugación en gradiente isopícnico.....	86
Discusión general	

Indice	130
(1) Ubicación de la enzima entre las peptidasas.....	89
(2) Comparación con otras proteinasas de <u>T.cruzi</u>	91
(3) Posibles funciones de la proteinasa.....	93
CONCLUSIONES.....	96
BIBLIOGRAFIA.....	97
ABREVIATURAS.....	126